



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
Laboratoire Sols et Environnement

THESE

Présentée à

l'Institut National Polytechnique de Lorraine

**en vue de l'obtention du Doctorat de l'INPL
en Sciences Agronomiques**

par

Tanegmart REDJALA

**Etude de l'absorption racinaire du cadmium
afin d'améliorer la modélisation de son transfert vers la plante**

soutenue publiquement le 03 Septembre 2009 devant la Commission d'Examen :

Sébastien Thomine	Chargé de Recherche, CNRS, Gif-sur-Yvette	Rapporteur
Urs Feller	Professeur, Institute of Plant Sciences, Bern	Rapporteur
Sylvain Pellerin	Dir. de Recherche, INRA, Bordeaux	Examineur
Pierre Berthomieu	Professeur, SupAgro, Montpellier	Examineur
Isabelle Desportes	Ingénieur, ADEME, Angers	Examinatrice
Jean Louis Morel	Professeur, ENSAIA-INPL, Vandoeuvre-lès-Nancy	Directeur
Thibault Sterckeman	Ing. de Recherche, INRA, Vandoeuvre-lès-Nancy	Co-Directeur

Cette thèse a été financée par l'Institut National Polytechnique de Lorraine, la Région Lorraine ainsi que par l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie. Je les remercie tous les trois vivement pour leur confiance et l'intérêt qu'ils ont nourris pour mon projet de recherche.

Remerciements

Voilà une page de ma vie qui se tourne, non sans un pincement au cœur. Quatre années de vie inoubliables de par leur intensité d'un point de vue professionnel et personnel à la fois.

Je tiens tout d'abord à remercier Jean-Louis Morel, mon Directeur de thèse et Directeur du Laboratoire Sols et Environnement, et Thibault Sterckeman, mon co-directeur de thèse, qui m'ont fait le grand honneur de me proposer un sujet de thèse suite à mon travail de stage sous leur encadrement. Leurs encouragements incessants m'ont fait acquérir beaucoup d'autonomie, et ce fut un plaisir de travailler avec ce co-encadrement à la fois bienveillant et efficace.

Merci à toi en particulier, Thibault pour ta disponibilité quasi quotidienne, ton écoute, ta mansuétude, ton intérêt manifeste pour mes propositions et mes résultats, tes conseils avisés... et ta patience !

Merci également, Jean-Louis, Thibault, de m'avoir donné l'opportunité de présenter mes premiers résultats à Pékin !

Jérôme Perriguet, c'est à toi principalement que je dois ma formation à la culture des plantes en conditions contrôlées et à l'utilisation des traceurs radioactifs et du matériel analytique. Tu as été un excellent encadrant de stage, et je t'en remercie infiniment. Merci aussi pour ta disponibilité même au cours de ma thèse ! Je garde de très bons souvenirs de nos moments de rires et de complicité dans le travail.

Je remercie aussi particulièrement Samia, Muhammad et Claire pour les stages qu'ils ont réalisés sous mon encadrement et avec lesquels j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler dans la bonne humeur, tôt le matin jusque tard le soir ! Ces travaux de stage ont pour certains contribué significativement à des parties de ma thèse. Merci

aussi à Ivan pour la collaboration que nous avons menée ensemble à la fin de ma thèse.

Merci à tous les membres du laboratoire qui m'ont aidée à réaliser mes expérimentations, et qui m'ont initiée à la sécurité au travail : Stéphane, Jean-Claude, Adeline, Bernard, Alain...

Merci à tous ceux qui ont partagé mon bureau et qui ont contribué fortement à mon bien-être au quotidien : Clémence bien sûr, qui m'a agréablement accompagnée depuis notre stage de Master (merci Clémence pour nos conversations si intéressantes ! Et on s'est bien serrés les coudes toutes les deux !), Aïda, Stephen, Hicham, et je sais que j'en oublie !

Merci à Séverine, Liliane et Isabelle pour avoir fait du secrétariat un coin si sympathique !

Merci à tous les autres, Christophe, David, Marie-France, Caroline, Sandrine, Valérie, François, Geneviève...J'ai beaucoup apprécié les échanges du quotidien avec vous, et merci beaucoup pour vos conseils et vos encouragements !

Merci aussi à mes amis de résidence universitaire grâce auxquels j'ai tant ri à Nancy (Fatemeĥ, Marzieĥ, Nsrein, Fateĥ, ou rencontrés aux Doctoriales (Nacira, Saoussen...)). Ta présence, ta gentillesse et tes encouragements, Nacira, m'ont été d'un grand soutien, en particulier pendant ma troisième année ! Encore merci à toi.

Je remercie très fort mes formidables parents, champions du sacrifice et de l'encouragement. Merci Vavas pour m'avoir tant incitée à réussir mes études scolaires et musicales, merci Mamas pour toutes ces années d'abnégation envers tes trois bouts de chou dont je fais partie. C'est à vous chers parents, que je dédie cette thèse, avec ses qualités et ses imperfections, à l'image de votre enfant cadette.

Merci bien sûr également à ma sœur protectrice bien-aimée, Tanafit, qui m'a tant aidée dans ma scolarité, sans qui je ne serais pas allée aussi loin. Je remercie aussi beaucoup mon jeune frère Wasin qui m'a apporté tant de joie de vivre dans mon enfance et sans lequel je n'aurais pas aujourd'hui autant de goût pour la pédagogie !

Pour finir, je remercie celui qui est devenu ma moitié pendant ces années. Merci Fayçal d'avoir été là, tout près de moi, ces quatre années durant. Je n'oublierai

jamais nos fous-rires au LCR et nos enfantillages dans le couloir qui séparait tes chèvres de mes plantes (j'espère que tu ne joueras plus avec les charriots et les bonbonnes d'eau, c'est dangereux, ces trucs-là !!!), je ne peux pas oublier non plus nos bips en talkie-walkie qui laissaient ma chère Clémence perplexe, ni tes nuits passées dans mon bureau à veiller à ce qu'il ne m'arrive rien... Tu as été un véritable ange-gardien, et du fond du cœur, merci de m'avoir aidée et soutenue pendant ces quatre années de travail intense. Merci d'avoir tant égayé mes dernières années d'étudiante.

Résumé

Etude de l'absorption racinaire du cadmium afin d'améliorer la modélisation de son transfert vers les plantes

Cette thèse s'applique à améliorer la compréhension de l'absorption du cadmium (Cd) par le maïs et le tabouret calaminaire, dans l'objectif de mieux modéliser son transfert vers les plantes comestibles ou utilisées en phytoextraction. Le modèle utilisé étant sensible aux caractéristiques d'absorption racinaire, le premier objectif était de développer une méthode rigoureuse de mesure de ces paramètres. Deux protocoles ont été mis au point pour décrire précisément, en fonction de la concentration de Cd en solution, l'influx net de Cd dans les deux compartiments racinaires (parois et milieu intracellulaire). Les résultats ont mis en évidence, pour la première fois, l'existence d'un système de transport à faible affinité (LATS) qui agit en même temps que le système de transport à forte affinité pour le Cd (HATS). Les paramètres cinétiques mesurés à travers ces travaux n'ont cependant pas amélioré significativement le modèle : le prélèvement de Cd par le maïs est surestimé de 100%, et son prélèvement par le tabouret calaminaire est sous-estimé de 66%. Plusieurs facteurs ont alors été étudiés pour comprendre les raisons de ce décalage. Nous avons montré que les conditions dans lesquelles ont été mesurés les paramètres cinétiques présentaient des caractéristiques capables de modifier radicalement leurs valeurs : la composition ionique de la solution d'exposition au Cd, la concentration de Cd durant la croissance, et la structure racinaire engendrée par la culture en hydroponie. Cette thèse suggère de cultiver les plantes en aéroponie, et de mesurer les paramètres cinétiques dans une composition ionique représentative du voisinage des parois et des membranes racinaires en sol, composition qu'il reste encore à déterminer.

Mots clés : absorption racinaire ; adsorption racinaire ; systèmes de transport membranaire ; interactions ioniques ; régulation ; structure racinaire

Summary

Study of cadmium root absorption to improve modelling of cadmium transfer from soil to plant

This thesis aimed to improve the comprehension of cadmium (Cd) absorption by maize and alpine pennycress plants in order to model its transfer into edible and hyperaccumulating plants better. Since the model used is sensitive to the characteristics of root absorption, the first objective was to develop a rigorous method for measuring those parameters. Two protocols were finalized to describe precisely Cd net influx in both root compartments (apoplast and symplast) according to Cd concentration in solution. The results highlighted, for the first time, the existence of a low-affinity transport system (LATS) that works at the same time with the high-affinity transport system (HATS). However, the kinetics parameters measured through these experimentations did not succeed in improving significantly the model: Cd uptake by maize is overestimated by 100%, and Cd uptake by alpine pennycress is under-estimated by 66%. Several factors were investigated in order to understand the reasons of this difference. We showed that the experimental conditions used to measure the kinetics parameters present characteristics that are able to modify their values significantly: the ionic composition of the solution of exposition to Cd, Cd concentration during growth, and the root structure that forms in hydroponics. This thesis suggests to choose aeroponics as controlled culture condition, and to measure the kinetics parameters in an ionic composition that is representative of the close vicinity of the root cell walls and membranes in soil. This composition remains to be investigated.

Key words: root absorption; root adsorption; membrane transport systems; ionic interactions regulation; root structure

Liste des abréviations

- **$1/n$** : facteur de linéarité de l'isotherme d'adsorption, appelé aussi "capacité d'adsorption", sans unité
- **Cd** : cadmium
- **CDF** : Cation Diffusion Facilitator
- **CEC racinaire** : Capacité d'Echange Cationique Racinaire
- **CPM** : coups par minutes
- **$DTPA$** : acide diéthylène triamine penta acétique
- **DW** : dry weight
- **$EDTA$** : acide éthylène diamine tétraacétique
- **$EGTA$** : acide ethyleneglycol-tetracétique
- **ETM** : Eléments en Traces Métalliques
- **$HATS$** : High-Affinity Transport System (Système de transport à forte affinité pour l'élément transporté)
- **I_{max}** : Influx net maximal de l'élément dans le système racinaire
- **I_{net}** : Influx net de l'élément dans le système racinaire
- **I_s** : Influx de l'élément dans le compartiment symplasmique du système racinaire
- **k_2** : est la constante de vitesse d'adsorption ($\text{nmol g}^{-1}\text{RS min}^{-1}$)
- **K_d** : coefficient de distribution linéaire solide-solution (K_d en L kg^{-1})
- **K_F** : facteur de capacité de Freundlich ($\text{L nmol g}^{-1}\text{RS min}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$)
- **K_m** : concentration en solution pour laquelle l'influx vaut la moitié de l' I_{max}
- **$LATS$** : Low-Affinity Transport System (Système de transport à faible affinité pour l'élément transporté)
- **LCT** : Low-affinity Cation Transporter
- **Lin** : modèle linéaire
- **$LN2$** : Liquid Nitrogen (azote liquide)
- **MC** : méthanol-chloroforme
- **Me^{2+}** : cation métallique
- **MES** : (2-(N-morpholino)Ethane Sulfonic Acid
- **MF** : matière fraîche
- **MM** : modèle de Michaëlis-Menten

- **MS** : matière sèche
- **Nc-H** : écotype hyperaccumulateur de *Noccaea caerulescens*
- **Nc-L** : écotype peu accumulateur de *Noccaea caerulescens*
- **Nramp** : Natural resistance-associated macrophage protein
- **PA** : parties aériennes
- **PCs** : phytochélatines
- **PUF** : Plant Uptake Factor : facteur de prélèvement par la plante (L kg^{-1})
- **PR** : parties racinaires
- **Q_0** : Quantité de Cd racinaire total après exposition au Cd et avant tout processus de désorption
- **Q_{apo}** : quantité de Cd dans l'apoplasme racinaire
- **q_e** : quantité de Cd apoplasmique échangeable : quantité de Cd désorbée à l'équilibre pour une efficacité de désorption de 100% ($\text{nmol g}^{-1}\text{RS}$)
- **Q_f** : quantité de Cd restant dans les racines après désorption
- **R^2** : coefficient de détermination
- **RS** : racines sèches
- **RUSE** : modèle « Root Uptake of Soil Elements »
- **t** : temps (min)
- **V_{apo}** : vitesse de prélèvement du Cd dans l'apoplasme racinaire ($\mu\text{g g}^{-1}\text{RS min}^{-1}$)
- **Zm** : *Zea mays*
- **ZIP** : ZRT, IRT-like Proteins

Sommaire

Préambule	1
Partie 1. Que sait-on du transfert sol-plante du Cd ?	3
Chapitre 1. Le Cd, un danger pour la chaîne alimentaire	3
I. Un élément naturel hautement toxique	3
I.1. Un élément en trace métallique (ETM)	3
I.2. Un élément du sol mobile et dangereux.....	3
I.3. La toxicité du Cd pour la chaîne alimentaire	4
II. Le Cd dans le sol et sa biodisponibilité à la surface racinaire	6
II.1. Définition de la biodisponibilité des éléments nutritifs	6
II.2. Facteurs influençant la biodisponibilité du cadmium pour la plante	6
II.2.1. Facteurs liés au sol	6
II.2.2. Facteurs liés à la plante.....	7
Chapitre 2. Le Cd dans la plante	8
I. Différents types de plantes selon leur comportement vis-à-vis du Cd	8
II. Facteurs influençant le prélèvement du Cd biodisponible par les végétaux.....	9
II.1. La composition ionique de la solution du sol.....	9
II.2. Facteurs intrinsèques à la plante	10
Chapitre 3. L'absorption racinaire du Cd et son transport dans la plante.....	11
I. L'absorption racinaire du cadmium	11
I.1. Structure des racines	11
I.2. La voie apoplasmique	13
I.3. La voie symplasmique	14
I.4. Description du mouvement radial.....	15
I.4.1. Les facteurs inhérents à la plante	16
I.4.2. Les facteurs environnementaux	17
II. Le transport du Cd dans la plante.....	17
Chapitre 4. L'absorption du Cd à travers les membranes plasmiques	19
I. Le passage transmembranaire des éléments nutritifs	19
I.1. La diffusion simple	19
I.2. Les types de protéines de transport des éléments nutritifs	19
I.3. Les canaux.....	20
I.3.1. Les transporteurs	21
I.3.2. Comparaison transporteurs / canaux	21
I.4. La diffusion facilitée	21
I.5. Les transports actifs primaire et secondaire	22
II. Cinétiques d'accumulation et isothermes d'absorption membranaire du Cd	22
III. La complexation intracellulaire du Cd	27
III.1. La séquestration du Cd dans les cellules.....	27
III.2. La formation de complexes	27
Chapitre 5. Prévoir le transfert des éléments du sol vers les plantes.....	29

Chapitre 6. Conclusion de la synthèse bibliographique et démarche expérimentale	31
I. Zones d'ombre	31
II. Démarche expérimentale	32
Partie 2. Mesure à court terme des paramètres cinétiques d'absorption racinaire du Cd et simulation des quantités de Cd prélevées à long terme	33
Chapitre 1. Mesure à court terme des paramètres cinétiques de l'absorption racinaire du Cd : fractionnement du Cd racinaire au méthanol chloroforme (MC) et mise en évidence de deux systèmes de transport membranaire (méthode MC)	35
I. Matériels et méthodes.....	35
I.1. Culture des plantes en conditions contrôlées	35
I.1.1. Germination du maïs et du tabouret	35
I.1.2. Culture des plantes en hydroponie	36
I.2. Exposition au Cd radiomarké pour l'obtention des isothermes d'absorption.....	36
I.3. Fractionnement du Cd racinaire au méthanol-chloroforme	37
I.3.1. Désorption du métal apoplasmique sorbé réversiblement.....	37
I.3.2. Récupération du Cd intracellulaire.....	37
I.3.3. Dosage du Cd dans les différents compartiments racinaires	38
I.4. Analyse des données	39
II. Résultats.....	40
II.1. Distribution du Cd dans les différents compartiments racinaires.....	40
II.2. Isotherme de prélèvement apoplasmique	41
II.3. Isothermes d'absorption (ou d'influx) symplasmique	43
II.4. Isotherme de prélèvement racinaire total	47
III. Discussion.....	48
III.1. L'isotherme d'adsorption	48
III.2. L'absorption symplasmique	49
III.2.1. La composante saturante de l'influx symplasmique	49
III.2.2. K_m ou le paramètre d'hétérogénéité ou d'affinité	49
III.2.3. I_{max} ou la vitesse d'absorption maximale	50
III.2.4. La composante linéaire de l'influx symplasmique ou LATS	50
IV. Validité du protocole de fractionnement	51
IV.1. Le Cd libéré dans le dernier bain désorbant contient-il du Cd symplasmique ? (Y a-t-il vraiment redistribution ?).....	51
IV.2. La fraction apoplasmique échangeable mais non échangée pendant les 30 premières minutes de désorption, est-elle négligeable devant la fraction symplasmique ?	52
Chapitre 2. Mesure à court terme des paramètres cinétiques de l'absorption racinaire du Cd : fractionnement du Cd racinaire à l'azote liquide et confirmation des deux systèmes de transport membranaire.....	56
I. Matériels et méthodes.....	56
I.1. Culture des plantes et exposition au Cd radiomarké.....	56
I.2. Fractionnement des isothermes d'absorption à l'azote liquide	57
I.3. Dosage du Cd	57
I.4. Analyse de données	58
II. Résultats.....	58
II.1. Fractionnement du Cd racinaire par la méthode à l'azote liquide.....	58

II.1.1. Les cinétiques de désorption issues du protocole du fractionnement du Cd racinaire.....	58
II.1.2. Quantification des fractions apoplasmique et symplasmique.....	60
II.2. Parts relatives des fractions apoplasmique et symplasmique.....	63
II.3. Isothermes d'adsorption du Cd sur les parois des racines	63
II.4. Isothermes d'absorption symplasmique.....	67
III. Discussion.....	70
III.1. L'influx apoplasmique	70
III.2. Le système de transport à forte affinité.....	70
III.3. Le système de transport à faible affinité	71
Chapitre 3. Comparaison entre les différentes méthodes de mesure des paramètres cinétiques	73
I. Comparaison entre nos deux méthodes de fractionnement	73
II. Evaluation des paramètres cinétiques à partir des isothermes d'absorption : comparaison entre la méthode de fractionnement à l'azote liquide et la méthode utilisée dans la littérature	73
Chapitre 4. Modélisation du prélèvement racinaire avec les paramètres mesurés précédemment	78
I. Description du modèle de prélèvement	78
II. Simulation par le modèle RUSE des prélèvements de Cd des deux plantes	79
III. Discussion.....	83
Partie 3. Etude de paramètres susceptibles d'influer sur la cinétique de l'absorption racinaire	85
Chapitre 1. Influence de certains cations divalents sur l'influx net de Cd dans les racines	85
I. Matériels et Méthodes	85
I.1. Influence des ions de la solution externe sur la vitesse de prélèvement racinaire de Cd.....	85
I.1.1. Influence de la concentration en Ca et du pH.....	86
I.1.2. Effet des cations divalents sur la vitesse de prélèvement du Cd par les deux systèmes de transport.....	86
I.2. Statistiques	87
II. Résultats.....	87
II.1. Influence de la concentration externe en Ca	87
II.2. Influence du pH sur l'influx net de Cd dans les racines	88
II.3. Effet des cations divalents sur la vitesse de prélèvement du Cd par les deux systèmes de transport	88
II.3.1. Effet des cations divalents sur le HATS.....	88
II.3.2. Effet des cations divalents sur le LATS	89
III. Discussion.....	89
Chapitre 2. Régulation de l'influx net de Cd dans les racines : effet de la teneur en Cd dans la plante entière	93
I. Matériels et méthodes.....	94
I.1. Culture des plantes.....	94
I.2. Cadmium total dans les plantes	94

I.3.	Caractérisation du prélèvement racinaire.....	95
I.4.	Statistiques	95
II.	Résultats.....	96
II.1.	Accumulation de Cd stable pendant la culture	96
II.2.	Exposition courte au Cd marqué après culture dans les trois niveaux de contamination	98
II.3.	Après la culture dans 0,1 μM Cd.....	99
II.4.	Après la culture dans 10 μM Cd.....	99
III.	Discussion.....	99
III.1.	Accumulation du Cd pendant la culture.....	102
III.2.	Régulation symplasmique	102
III.2.1.	Après une exposition chronique à une faible concentration (0,1 μM).....	102
III.2.2.	Après une exposition chronique à une forte concentration (10 μM)	103
III.2.3.	Conclusion sur la régulation de l'influx symplasmique	103
III.3.	Régulation apoplasmique	103
IV.	Conclusion	105
Chapitre 3.	Influence de l'architecture et de l'anatomie racinaires sur l'absorption du Cd par les racines de maïs.....	107
I.	Matériels et méthodes.....	108
I.1.	Cultures en hydroponie, aéroponie et sol.....	108
I.2.	Analyse de la morphologie et de l'anatomie racinaires	108
I.2.1.	Observation macroscopique.....	108
I.2.2.	Anatomie racinaire	109
I.3.	Cinétiques d'épuisement et compartimentation du Cd	110
I.3.1.	Cinétiques de prélèvement du Cd	110
I.3.2.	Fractionnement du Cd	110
II.	Résultats.....	111
II.1.	Cinétiques de prélèvement et compartimentation du Cd racinaire	111
II.2.	Observations morphologiques et anatomiques.....	114
II.2.1.	Morphologie racinaire	114
II.2.2.	Anatomie racinaire	115
III.	Discussion.....	117
III.1.	Poils absorbants et prélèvement racinaire de Cd.....	117
III.2.	L'architecture, les apex racinaires et l'absorption de Cd.....	118
III.3.	Fractionnement du Cd et structure anatomique des racines.....	118
III.4.	Paramètres cinétiques et choix du mode de culture du matériel végétal	120
III.5.	Y a-t-il des conséquences sur la translocation vers les parties aériennes ?...	121
IV.	Conclusion	122
Conclusion générale		123
Annexe		126
1)	Y a-t-il efflux membranaire pendant la désorption, malgré la concentration de la solution de désorption en Ca et en Cd ?.....	126
2)	Y a-t-il réabsorption du Cd radioactif désorbé des parois, malgré la température glacée du bain-marie ?	127
3)	Conclusion sur la validité du protocole	128
Références bibliographiques.....		130

Liste des figures	140
Liste des tableaux	146

Liste des Publications et Communications

- **Publications dans des revues internationales**

Redjala T., Sterckeman T., Morel JL., 2009

Cadmium uptake by roots: Contribution of apoplast and of high- and low-affinity membrane transport systems Environmental and Experimental Botany, 67(1):235-242

Redjala T., Sterckeman T., Skiker S., Echevarria G., Morel JL., 2010

Contribution of apoplast and symplast to short term nickel by maize and *Leptoplax emarginata* roots. Environmental and Experimental Botany, 68 (1):99-106

Redjala T., Sterckeman T., Morel JL., 2010

Determination of the different components of cadmium short-term uptake by root. Journal of Plant Nutrition and Soil Sciences, 173(6): 935-945.

Redjala T., Zelko I., Sterckeman T., Morel JL., 2011

Relationship between root structure and root cadmium uptake in maize. Environmental and Experimental Botany, 71: 241-248

Sterckeman T., **Redjala T.**, Morel JL., 2011

Influence of exposure solution composition and of plant cadmium content on root cadmium short-term uptake. Environmental and Experimental Botany, 74: 131-139

- **Communications lors de Conférences Internationales**

Redjala T., Sterckeman T., Morel JL.

Low-affinity transport system for Cd absorption by maize roots. COST 859 (European Co-Operation in the field of Scientific and Technical research), Slomenice (Slovaquie), Mai 2008. Résumé et Poster

Sterckeman T., **Redjala T.**, Skiker S., Echevarria G., Morel JL.

Nickel root uptake: contribution of apoplastic and symplastic pathways. COST 859, Slomenice (Slovaquie), Mai 2008. Résumé et Présentation orale

Redjala T., Sterckeman T., Morel JL.

Cd absorption by maize roots as affected by root structure. Rhizosphere 2, Montpellier, Septembre 2007. Résumé et Poster

Redjala T., Sterckeman T., Morel JL.

Checking the relevance of Michaelis-Menten function for modelling of root cadmium uptake. 9th ICOBTE (International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements), Beijing (China), Juillet 2007. Résumé et Poster

Redjala T., Sterckeman T., Morel JL.

Cadmium uptake by roots: assessing the contributions of cell walls and low-affinity membrane transport system. 10th ICOBTE, Chihuahua (Mexico), Juillet 2009. Résumé accepté pour une présentation orale.

Redjala T., Sterckeman T., Morel JL.

Effect of plant internal cadmium status on root cell walls uptake and symplastic absorption. XVI IPNC (International Plant Nutrition Colloquium), Sacramento (California, USA), Août 2009. Résumé accepté dans le journal Proceedings of the IPNC XVI. Présentation orale.

Préambule

Les plantes représentent le premier maillon de la chaîne alimentaire terrestre, et constituent un vecteur de la contamination de l'Homme et des animaux en éléments en traces métalliques (ETM). C'est pourquoi il est indispensable de pouvoir évaluer les risques de transfert sol-plante des ETM, pour pouvoir réduire les flux vers les parties consommées des végétaux, et de répondre aux exigences de santé publique. En outre, c'est également la capacité à prévoir les flux d'ETM vers les parties aériennes qui permettra de piloter des cultures d'espèces utilisées pour dépolluer les sols contaminés. Pour pouvoir construire des outils de prévision des quantités accumulables par la plante, il est nécessaire de comprendre les mécanismes de transfert du métal du sol vers la plante.

Cette thèse s'inscrit dans le développement d'un modèle pour la gestion des sols contaminés par les ETM, avec le double objectif de réduire les risques grâce à la phytoextraction. L'étude est focalisée sur un élément modèle, le cadmium (Cd). Cet élément a été choisi pour plusieurs raisons. Premièrement, il s'agit d'un des éléments les plus préoccupants du fait de sa forte toxicité pour les végétaux, les animaux et les Humains ; en effet, il constitue, avec le Pb, l'un des rares éléments dont la teneur dans l'alimentation humaine soit réglementée (Byrne, 2001). Les contaminations qu'il cause sont nombreuses, à la fois dans les domaines agricole, urbain et industriel. Aussi, le Cd est intéressant à étudier étant donnée sa bonne représentativité du comportement physico-chimique de divers cations polluants. Enfin, nous avons choisi de l'étudier en raison également de son caractère non essentiel pour les plantes, ce qui suppose des mécanismes différents de ceux développés pour les nutriments métalliques tels que le Zn et le Cu.

La prévision des flux des ETM du sol vers la plante peut être envisagée en partant d'une formalisation mathématique décrivant les mécanismes élémentaires régissant ces flux. C'est le principe des modèles mécanistes. Les mécanismes et les facteurs de l'absorption du cadmium (Cd) par les racines des plantes supérieures sont méconnus. L'objectif scientifique de ce projet de recherche est de décrire au mieux cette absorption, pour pouvoir avancer vers une modélisation des flux à la surface de la racine en tenant compte d'un certain nombre de facteurs environnementaux ou intrinsèques à la plante.

Deux plantes modèles seront utilisées. Le tabouret calaminaire (*Noccaea caerulescens* J&C Presl, anciennement appelée *Thlaspi caerulescens* J&C Presl) est un hyperaccumulateur de

Cd. Le maïs (*Zea mays* L.) sera représentatif des plantes à vocation alimentaire et à faible prélèvement en Cd.

Le mémoire s'articule en trois parties. Premièrement, le document fait un état des lieux des connaissances sur le prélèvement racinaire des cations, et des ETM en particulier. C'est sur cette analyse bibliographique que se basera la démarche scientifique de la thèse.

Les parties 2 et 3 contiennent les chapitres correspondant aux différentes expérimentations réalisées. En raison des résultats contradictoires présents dans la littérature, la partie 2 s'attachera à lever le doute sur la formalisation mathématique de la fonction d'absorption de Cd. En effet, les travaux antécédents ne sont pas parvenus à distinguer précisément le Cd apoplasmique du symplasmique, ce qui biaise la mesure des quantités réelles de Cd qui entrent dans le milieu intracellulaire ; c'est pourquoi nous nous intéresserons en particulier à décrire l'absorption du Cd dans le milieu intracellulaire (le symplasme) et à caractériser la sorption et la diffusion du métal dans le compartiment extracellulaire des racines (l'apoplasme). Les paramètres obtenus seront ensuite intégrés dans le modèle pour une simulation du prélèvement de la plante. L'écart entre la simulation du modèle et les quantités accumulées mesurées en pots, amènera la partie suivante. La partie 3 se concentrera sur les facteurs susceptibles d'avoir un effet significatif sur la fonction d'absorption, et d'expliquer l'écart entre le modèle et la réalité. Seront étudiés des facteurs jusque-là jamais pris en compte dans la modélisation du prélèvement racinaire des éléments : la composition ionique de la solution d'exposition au Cd, le statut de la plante en Cd avant la mesure des flux d'absorption, et les caractéristiques anatomiques des racines au moment de l'absorption du métal. Autant de facteurs susceptibles d'avoir un effet significatif sur les valeurs des paramètres cinétiques d'absorption.

La conclusion générale fera le point sur les directions que devraient prendre les recherches pour améliorer la simulation du transfert sol-plante du Cd.

Partie 1. Que sait-on du transfert sol-plante du Cd ?

Chapitre 1. Le Cd, un danger pour la chaîne alimentaire

I. Un élément naturel hautement toxique

I.1. Un élément en trace métallique (ETM)

Le Cd fait partie des éléments en traces métalliques (ETM) les plus couramment rencontrés, avec Cr, Cu, Hg, Pb et Zn. Ce sont des composants naturels de la planète, mais leur concentration dans le sol a significativement augmenté en raison de l'activité humaine (Nriagu et Pacyna, 1988).

Les ETM sont répertoriés dans des classes (Foulkes, 2000). La classe A est représentée par le fer, qui est essentiel pour la vie en concentrations relativement élevées. La classe B contient les métaux qui n'ont aucun rôle biologique connu, et qui ne montrent pas (ou que peu) de toxicité vis-à-vis des êtres vivants (lanthanum, strontium...). La classe C réunit les éléments métalliques qui en traces sont essentiels à certains êtres vivants, mais dont la toxicité devient très forte en concentrations plus élevées. Enfin, le cadmium appartient à la classe D, à savoir les ETM qui sont toxiques même à des niveaux faibles, et qui n'ont pas de fonction biologique connue. Le mercure, le plomb et l'uranium en font également partie.

I.2. Un élément du sol mobile et dangereux

Comme tous les ETM, le Cd peut être une source de risque pour l'environnement. En s'accumulant dans la chaîne alimentaire, il représente un danger pour la santé de tous les êtres vivants, depuis les végétaux jusqu'à l'homme. Le Cd est d'ailleurs l'un des métaux les plus toxiques de la planète vis-à-vis de l'environnement (Basic et Besnard, 2006).

Les concentrations de Cd dans le sol varient entre 0,1 et 345 mg.kg⁻¹ (Lasat, 2000). Dans les sols non pollués, il est présent à des taux compris entre 0,1 et 0,5 mg.kg⁻¹ (Schutzendubel et Polle, 2002; Wang *et al.*, 2006). Mais il arrive que des sols soient naturellement riches en Cd (jusqu'à 3 mg.kg⁻¹) en raison de la composition de la roche mère (Wang *et al.*, 2006). La contamination est considérée modérée lorsqu'elle varie entre 1 et 5 mg.kg⁻¹.

Environ 90% des émissions anthropogéniques d'ETM ont eu lieu après 1900. Par conséquent, il est reconnu que les activités humaines mènent à une accumulation substantielle d'éléments métalliques en traces dans les sols à l'échelle planétaire (Vassilev *et al.*, 2002). Au siècle dernier, le sol a connu une accumulation remarquable de Cd suite aux dépôts atmosphériques

issus des activités industrielles (mines de zinc), à l'utilisation du Cd dans la production d'énergie (piles) et à l'épandage de déchets, de fertilisants, de chaux et de produits phytosanitaires ; de plus, étant donnée la forte solubilité du Cd dans l'eau, cette contamination est aggravée par l'irrigation, les inondations et les eaux d'infiltration (Yanai *et al.*, 2006). Les émissions anthropogéniques de Cd ont été estimées à 30 000 tonnes par an (Schutzendubel et Polle, 2002; He *et al.*, 2005). Ainsi, à l'aube du 21^{ème} siècle, la plupart des sols agricoles dans le monde sont légèrement à modérément contaminés en Cd, suite à l'épandage de boues de stations d'épuration et au dépôt de poudres de fonderie (Kaschl *et al.*, 2002; Vassilev *et al.*, 2002). La contamination des sols en Cd constitue un problème très inquiétant pour les surfaces agricoles et les eaux souterraines, et par conséquent pour la santé humaine et animale.

I.3. La toxicité du Cd pour la chaîne alimentaire

Tout d'abord, cette contamination a probablement un effet néfaste sur l'activité microbienne, la biodiversité et la fertilité du sol. Ces dégâts peuvent causer ensuite des pertes de rendement de productions agricoles, et des dégâts sur la santé animale et humaine. Ensuite, si le Cd est transloqué des racines vers les parties comestibles des plantes, il peut empoisonner à la fois les animaux et les humains qui les consomment. De plus, des niveaux élevés de Cd dans le sol sont phytotoxiques, d'où non seulement une faible croissance et des pertes de rendement, mais également un couvert végétal pauvre à l'origine de la mobilisation du métal dans les eaux de ruissellement. Il faut encore ajouter qu'un couvert végétal pauvre générera un sol nu qui s'érodera facilement et favorisera ainsi la dispersion de la contamination dans l'air via les particules de sol (Lasat, 2000).

Le Cd est hautement toxique pour tous les êtres vivants (Kaschl *et al.*, 2002), en particulier à cause de sa capacité à détruire les membranes (Aravind et Prasad, 2005). Le Cd constitue un risque certain pour le Vivant, d'autant plus depuis l'industrialisation et les pratiques agricoles développées par les hommes au siècle dernier. Le danger vient également de la capacité du Cd à traverser les membranes et à pénétrer ainsi dans les organismes (Foulkes, 2000). Itai-Itai est le syndrome le plus connu qui découle directement d'une intoxication au Cd ; c'est aussi la forme la plus sévère d'empoisonnement chronique au Cd, avec des dégâts ou des dysfonctions des reins, des déformations douloureuses voire des fractures des os et même des cancers (Inaba *et al.*, 2005). Cette maladie touche en particulier le Japon, où 50 à 70% du Cd ingéré par voie orale provient du riz ; une preuve affligeante du lien existant entre la maladie et le riz

contaminé au Cd. En effet, le sol agricole s'avère contaminé par des effluents provenant de mines de zinc en amont des rivières. L'intoxication massive des consommateurs du riz incriminé n'est pas surprenante lorsqu'on sait qu'une concentration aussi faible que $0,1 \mu\text{M}$ dans l'organisme suffit à causer des dysfonctions rénales. Aussi, il a récemment été découvert que le Cd peut agir comme un œstrogène, provoquant des anomalies allant de l'hyperplasie de l'utérus jusqu'à une précocité de la puberté, à des doses comprises entre 5 et $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ (He *et al.*, 2005). En outre, il faut ajouter que la demi-vie du Cd dans le corps humain est extrêmement longue (environ 30 ans), ce qui augmente son pouvoir de toxicité (Hinkle *et al.*, 1987).

La source majeure d'ETM dans les plantes est le prélèvement direct des contaminants dans le sol contaminé (Basic *et al.*, 2006). Le Cd est absorbé par les racines car il serait très mobile dans le sol (Kaschl *et al.*, 2002). Bien que le Cd ne soit ni essentiel ni bénéfique pour les plantes, les tissus végétaux contiennent généralement des concentrations de Cd qu'il est possible de mesurer (Wojcik *et al.*, 2005). Deux types de plantes contaminées en Cd peuvent avoir des effets considérables sur les humains : les plantes directement comestibles (légumes, récoltes) et les plantes consommées par le bétail (fourrage). Le Cd n'étant pas dégradable, il peut passer d'un organisme à un autre à travers la chaîne alimentaire, et causer des dommages chez l'être humain (He *et al.*, 2005).

Le Cd est également toxique pour les plantes elles-mêmes, même à des concentrations faibles. Pour la plupart des plantes, une teneur foliaire en Cd de 5 à 30 g kg^{-1} MS est considérée comme toxique (Wojcik *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'entrée du Cd dans la plante peut aussi réduire l'absorption d'eau et de nutriments, causant des symptômes tels que des chloroses, une inhibition de la croissance, un brunissement des apex racinaires, une suppression de l'élongation racinaire et enfin la mort (Schutzendubel et Polle, 2002). L'accumulation et l'absorption du Cd cause des carences en fer(II) dans les racines par le biais de l'inhibition de l'enzyme Fe(III) réductase. Le Cd induit également la génération d'espèces oxygénées réactives (ROS) et induit des toxicités à l'intérieur de la cellule, d'où l'inhibition de croissance et l'arrêt de l'élongation racinaire. La toxicité du Cd chez les plantes ainsi que les défenses mises en place contre ce stress, ont été présentées de façon exhaustive (Benavides *et al.*, 2005).

II. Le Cd dans le sol et sa biodisponibilité à la surface racinaire

Les plantes prélèvent dans le sol, l'eau et les sels minéraux dont elles ont besoin pour satisfaire leurs besoins vitaux (croissance, défense, reproduction). Ce prélèvement dépend de nombreux facteurs, en particulier de la quantité totale de l'élément dans le sol, et de sa biodisponibilité.

II.1. Définition de la biodisponibilité des éléments nutritifs

Tous les ions minéraux sont liés à la fois à la phase solide et à la phase liquide du sol. Dans la phase solide, les ions positifs (dont fait partie Cd^{2+}) sont liés aux charges négatives présentées par les surfaces des argiles, des oxydes, et des particules organiques. Au niveau de la rhizosphère, le sol échange des ions avec la solution du sol, qui les échange à son tour avec les racines. Ce sont précisément les éléments présentant cette aptitude à passer dans la solution du sol, qui sont phytodisponibles, c'est-à-dire capables d'être absorbés par les racines. Cette biodisponibilité des ions dépend de leur spéciation ainsi que de nombreux autres paramètres, liés à la fois aux caractéristiques du sol et de la plante.

II.2. Facteurs influençant la biodisponibilité du cadmium pour la plante

La quantité d'élément en solution est régulée par divers équilibres physico-chimiques, principalement des équilibres de complexation et d'adsorption. On peut donc considérer les facteurs susceptibles d'influer sur la disponibilité de Cd comme ceux capables de modifier ces équilibres.

II.2.1. Facteurs liés au sol

La fraction de l'élément total que l'on trouve dans la solution du sol dépend de nombreux facteurs. Le pH est considéré comme étant le principal d'entre eux, car il affecte les mécanismes d'adsorption sur les particules de sol (Alloway, 1995). Lorsque le pH diminue dans le sol, la fraction de Cd dans la solution du sol augmente, augmentant ainsi la quantité de Cd disponible pour la plante : les ions H^+ sont plus attirés par les charges négatives des particules du sol, et déplacent ainsi le Cd et les autres ions (Alloway, 1995). Beaucoup d'études ont montré une corrélation négative entre le pH et le Cd accumulé dans la plante (Page *et al.*, 1981 ; Jackson et Alloway, 1991). Ce trait d'une phytodisponibilité du Cd qui diminue lorsque le pH augmente a récemment été confirmé sur l'hyperaccumulateur Ganges

de l'espèce *Thlaspi caerulescens* (Roosen *et al.*, 2003) : les concentrations de Cd dans la plante atteignaient 236 mg kg^{-1} à pH 5,1 et ne dépassaient pas 121 mg kg^{-1} à pH 6,1.

Les autres facteurs de disponibilité du Cd dans la solution du sol sont étroitement liés à la structure et à la composition du sol : sa teneur en argiles, en oxydes de Fe et de Mn, le type et la quantité de colloïdes humiques, les ligands complexants et les intrants (McLaughlin et Singh, 1999).

Aussi, le statut du sol en métaux peut favoriser la phytodisponibilité du Cd. Par exemple, il peut y avoir une adsorption préférentielle d'autres métaux sur les particules du sol, favorisant ainsi la concentration du Cd dans la solution du sol (Adriano, 1986). La concentration en Zn, Pb, Cu et Ni dans le sol se sont avérées affecter le prélèvement du Cd par les plantes (Abdel-Sabour *et al.*, 1988 ; Cataldo, 1988). Par exemple, un déficit en Zn serait responsable d'une altération du fonctionnement membranaire, causant l'augmentation du prélèvement de Cd (Oliver *et al.*, 1994) dans les grains de blé.

II.2.2. Facteurs liés à la plante

La plante elle-même peut altérer la disponibilité des éléments de la rhizosphère, en modifiant les équilibres chimiques à la surface de ses racines ; ces modifications varient d'une espèce à l'autre, mais également au sein de la même espèce (Foster 1978). En effet, les racines excrètent des exsudats racinaires capables d'altérer les conditions rhizosphériques et d'augmenter ainsi la disponibilité des nutriments : ces exsudats peuvent acidifier la rhizosphère, favoriser la chélation des ions via des acides organiques ou d'autres phytométallophores (Welch, 1995), mais également altérer le potentiel redox de la rhizosphère par le biais de composés phénoliques (Mench et Martin, 1991). En outre, les exsudats racinaires peuvent indirectement affecter non seulement l'activité microbienne dans la rhizosphère, mais également les propriétés physiques de la rhizosphère et la croissance racinaire. Autant de paramètres importants pour la disponibilité des éléments. Le rôle des exsudats racinaires dans l'acquisition des métaux est remarquable. Ils peuvent mobiliser, voire fixer les ETM (Mench *et al.*, 1985). En particulier, les exsudats du maïs mobilisent le Cd (Morel *et al.*, 1986).

Chapitre 2. Le Cd dans la plante

I. Différents types de plantes selon leur comportement vis-à-vis du Cd

Le Cd serait absorbé par les plantes en raison de sa ressemblance avec d'autres cations. Cependant, tous les végétaux ne se comportent pas de la même manière face au stress occasionné par le Cd présent dans le sol. En effet, ils diffèrent en termes de tolérance et de résistance au Cd, et bien sûr quant à l'accumulation et à la distribution du métal dans leur organisme. Par exemple, le tabouret calaminaire est capable d'accumuler dans ses parties aériennes plus de $4,2 \text{ kg Cd ha}^{-1}$ (McGrath *et al.*, 2006), alors que le maïs est connu pour ne pas accumuler plus de $0,05 \text{ kg Cd ha}^{-1}$ dans ses parties aériennes (Chaney *et al.*, 2000).

Les plantes peuvent montrer trois réponses face à une croissance dans des sols contenant des concentrations potentiellement toxiques en ions métalliques : un prélèvement racinaire incontrôlé, une exclusion, ou une (hyper)accumulation (Baker, 1981) ; le prélèvement incontrôlé se solde systématiquement par une intoxication puis la mort (Callahan *et al.*, 2006).

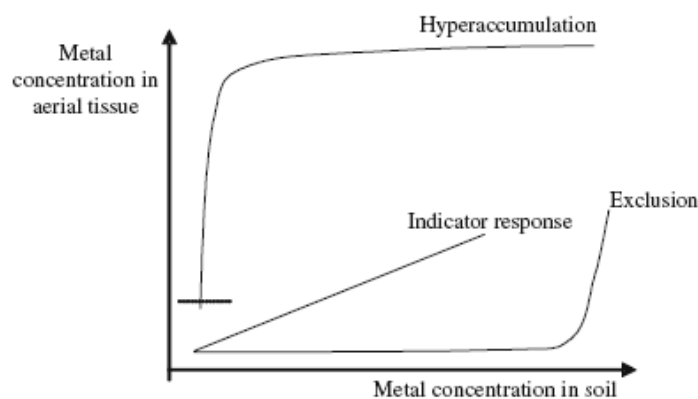


Figure 1-1. Conceptualisation de la réponse des plantes poussant dans des concentrations croissantes en métal (Baker, 1981)

Les plantes excluantes ne transloquent pas les contaminants métalliques dans leurs parties aériennes. Cette caractéristique leur permet de croître sur des sols dont la toxicité empêche la majorité des plantes de se développer. Les plantes indicatrices présentent des teneurs

proportionnelles à la concentration du métal dans le sol. Les plantes accumulatrices montrent souvent de fortes concentrations de métal dans leurs parties aériennes.

Les hyperaccumulateurs (Brooks *et al.*, 1977) sont des espèces capables d'accumuler des métaux dans des concentrations 100 fois plus élevées que celles mesurées dans les parties aériennes des plantes non accumulatrices, sans montrer de symptômes de toxicité ; ces concentrations sont de 10 mg kg⁻¹ pour le Hg, 100 mg kg⁻¹ pour le Cd, 1000 mg kg⁻¹ pour le Co, le Cr, le Cu ou le Pb, 10 000 mg kg⁻¹ pour le Zn ou le Ni (Brooks *et al.*, 1998 et Baker *et al.*, 2000, dans McGrath *et al.*, 2002). Un autre critère du trait hyperaccumulateur est le ratio de concentrations métalliques entre les parties aériennes et racinaires, qui doit être supérieur à 1 (Baker *et al.*, 1994 ; Shen *et al.*, 1997, dans McGrath *et al.*, 2001). La plupart des espèces connues de plantes accumulatrices appartiennent à la famille des Brassicacées (Kumar *et al.*, 1995 dans Belimov *et al.*, 2005). Jusqu'à présent, seules trois espèces observent ces deux critères de l'hyperaccumulation du Cd. Il s'agit de trois Brassicacées : *Thlaspi caerulescens* (Brooks, 1998) ou tabouret calaminaire, *Thlaspi praecox* (Vogel-Mikus *et al.*, 2005) et *Arabidopsis halleri* (Bert *et al.*, 2000 ; Bert *et al.*, 2002).

Si les hyperaccumulateurs de métaux semblent présenter un trait constitutif à l'échelle de l'espèce, l'hyperaccumulation est en revanche spécifique au métal. Par exemple, l'hyperaccumulation du Zn chez le tabouret calaminaire semble être un trait constitutif de l'espèce, tandis que le Cd est significativement moins hyperaccumulé que le Zn dans cette espèce (Reeves *et al.*, 2001). Ainsi, différentes populations de la même espèce présentent des capacités d'accumulation de métaux significativement différentes, ce qui procure un matériel végétal approprié pour l'étude des mécanismes d'hyperaccumulation (Deng *et al.*, 2007).

Les plantes hyperaccumulatrices sont en général trouvées sur des sites métallifères.

II. Facteurs influençant le prélèvement du Cd biodisponible par les végétaux

II.1. La composition ionique de la solution du sol

Précédemment, nous avons vu que les ions en solutions peuvent influencer significativement la disponibilité du Cd en solution. Mais la composition ionique de la solution du sol constitue également un facteur de taille dans le prélèvement du Cd de la solution. La littérature a rapporté en particulier des interactions entre les cations et le prélèvement de Cd par les racines. L'influx de Cd serait sensible à certains cations monovalents (K, NH₄, Na) (Lindberg *et al.*, 2004), mais ce sont les cations divalents qui interagissent le plus avec l'entrée du Cd dans la plante. Par exemple, une déficience en Zn va promouvoir l'absorption de Cd tandis

qu'une forte teneur en Ca réduira le prélèvement du Cd. Aussi, des métaux comme le Cu et le Pb, pour lesquels les parois racinaires ont plus d'affinité que pour le Cd, auront tendance à entrer en compétition avec le prélèvement du Cd.

II.2. Facteurs intrinsèques à la plante

Les espèces végétales diffèrent par leur demande en Cd, et des variétés (ou écotypes) de la même espèce) peuvent présenter des facultés de prélèvement très contrastées. C'est le par exemple des écotypes Gange et Prayon du tabouret calaminaire : Gange hyperaccumule le Cd mais pas Prayon (Zhao *et al.*, 2002). L'âge de la plante joue un rôle dans la mesure où le système racinaire âgé ne présente pas du tout les mêmes caractéristiques que le système racinaire jeune. D'une part, la CEC est d'autant plus faible que la racine vieillit (Mane *et al.*, 1970). D'autre part, les zones matures de la racine présentent des cellules différenciées, alors que celles-ci ne le sont pas encore dans les zones immatures, à savoir l'apex racinaire.

La morphologie du système racinaire peut également jouer un rôle fondamental dans le prélèvement du Cd. Par exemple, il a été montré que les racines de tabouret calaminaire se densifient dans le sol au niveau de patches de métaux ; il est certain que la demande importante de la plante hyperaccumulatrice entraîne une ramification intense dans les zones riches en métaux (Schwartz *et al.*, 1999). En effet, comme nous le verrons dans le chapitre suivant, ce sont justement les apex racinaires qui seraient les principaux acteurs de l'absorption du métal.

Le stade phénologique contrôle aussi le prélèvement du Cd dans la mesure où la demande de la plante en Cd évolue selon le stade atteint. Enfin, le statut de la plante en Cd (ou quantité de Cd endogène) peut être à l'origine de mécanismes de régulation freinant ou au contraire stimulant le prélèvement du métal.

Chapitre 3. L'absorption racinaire du Cd et son transport dans la plante

I. L'absorption racinaire du cadmium

I.1. Structure des racines

La structure des racines affecte considérablement l'absorption de l'eau et des nutriments dont la plante a besoin. C'est pourquoi il est indispensable de la rappeler.

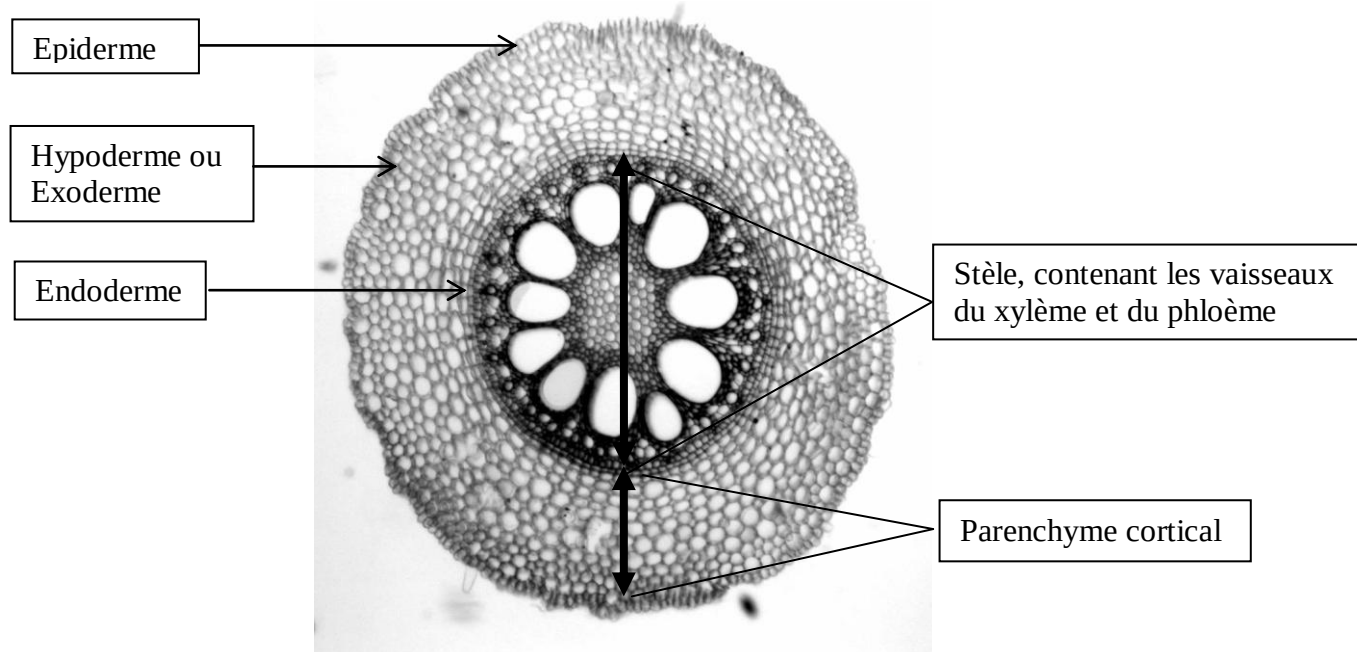


Figure 1-2. Coupe transversale de racine principale de maïs cultivé en hydroponie

L'épiderme et ses poils absorbants

L'épiderme est la couche cellulaire la plus externe des racines, en contact direct avec le sol. Il fonctionne comme une interface entre la plante et le sol. Les cellules épidermales ont souvent des projections étroites appelées poils racinaires, qui s'étendent entre les particules de sol. Ces poils racinaires peuvent être plus ou moins denses, voire inexistants (Peterson et Farquhar, 1996). Ils permettraient d'accroître la surface d'absorption et donc de favoriser l'absorption des nutriments. C'est une couche de cellules importante puisque sa position lui permet non seulement de prélever l'eau et les solutés, mais aussi d'assurer le rôle d'ancrage des racines dans le sol.

Le cortex

Le cortex comprend trois tissus, caractérisés par les modifications de leurs parois et par leur localisation en coupe transversale : l'exoderme, le cortex central et l'endoderme. Le cortex central contient toutes les couches cellulaires se trouvant entre l'endoderme et l'exoderme.

L'hypoderme ou exoderme est la couche de cellules se trouvant juste sous l'épiderme. Comme les cellules de l'épiderme, celles de l'hypoderme peuvent subir une maturation et porter alors le nom d'exoderme dès qu'apparaît le premier stade de maturation caractérisé par les cadres de Caspary.

Le cortex central est un tissu lâche formé de cellules parenchymateuses entre lesquelles se trouvent de nombreux espaces intercellulaires. Ces espaces sont remplis d'air même sous une pression hydrostatique positive. Lorsque l'exoderme est immature, le passage des ions de l'apoplasme vers le symplasme peut avoir lieu dans ces cellules corticales (Nagahashi *et al.*, 1974).

L'endoderme est une monocouche de cellules qui présente, à maturation, des bandes de Caspary ainsi que des lamelles de subérine. Cette subérine hydrophobe imperméabilise les parois de l'endoderme et contraignent ainsi l'eau et les solutés à traverser les membranes plasmiques pour parvenir aux vaisseaux de la stèle (Tinker et Nye, 2000). L'endoderme n'est pas mature dans l'apex et dans les zones de formation des racines latérales.

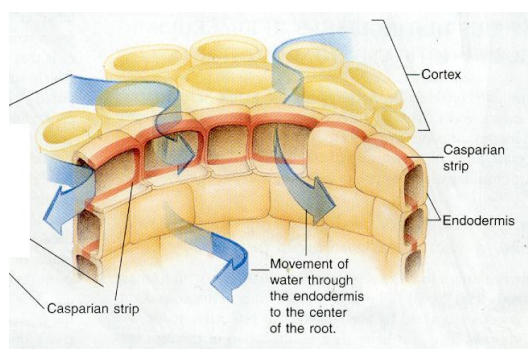


Figure 1-3. Illustration du premier stade de maturation de l'endoderme, avec l'apparition de cadres ou « bandes » de Caspary dans les parois radiales des cellules endodermiques (<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectf03am/casparian.htm>)

La stèle

La stèle contient le cylindre de tissus le plus interne. Elle contient le péricycle, le xylème, le phloème, ainsi que les cellules parenchymateuses associées. Le xylème fonctionne en conduisant l'eau et les solutés vers les parties aériennes, tandis que le phloème conduit les produits de la photosynthèse des parties aériennes vers les racines, en particulier vers les apex en croissance et les tissus d'accumulation des racines.

Les ions se déplacent dans un premier temps dans l'apoplasme, pour ensuite traverser la membrane plasmique et entrer dans le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, les ions peuvent passer d'une cellule à l'autre via les plasmodesmes (transport symplasmique), ou bien traverser le tonoplaste pour entrer dans la vacuole. C'est la combinaison du transport apoplasmique et symplasmique qui permet aux ions de se déplacer de la solution du sol vers la stèle.

I.2. La voie apoplasmique

L'apoplasme est constitué des parois des cellules ainsi que des espaces intercellulaires. Autrement dit, il s'agit de la "matrice extracellulaire" (Schindler *et al.*, 1993). D'un autre point de vue, c'est encore "l'environnement physiologique interne de la plante" (Sakurai *et al.*, 1998). En effet, les stimuli externes ne sont pas reçus directement par les cellules, mais via des échanges avec cet environnement interne (Hoson *et al.*, 1998).

Les parois sont constituées de trois couches se distinguant à la fois par leurs propriétés chimiques et physiques : la lamelle moyenne, la paroi primaire et la paroi secondaire. La lamelle moyenne est principalement composée de polysaccharides pectiques avec différents degrés de méthylation. Elle sert de colle entre les cellules adjacentes. La paroi primaire est un réseau de cellulose faiblement polymérisée, d'hémicellulose et de glycoprotéines. La paroi secondaire est formée de cellulose fortement polymérisée, d'hémicellulose et de relativement peu de protéines. Il s'agit de la paroi la plus interne, qui se dépose dans la paroi primaire une fois que l'élongation cellulaire a cessé.

Le mouvement des solutés est lié aux propriétés des différentes couches de l'apoplasme. Ce sont donc les propriétés des parois qui contrôlent la diffusion ionique dans l'apoplasme.

L'électronégativité des parois

En raison de la prédominance des groupes carboxyliques libres des acides galacturoniques présents dans la lamelle moyenne et la paroi primaire, la face externe des parois cellulaires est chargée négativement. Cette électronégativité exclut de l'apoplasme les ions chargés négativement (Marschner, 1995) tout en assurant l'accumulation des cations dans l'espace libre apparent (AFS). C'est pourquoi les ions Ca^{2+} s'accumulent particulièrement dans la lamelle moyenne. D'ailleurs, cette adsorption peut quelque peu restreindre l'entrée des cations dans le milieu intracellulaire. Ce flux de cations se réalise de façon passive, physique : la cinétique de ces cations dans l'apoplasme est contrôlée par la diffusion ainsi que par le flux

de masse gouverné par le flux de transpiration (Tinker et Nye, 2000). La fixation des cations sur les parois peut affecter non seulement l'acquisition des nutriments mais également la tolérance de la plante vis-à-vis de la toxicité de l'ion (Sattelmacher, 2001).

La CEC racinaire

Les anions immobiles des parois racinaires sont quantifiés par la Capacité d'Echange Cationique (CEC). Cette CEC exerce une influence sur le flux des espèces chargées dans la racine (Robson et Pitman, 1983). Elle est plus élevée chez les dicotylédones que chez les monocotylédones (Sattelmacher, 2001). Elle varie également selon l'espèce et selon l'âge de la racine : les zones jeunes ont une CEC plus élevée que les zones plus âgées (Mane *et al.*, 1970). Enfin, la CEC peut être affectée par divers paramètres environnementaux.

La porosité des parois cellulaires

Dans la paroi primaire comme dans la paroi secondaire, le réseau de cellulose et d'hémicellulose contient des espaces interfibrillaires et intermicellaires dont la taille varie entre 3,5 et 14 nm (Strugger et Peveling, 1961; Carpita *et al.*, 1979), ce qui montre que les parois ne représentent pas une barrière de diffusion majeure, même pour les molécules les plus grandes. Mais cette perméabilité peut être diminuée suite à des stress environnementaux comme la présence d'ions toxiques (Sattelmacher, 2001). En outre, la porosité des parois varie selon l'ontogénie et la différenciation cellulaire. En effet, les cellules de l'apex présenteraient des parois immatures, où les pores intermicrofibrillaires ne seraient pas encore formés, ce qui expliquerait l'imperméabilité de leurs parois aux ions (Cholewa, 2000) et aux colorants fluorescents (Enstone et Peterson, 1992). De même, les dépôts de subérine et de lignine lors de la maturation de l'endoderme et de l'hypoderme réduiraient la porosité des parois concernées. Le diamètre des pores dans les parois subérisées est encore mal renseigné. Les solutés de faible poids moléculaire (ions hydratés par exemple) ayant des diamètres ne dépassant pas quelques dixièmes de nanomètres, il est impossible que les ions soient sélectionnés par la taille en absence de barrières apoplasmiques. Les chélats volumineux sont par contre exclus. Ainsi, les métaux comme le Zn ou le Cu sont préférentiellement absorbés sous leur forme ionique plutôt que sous leur forme chélatée.

I.3. La voie symplasmique

Le symplasma est un continuum de cytoplasmes de cellules adjacentes, liés entre eux par des plasmodesmes. Ces plasmodesmes sont des structures dont le diamètre avoisine les 50 nm.

Chaque plasmodesme contient un « anneau » cytoplasmique d'un diamètre de quelques nm (3 à 6 nm), par lequel le transport symplasmique aurait lieu (Ding *et al.*, 1992).

Lors du mouvement radial des ions dans la racine, le transport transmembranaire des cations présents dans l'apoplasme peut avoir lieu au niveau des cellules de l'épiderme, de l'exoderme, du cylindre cortical et de l'endoderme (Nagahashi *et al.*, 1974).

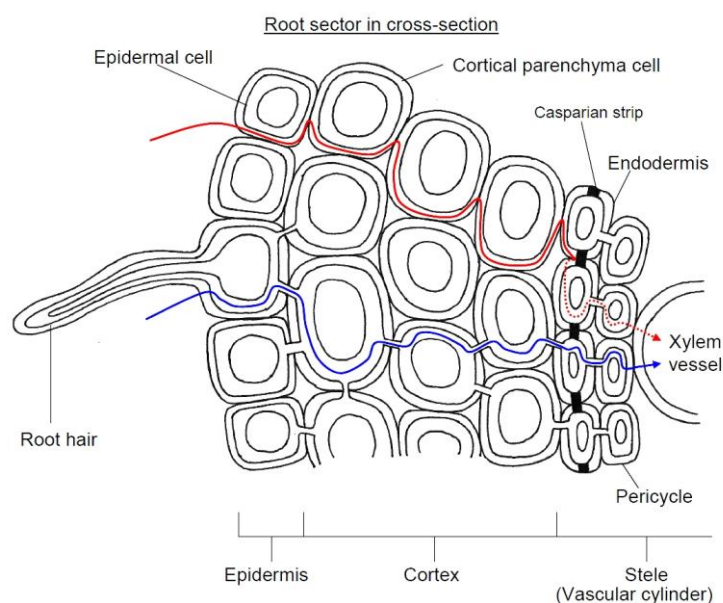


Figure 1-4. Schématisation des voies apoplasme et symplasmique pouvant assurer le transport d'un cation de la solution du sol jusqu'aux vaisseaux de la stèle (Taiz et Zeiger., 2010)

I.4. Description du mouvement radial

Les ions suivent un mouvement radial dans la racine, partant de la solution du sol vers les vaisseaux de la stèle. Ce mouvement est affecté par la structure anatomique des racines.

Dans les zones où l'exoderme est immature voire inexistant, les ions sont libres de parcourir un chemin apoplasme, d'abord dans l'épiderme puis dans le cortex. C'est alors seulement au niveau de l'endoderme que les cadres de Caspary bloquent le mouvement apoplasme des ions. Théoriquement, le passage des ions du compartiment apoplasme vers le compartiment symplasmique peut avoir lieu dans l'ensemble des cellules épidermiques, corticales et endodermes. Cependant, la localisation de ce prélèvement symplasmique peut varier considérablement, selon plusieurs facteurs. Parmi eux, la concentration de l'ion en solution, la vitesse de diffusion de l'ion dans les parois, et bien sûr

la vitesse d'absorption membranaire, cette dernière étant contrôlée par la présence et l'activité des protéines de transport membranaire.

En présence de bandes de Caspary dans l'assise exodermale, l'apoplasme accessible aux ions se réduit à l'apoplasme de l'épiderme et aux parois tangentielles externes de l'exoderme. En outre, si l'ensemble des cellules exodermales est subérisé, le passage des ions de l'apoplasme vers le cytoplasme sera restreint aux cellules de l'épiderme. Bien sûr, une fois dans le symplasme épidermique, les ions peuvent accéder au symplasme de l'ensemble du cortex puis à la stèle, en empruntant les plasmodesmes. Il est important de noter ici que dans le cas du maïs, les cellules de l'épiderme ne meurent pas suite à la maturation de l'exoderme, ce qui permet donc aux ions de pénétrer dans le cortex même dans les zones racinaires où l'exoderme est déjà mature.

La surface membranaire accessible (SMA) aux ions à partir de la solution du sol sera affectée par le développement de l'exoderme. Lorsque l'exoderme est encore immature, c'est-à-dire dans les zones jeunes proches de l'apex, toutes les membranes plasmiques des tissus à l'extérieur de l'endoderme mature, y compris celles bordant les parois tangentielles externes des cellules endodermales, sont disponibles pour le prélèvement des ions. Par exemple, dans le cas de l'onion, Kamula *et al.* (1994) estiment cette surface à 90,9 mm² par mm de longueur racinaire.

Dans une région plus âgée où l'exoderme présentera des bandes de Caspary, les membranes plasmiques de l'épiderme et celles en bordure des parois tangentielles de l'exoderme constitueront la seule surface membranaire disponible pour l'absorption des ions. En outre, le dépôt des lamelles de subérine réduira cette surface aux membranes de l'épiderme.

Ce mouvement radial est très dépendant à la fois de certaines caractéristiques de la plante elle-même, et de facteurs environnementaux.

1.4.1. Les facteurs inhérents à la plante

Le transport du cation de la solution de sol vers la stèle varie non seulement d'une espèce à l'autre, mais également selon la distance à l'apex. La CEC racinaire n'est pas la même d'une espèce à l'autre, et varie également selon l'âge de la racine, les parties les plus jeunes présentant une CEC plus élevée que les zones les plus âgées. Le prélèvement des éléments ne sera donc pas le même sur toute la longueur racinaire.

En outre, la structure anatomique des racines joue un rôle notable dans la vitesse de prélèvement des éléments puisqu'elle contrôle une part de la séquestration racinaire, ainsi que la surface membranaire accessible : en effet, l'apparition des barrières endodermes et exodermes réduit sensiblement le flux apoplasique des éléments, et par là-même la surface membranaire en contact avec le soluté. Étant donné que ces barrières gagnent en maturité (et en hydrophobicité) avec l'âge de la racine, les surfaces apoplasique et membranaires accessibles au soluté seront d'autant plus réduites que la zone racinaire considérée est âgée. Par conséquent, l'architecture racinaire va forcément influencer le prélèvement des éléments, puisqu'elle va contrôler la densité d'apex et donc la proportion de tissus jeunes capables d'absorber efficacement (plus forte CEC et meilleure accessibilité des surfaces apoplasique et membranaire). En outre, la plante peut réguler ses capacités d'adsorption et d'absorption en réponse à une situation de stress, une carence ou une intoxication par exemple.

I.4.2. Les facteurs environnementaux

La teneur de l'élément dans la solution du sol est bien sûr le premier facteur affectant la quantité prélevée par la plante. Le pH joue également un rôle non négligeable dans la mesure où le bon fonctionnement des racines dépend du pH du sol ; ainsi, un pH trop acide n'améliorera pas l'absorption d'un cation même si la solubilité de celui-ci est augmentée.

La composition de la solution du sol joue aussi un rôle non négligeable dans l'absorption racinaire d'un élément. En effet, il peut y avoir compétition pour les sites d'adsorption, résultant dans une diminution de l'influx de l'élément.

La transpiration contrôlant une part de l'absorption racinaire, le climat (température, humidité de l'air) représente donc un facteur important du prélèvement. Enfin, il faut également considérer les pratiques culturales (irrigation, nature du fertilisant, précédent cultural), qui vont modifier les facteurs cités ci-dessus.

II. Le transport du Cd dans la plante

Une fois prélevé par les racines, le Cd est dirigé vers les organes aériens : tiges, feuilles, fruits, grains, mais également racines. Pour ce, les cations doivent parvenir aux vaisseaux conducteurs de la stèle, au-delà de l'endoderme.

La force motrice du mouvement des solutés dans la sève brute est le flux de masse dû à la transpiration. Mais la forme sous laquelle le Cd est transporté est encore bien mal connue.

Plusieurs auteurs suggèrent que le Cd se déplace principalement sous forme d'ion Cd^{2+} (Petit & Van de Geijn 1978 ; Hardiman & Jacob 1984). D'autres suggèrent des formes de Cd complexées avec d'autres composés, comme les acides organiques, les acides aminés et les phytochélatines (Cataldo *et al.*, 1988 ; Senden *et al.*, 1995 ; Welch 1995). Le Cd a été trouvé dans les exsudats de plantules de riz, associés à la fraction acides aminés/peptides, suggérant qu'il pourrait être complexé à ces composés (Cataldo *et al.*, 1988). Le transport du Cd dans le xylème a également été associé à l'acide citrique. En effet, après ajout d'acide citrique aux racines de tomates, le prélèvement racinaire de Cd a seulement doublé tandis que son transport vers les parties aériennes a été multiplié par six (Senden *et al.*, 1995).

Chapitre 4. L'absorption du Cd à travers les membranes plasmiques

I. Le passage transmembranaire des éléments nutritifs

Il existe quatre voies essentielles de passage transmembranaire de l'eau et des autres molécules de petite taille. C'est le mode de transport ainsi que l'énergie à laquelle il est couplé, qui servent de base à la classification des systèmes de transport. On distinguera la diffusion (simple ou facilitée) qui assure un transport de la substance suivant son gradient électrochimique (transport passif), et le transport actif (primaire et secondaire) qui assure un transport contre le gradient électrochimique. Au cours de la diffusion simple, les substances traversent simplement la double couche de phospholipides. Dans le cas de la diffusion facilitée et des transports actifs, les substances empruntent des protéines de transport transmembranaires.

I.1. La diffusion simple

La diffusion simple permet aux ions d'être transportés suivant leur gradient, sans impliquer de protéine membranaire. Les substances peuvent traverser les membranes par diffusion simple à condition qu'elles puissent se dissoudre dans la double couche de phospholipides, c'est-à-dire à condition qu'elles soient hydrophobes. Le flux net (quantité en mouvement) est proportionnel à la différence de concentration de part et d'autre de la membrane, et à la perméabilité de celle-ci. Il n'y a pas de compétition possible entre différentes substances transportées par diffusion simple. La diffusion ne sature pas, ni avec la concentration, ni avec le gradient.

I.2. Les types de protéines de transport des éléments nutritifs

Le flux transmembranaire des molécules chargées et des ions est assuré quant à lui par des protéines transmembranaires appelées « protéines de transport ». Il s'agit de complexes protéiques capables d'assurer le passage des ions à travers la membrane. La grande diversité des protéines de transport permet à la plante de répondre à de nombreux besoins : fournir les systèmes de transport adéquats pour faire face aux différentes disponibilités des métaux dans le sol (systèmes de transport à forte affinité pour les métaux peu disponibles, et systèmes de transport à faible affinité pour les métaux fortement disponibles), répondre aux spécificités de transport des différents types de membranes (cellule ou organelle), et enfin répondre aux

différentes conditions de stress. Les protéines de transport peuvent être soit des « canaux », soit des « transporteurs ».

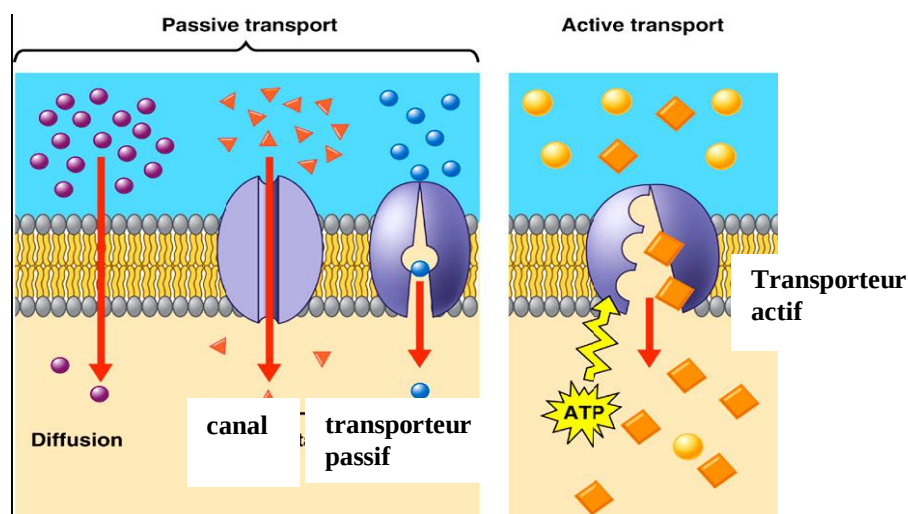


Figure 1-5. Illustration des transports membranaires passif et actif
<http://alenaimp.blogspot.fr/2012/03/diffusion-active-transport-and-osmosis.html>

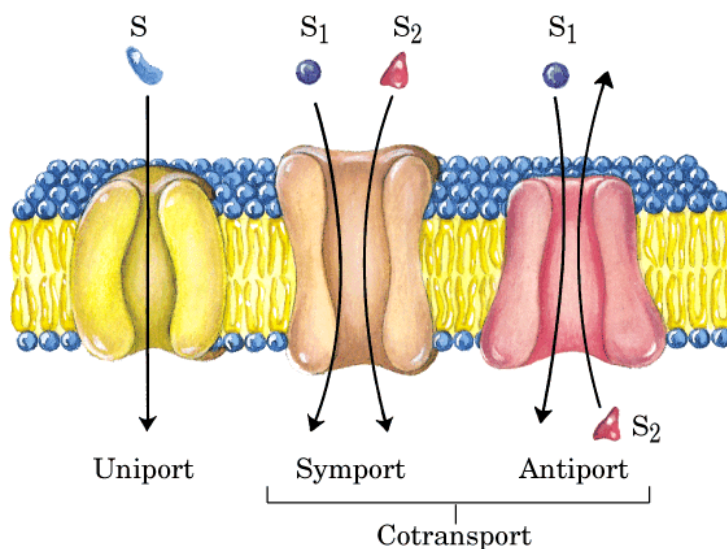


Figure 1-6. Illustration des trois types de transport membranaire actif : uniport, symport et antiport

I.3. Les canaux

Les *canaux ioniques* (ou pores protéiques) sont des protéines transmembranaires formant un canal et dont la lumière, chargée électriquement, est remplie d'eau. Les protéines-canal possèdent souvent une porte, et peuvent donc être ouverts ou fermés. La perméabilité du canal vis-à-vis de l'ion dépend de la nature et de la charge de l'ion, ainsi que de sa taille lorsqu'il est hydraté.

I.3.1. Les transporteurs

Le terme “*transporteur*” est le nom courant pour décrire les protéines membranaires montrant une spécificité relativement élevée, et dont les sites de fixation s’ouvrent alternativement de part et d’autre de la membrane. Parmi les transporteurs, on distingue les uniports, les symports et les pompes, qui seront décrits ultérieurement. Le mécanisme d’interaction entre le transporteur et le soluté est de type enzyme-substrat. La liaison du soluté induit un changement de conformation du transporteur, qui délivre alors le soluté de l’autre côté de la membrane. Le déchargement du soluté sur l’autre face membranaire met fin au transport et la protéine recouvre sa conformation originale, lui permettant de lier de nouveau du soluté (Hopkins, 2003).

I.3.2. Comparaison transporteurs / canaux

Les protéines membranaires (canaux ou transporteurs) peuvent assurer trois types de transport membranaire : la diffusion facilitée, le transport actif primaire et le transport actif secondaire ou indirect.

L’importance des transporteurs réside dans la sélectivité qu’ils présentent vis-à-vis du soluté qu’ils font entrer ou sortir de la cellule. En revanche, les canaux interviennent lorsque d’importantes quantités d’ions doivent traverser la membrane rapidement. En effet, un transporteur peut véhiculer de 10^4 à 10^5 molécules de soluté par seconde tandis qu’un canal peut laisser passer 10^8 ions par seconde.

I.4. La diffusion facilitée

Cette diffusion est facilitée par des canaux ou des transporteurs. Ce transport assure le flux des substances chargées suivant leur gradient. C’est un procédé énergie-indépendant, qui sature lorsque la substance atteint des concentrations élevées, en raison du manque de protéines disponibles. Les substances concernées peuvent entrer en compétition pour le même transporteur ou le même pore. On distingue les procédés uniport, symport et antiport. Un symporteur transporte deux substrats dans la même direction, tandis qu’un antiporteur transporte deux substances dans des directions opposées. Les symports et antiports sont deux exemples de cotransports.

La diffusion facilitée est assurée en particulier par des protéines de type Cation Diffusion Facilitator (CDF) et les ZRT, IRT-like Proteins (ZIPs). Tous les substrats des CDF sont des cations métalliques divalents dont le rayon ionique varie entre 72 (Zn^{2+}) et 97 (Cd^{2+}) pm. La

plupart des CDF sont des antiporteurs $\text{Me}^{2+}/\text{H}^+$ (K^+) qui catalysent l'efflux des métaux de transition, dont Zn, Co, Fe, Cd, Ni ou Mn, du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule ou bien vers l'intérieur des organites (références dans Montanini *et al.*, 2007).

I.5. Les transports actifs primaire et secondaire

Les transporteurs primaires (actifs) couplent leur processus de transport à une source d'énergie primaire, à savoir l'hydrolyse de l'ATP. De tels transporteurs sont également appelés « pompes ». C'est le cas des transporteurs ABC et des P-ATPases.

Les transporteurs actifs secondaires (ou transporteurs actifs indirects) sont des protéines similaires aux transporteurs de la diffusion facilitée, mais qui permettent le transfert d'un soluté contre son gradient, grâce à un transport couplé suivant le gradient. Leur force motrice réside dans l'énergie stockée dans le gradient électro-chimique du substrat couplé (par exemple, les H^+ produits par l'ATP-ase). Il s'agit d'antiports. On pense que les familles ZIP et Nramp fonctionnent comme des transporteurs secondaires, permettant le flux des molécules grâce au gradient de H^+ créé par l'hydrolyse de l'ATP. C'est le cas également de la famille des Low-Affinity Cation Transporters (LCT) (cotransport avec le Ca).

Les transports primaires et secondaires, ainsi que la diffusion facilitée, montreront un influx qui sature lorsque la concentration externe augmente, puisque leurs mécanismes se basent sur des complexes protéiques (canaux ou transporteurs). En effet, il y aura saturation lorsque la substance atteindra des concentrations élevées, en raison du manque de protéines disponibles. Cependant, étant donné que la voie des canaux est plus conductrice que celle des transporteurs, la saturation des canaux est certainement atteinte pour des concentrations ioniques supérieures à celles requises pour saturer des transporteurs.

II. Cinétiques d'accumulation et isothermes d'absorption membranaire du Cd

Des cinétiques d'absorption ont été réalisées pour caractériser le transfert du métal de la solution du sol vers les racines de plantes cultivées en hydroponie. L'entrée du Cd dans les racines est suivie à l'aide d'un marqueur radioactif, le ^{109}Cd . Des études similaires ont également été menées sur des protoplastes de manière à s'affranchir de la présence des parois. Deux types de courbes sont généralement représentés pour décrire l'absorption du métal par les cellules. Ces représentations graphiques du prélèvement du métal sont utiles à la fois pour

modéliser et pour comprendre les mécanismes mis en jeu à la surface de la racine. Ces courbes permettent d'une part de caractériser la perméabilité membranaire vis-à-vis du métal. Elles permettent également d'identifier les chemins empruntés par le métal pour traverser la double couche de phospholipides.

Le premier type de courbe décrit l'accumulation du métal dans les cellules au cours du temps. Le deuxième type de courbe représente la vitesse d'absorption (influx) du métal dans les cellules en fonction de la concentration dans la solution externe : c'est l'isotherme d'absorption. L'isotherme d'absorption peut s'obtenir de deux façons. A partir des courbes d'accumulation du Cd au cours de l'épuisement, il suffit de dériver la cinétique de prélèvement par rapport au temps et de la représenter en fonction de la concentration externe en solution (Zhao et al., 2002). La deuxième façon est celle des concentrations croissantes : des lots de plantes absorbent le métal dans différentes concentrations pendant une même durée et à concentration constante, puis l'influx est quantifié pour chaque plante et chaque concentration (Lombi et al., 2002). Dans ce cas, la durée d'exposition au Cd doit être suffisamment courte pour que l'influx net corresponde à un influx unidirectionnel (efflux négligeable).

Alors que les membranes des cellules animales sont directement en contact avec la solution externe, ce n'est pas le cas des cellules végétales. Premièrement, leurs parois ont une affinité très forte pour les métaux et qui agissent comme une barrière ralentissant le transfert des solutés de la solution vers les membranes ; deuxièmement, le compartiment apoplastique constitué par les parois cellulaires pourrait bien servir de voie de passage à l'eau et aux solutés jusque dans la stèle, sans traverser aucune membrane. Les cinétiques d'absorption sont donc difficiles à interpréter, puisqu'il est particulièrement difficile de distinguer le prélèvement dû aux parois du prélèvement dû à l'absorption membranaire. Il est important de signaler que l'adsorption des cations divalents dans l'apoplasme peut représenter une fraction substantielle de l'accumulation du métal par les racines, en particulier après des temps d'exposition courts et face à des concentrations en métal élevées (Marschner, 1995; Reid et Liu, 2004). Ajoutons que même les cellules animales sont capables d'adsorber le métal sur leurs membranes, obligeant les chercheurs à le désorber par des lavages dans l'EGTA, l'EDTA ou le même métal non marqué afin de ne pas surestimer l'influx transmembranaire (Endo, 2002 ; DelRaso *et al.*, 2003). La désorption du métal apoplastique est donc une étape indispensable.

Suite à l'exposition, la désorption des racines est réalisée par un échange isotopique ou un simple échange ionique. Un large excès de cation compétiteur (Cd^{2+} lui-même et/ou Ca^{2+}) ou un agent chélatant comme le DTPA parviennent à éliminer la phase curvilinéaire des cinétiques d'accumulation du Cd et du Zn (Homma et Hirata, 1984; Lasat *et al.*, 1996; Hart *et al.*, 1998; Harris et Taylor, 2004). Notons que l'étape de désorption s'effectue à température glacée pour éviter d'éventuels flux de Cd à travers les membranes cellulaires. La cinétique de désorption du Cd consiste en une très forte désorption de métal pendant les 10 premières minutes puis une saturation au bout de 15 à 30 min selon les conditions expérimentales.

Sans désorption, la cinétique d'accumulation présente deux phases, une curvilinéaire et l'autre linéaire. Après désorption des racines sacrifiées à chaque pas de temps, la phase curvilinéaire s'efface, laissant penser qu'il s'agit de l'adsorption du métal sur les parois, et que la durée de désorption suffit à désorber le métal apoplasmique.

Une fois l'étape de désorption effectuée, dont la durée varie de 15 à 30 minutes selon les travaux publiés, l'apoplasme racinaire n'est pas débarrassé entièrement du Cd : une fraction reste fortement attachée aux parois cellulaires (Cataldo *et al.*, 1983). Ceci est clairement démontré par des expérimentations sur des apoplasmes obtenus par un traitement au méthanol-chloroforme (DiTomaso *et al.*, 1992), qui mettent en évidence que le Cd adsorbé n'est pas complètement désorbé par l'étape de désorption glacée. Pour certains auteurs, cette fraction de Cd serait même non désorbable (Blaudez *et al.*, 2000).

Ainsi jusqu'à maintenant, les cinétiques d'absorption du Cd par les racines décrivent non pas le flux symplasmique mais la somme de prélèvements apoplasmique et symplasmique.

L'isotherme d'absorption que les auteurs ont coutume d'observer est soit saturante, soit curvilinéaire ; dans ce dernier cas, l'isotherme est systématiquement subdivisée en une composante saturante et une composante linéaire :

L'isotherme saturante est imputée au transport facilité par des pompes à protons ou à du cotransport, puisqu'elle s'ajuste à une cinétique michaélienne, qui correspond au mécanisme d'interaction de type enzyme-substrat : Les paramètres sont I_{max} (ou V_{max}) et K_m .

I_{max} est l'influx maximal.

K_m est la concentration de substrat (S) pour laquelle l'influx vaut la moitié de l' I_{max} . Il représente l'affinité du système racinaire pour l'ion.

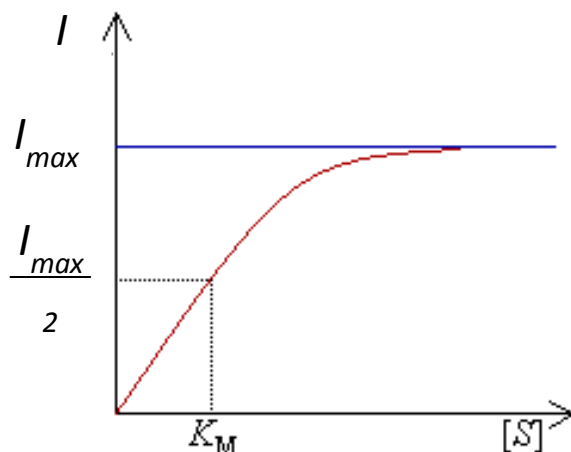


Figure 1-7. Illustration de l'isotherme d'absorption michaélienne

L'isotherme non saturante est considérée comme un reliquat de métal mal désorbé des parois racinaires.

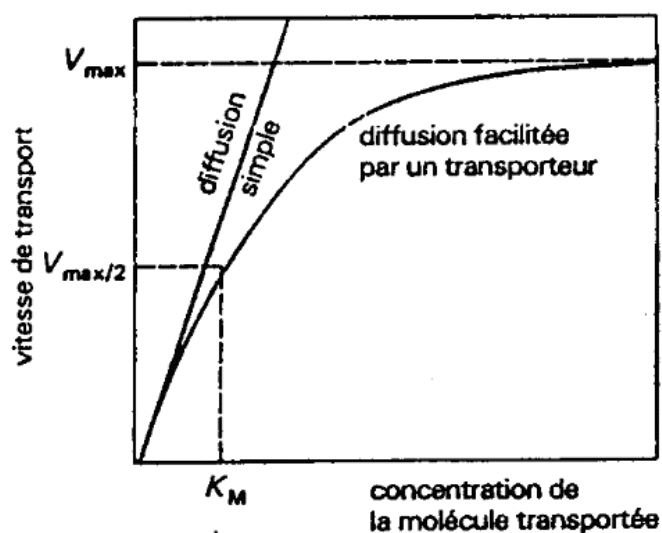


Figure 1-8. Isotherme d'absorption illustrant les deux types de cinétique d'absorption membranaire des cations. La cinétique linéaire traduit généralement un mécanisme de diffusion simple, tandis que la cinétique michaélienne met en évidence l'implication de transporteurs.

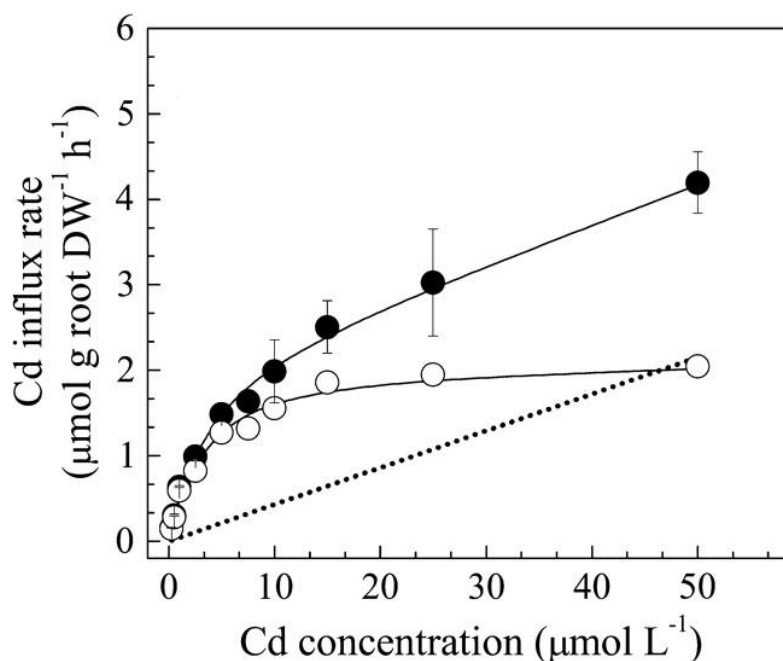


Figure 1-9. Isotherme d'absorption racinaire du Cd, après 1 heure d'exposition au métal et 15 minutes de désorption (Lu *et al.*, 2008). L'isotherme est arbitrairement interprétée comme la somme d'une composante linéaire apoplasmique et d'une composante michaelienne symplasmique.

Mais il n'existe aucune preuve formelle de cette interprétation. La composante non saturante pourrait être due à une absorption symplasmique. En effet, les transporteurs membranaires ne seraient pas les seules protéines impliquées dans le transport du Cd. En effet, beaucoup de canaux cationiques sont perméables aux cations métalliques. Ces canaux pourraient servir de passage au Cd, du moins aux fortes concentrations (Dunbar *et al.*, 2003). Le seul cation divalent dont le prélèvement principal a lieu via des canaux est le Ca (White, 2001), qui présente beaucoup de caractéristiques physiques similaires au Cd, notamment la taille. En effet, leurs rayons ioniques sont très proches : 97 pm pour Cd^{2+} et 99 pm pour Ca^{2+} . De plus, l'absorption du Cd par les plantes est inhibé par des bloqueurs des canaux à Ca (Lindberg *et al.*, 2004). Il est donc possible que Cd^{2+} entre dans la cellule par les canaux à Ca^{2+} à la place du Ca^{2+} . En effet, cela a été montré chez certaines bactéries.

Il a été clairement démontré que le Cd emprunte des voies développées pour des ions essentiels : le Cd traverserait les membranes des cellules racinaires de façon opportuniste, via des protéines transportant le Zn, le Cu ou le Fe (Welch et Norvell, 1999), ou via des canaux tels que les canaux à calcium (Cataldo *et al.*, 1983; Costa et Morel, 1993; Zhao *et al.*, 2002).

III. La complexation intracellulaire du Cd

Dans le cytoplasme, les espèces ioniques libres, en particulier les cations divalents, sont potentiellement toxiques. Leur forte réactivité entraîne la formation de radicaux libres hydroxyles, puissants oxydants potentiellement toxiques pour la plante (Welch, 1995). Les ETM, comme le Cd, se lient à des groupes sulphydryl essentiels et à des protéines structurales, interférant ainsi avec le métabolisme de la plante (Vogeli-Lange et Wagner, 1990). De plus, la plupart des cations divalents forment des phosphates de faible solubilité. L'accumulation incontrôlée de ces espèces dans le cytoplasme entraînerait la précipitation du P cytoplasmique, causant la mort de la cellule (Clarkson et Lüttge, 1989). Par conséquent, il est nécessaire que la concentration des cations divalents dans le cytoplasme soit contrôlée et maintenue à un niveau tolérable. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans cette régulation (Clarkson et Lüttge, 1989).

III.1. La séquestration du Cd dans les cellules

Les études sur l'accumulation et la distribution du Cd dans les plantes ont montré que la vacuole est un compartiment majeur de la séquestration du Cd comme d'autres ETM (Vogeli-Lange et Wagner, 1990; Salt et Wagner, 1993). En effet, le Cd entrerait dans les vacuoles de racines d'avoine par le biais d'un antiport $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^{+}$ (Salt et Wagner, 1993). La vacuole contient des concentrations élevées de ligands organiques comme le malate, le citrate ou encore le phytate (Florijn et Van Beusichem, 1993). Ces substances se lient aux libres de Cd, diminuant ainsi l'activité du Cd^{2+} dans la vacuole et régulant donc à la fois l'activité de Cd^{2+} dans la vacuole et le cytoplasme. En plus des complexes organiques, le Cd peut aussi former des complexes avec les phosphates, chlorides et sulphides à l'intérieur de la vacuole. La formation de ces sels pourrait jouer un rôle important dans l'accumulation du Cd dans les feuilles de tabac à des niveaux de Cd relativement bas (Wagner et Krotz, 1989).

III.2. La formation de complexes

La majorité du Cd cellulaire se trouve sous forme non ionique (Clarkson et Lüttge, 1989), ce qui est d'ailleurs considéré comme le mécanisme majeur de tolérance de la plante vis-à-vis du métal. De nombreuses formes d'agents de faible poids moléculaire pouvant lier le Cd joueraient un rôle important dans le maintien de l'homéostasie dans le cytoplasme. Un groupe de polypeptides (poly(γ EC)nG) est considéré particulièrement important dans la tolérance au Cd : les phytochélatines (Meuwly *et al.*, 1995; Rauser, 1995). Ces phytochélatines (PCs) sont

riches en cystéine et présentent une affinité très forte pour le Cd, en raison de leurs groupes sulphhydryl (Vogeli-Lange et Wagner, 1990). La synthèse des phytochélatines est stimulée par la présence d'ETM dont le Cd, mais peut aussi être inhibée par la présence de ligands comme l'EDTA ou des phytochélatines dépourvues de métal, peut-être à cause d'un mécanisme de régulation en retour (Grill *et al.*, 1987).

Les PCs joueraient également un rôle dans le transport du Cd dans la vacuole.

Chapitre 5. Prévoir le transfert des éléments du sol vers les plantes

Modéliser le transfert du Cd (et des ETM en général) du sol vers les différentes parties des plantes est d'un grand intérêt pour limiter les risques sur la santé. En effet, le modèle permettra à terme de prévoir l'accumulation de Cd dans les différents organes ou compartiments de la plante, en tenant compte des facteurs pouvant intervenir sur l'absorption et la distribution du métal dans la plante (caractéristiques du sol et du climat). D'une part, le modèle permettra de prédire les risques liés à la consommation d'une plante, et donc de cultiver des variétés appropriées assurant des denrées dont les niveaux de contamination ne dépassent pas les normes légales. D'autre part, le modèle servira à prévoir les quantités de métal qui seront accumulées dans les parties aériennes des plantes vouées à la phytoremédiation, permettant ainsi de piloter des cultures de plantes hyperaccumulatrices sur des sites pollués.

Prédire les quantités d'un ion prélevées par un végétal n'est pas simple. Le prélèvement des nutriments par les racines des végétaux est affecté par des interactions complexes entre des caractéristiques du sol et des processus propres à la plante. Les facteurs liés au sol, tels que la quantité totale de l'élément dans le sol, la salinité du sol, le statut du sol en nutriments et le transport des ions vers la surface racinaire affectent la disponibilité des ions et donc leur prélèvement par les racines (Chaney et Hornick, 1978). L'absorption racinaire des ions est également déterminée par des processus intrinsèques à la plante, en particulier l'architecture racinaire, les modifications biologiques de la rhizosphère (exsudats racinaires), et les interactions entre la plante et les microorganismes (par exemple les mycorrhizes).

De nombreuses approches ont vu le jour pour tenter de prévoir l'entrée de l'eau, des nutriments ou des ETM dans les plantes. Les scientifiques se sont avant tout intéressés à la modélisation des flux d'eau de nutriments dans les plantes, dans l'objectif d'améliorer la nutrition des végétaux, de mieux gérer leur fertilisation ou leur irrigation, et d'optimiser les rendements

Pour l'eau, il s'est avéré que les approches proposées requéraient des informations assez détaillées sur la distribution des racines, leur densité, leur conductivité ou encore la résistance de la plante et du sol, autant de paramètres variant à la fois selon le type de sol, la profondeur et aussi le temps (Hoogland *et al.*, 1981).

Le flux des nutriments suit une loi de diffusion et une loi de flux de masse, suggérant de s'intéresser d'abord au flux de l'eau, de l'absorption jusqu'à la transpiration, avant d'étudier le flux des solutés.

Habituellement, le transfert des éléments en traces dans la chaîne alimentaire est caractérisé par une approche empirique, en estimant dans un premier temps la concentration de l'élément dans la solution du sol *via* un coefficient de distribution linéaire solide-solution (K_d en $L\ kg^{-1}$). Dans un deuxième temps, sont estimées les concentrations dans les tissus végétaux à travers un facteur de prélèvement par la plante (PUF, en $L\ kg^{-1}$) (Chen *et al.*, 2008). K_d est le ratio entre la quantité d'élément totale dans le sol et celle en solution. Le PUF est le ratio entre la concentration dans le tissu végétal et celle en solution. C'est une approche qui fait l'hypothèse d'un transfert constant de l'élément dans le continuum solide-solution-plante. Or les taux de prélèvement varient au cours de la croissance de la plante. D'où la nécessité de développer des modèles cinétiques intégrant les processus d'interaction entre le sol et la plante. Ainsi sont nés de nombreux modèles, le premier d'entre eux étant celui de Barber et Cushman en 1981. Dans ces modèles, l'influx est prédit selon l'équation de Michaelis-Menten, K_m étant le coefficient de perméabilité de la racine. Les paramètres cinétiques sont recherchés en utilisant des plantes cultivées en hydroponie, avec les inconvénients que cela comporte : en hydroponie, l'approvisionnement des racines n'est pas limité par la diffusion et le flux de masse. En outre, ces modèles font l'hypothèse que les paramètres restent les mêmes pendant toute la vie de la plante. Or au cours de la croissance des plantes, le ratio des racines matures sur les racines jeunes et actives augmente, et l' I_{max} diminue. Le facteur temps est donc crucial, associé bien entendu au ratio racines matures/racines jeunes (Chen *et al.*, 2008).

Le modèle RUSE réalisé par Perriguet (2006) est basé sur celui de Barber-Cushman. C'est sur ce modèle que la thèse tente d'apporter des améliorations.

Chapitre 6. Conclusion de la synthèse bibliographique et démarche expérimentale

I. **Zones d'ombre**

D'après les travaux de Jérôme Perriguet (2006), il apparaît que le modèle RUSE serait sensible aux paramètres cinétiques et au formalisme de la fonction d'absorption. Cette thèse se focalise sur différents facteurs pouvant modifier la description de cette fonction.

- La fonction d'absorption du Cd dans le milieu intracellulaire des racines est soumise à des contradictions. Sa formalisation par l'équation de Michaëlis-Menten est-elle pertinente ?

Hypothèse émise : la littérature surestime les paramètres cinétiques de l'absorption symplasmique en raison d'une désorption insuffisante des parois racinaires.

- Peu d'études accordent de l'importance à la voie apoplasmique. Quelle est donc l'influence de cette adsorption sur le prélèvement total de Cd ? Comment intégrer cette composante dans le modèle de prélèvement du métal ?

Hypothèse émise : l'apoplasme joue un rôle non négligeable dans l'accumulation du Cd. L'ignorer risque de biaiser significativement la modélisation.

- Aucune étude ne renseigne sur l'effet du Cd endogène sur son absorption racinaire. Si des mécanismes de régulation ont lieu au sein de la plante, sont-ils significatifs ? D'après les autres éléments absorbés par les racines, une régulation risque de modifier ces paramètres.
- Les solutions d'exposition au Cd servant à mesurer les paramètres cinétiques, sont parfois simplifiées à l'extrême, parfois représentatives de la solution du sol.

Hypothèse émise : les paramètres cinétiques peuvent varier significativement en fonction de la composition ionique de la solution du sol

- Les cultures en hydroponie sont-elles pertinentes pour mesurer des paramètres cinétiques sensées alimenter un modèle de prélèvement du Cd sur le terrain ? Des études

prouvent que l'environnement des racines entraîne des modifications architecturales et anatomiques.

Hypothèse émise : les caractéristiques des racines cultivées en hydroponie sont significativement différentes de celles des racines cultivées en sol. Cela peut avoir des conséquences non négligeables sur la mesure des paramètres cinétiques et la simulation du prélèvement de Cd.

II. Démarche expérimentale

Le maïs (*Zea mays*) et le tabouret calaminaire (*Noccaea caerulescens* (J. Presl & C. Presl), anciennement nommé *Thlaspi caerulescens* (J. Presl & C. Presl)) sont choisis pour le développement du modèle (Sterckeman *et al.*, 2004) en raison de leur capacités contrastées de tolérance et d'accumulation du Cd. Le maïs est une monocotylédone connue pour accumuler le métal dans ses racines (Van Bruwaene *et al.*, 1984, dans Chan et Hale, 2004), et pour privilégier la sorption du Cd sur les parois cellulaires (Khan *et al.*, 1984, dans Lozano-Rodriguez *et al.*, 1997). C'est une des premières céréales consommées au monde, elle est représentative des plantes cultivées risquant une contamination des parties consommables. L'écotype de *Zea mays* choisi est MB 2862. Cet hybride fourrager est produit par l'INRA, à l'Unité de Génétique et d'Amélioration des Plantes d'Estrées-Mons. Quant au tabouret calaminaire, il accumule plus de 1400 mg kg⁻¹RS dans ses feuilles (Reeves *et al.*, 2001; Schmitt-Sirguez, 2004).

Les plantes seront cultivées en hydroponie de manière à obtenir du matériel racinaire facilement exploitable pour réaliser des cinétiques de prélèvement racinaire dans des conditions contrôlées. Le Cd sera marqué par un radiotraceur (¹⁰⁹Cd), de manière à pouvoir détecter et quantifier des prélèvements ayant lieu sur des durées très courtes (1 heure).

Dans un premier temps (partie 2), nous chercherons à décrire rigoureusement la fonction de prélèvement du Cd par les racines, en tenant compte du Cd s'adsorbant sur les parois racinaires. Les paramètres cinétiques trouvés seront alors intégrés au modèle pour confronter les données simulées aux données mesurées sur le terrain (en pot).

Les expérimentations de la partie 3 tentent de donner des explications au décalage qui persiste entre les simulations réalisées par le modèle et les mesurées effectuées en pots.

Partie 2. Mesure à court terme des paramètres cinétiques d'absorption racinaire du Cd et simulation des quantités de Cd prélevées à long terme

Les racines prélèvent le Cd à la fois dans leur compartiment apoplasmique (les parois et les espaces intercellulaires) et dans leur compartiment symplasmique (le milieu intracellulaire délimité par les parois cellulaires). La part de ces deux fractions racinaires dans le prélèvement total de Cd par la plante est méconnue. En outre, l'existence de plusieurs composantes dans l'absorption symplasmique, que certains résultats laissent supposer, n'a jamais été clairement établie. Les paramètres de l'absorption racinaire permettent de caractériser la vitesse de prélèvement du métal. Dans les études rapportées par la littérature, les chercheurs se sont rarement intéressés à la fraction apoplasmique et se sont focalisés sur l'entrée du Cd à travers les membranes plasmiques. Dans cette partie de la thèse, nous cherchons à paramétrer les deux composantes du prélèvement, pour connaître leurs impacts respectifs sur le prélèvement total racinaire. Les paramètres sont mesurés à travers des isothermes de prélèvement racinaire, qui décrivent la vitesse du prélèvement du métal en fonction de sa concentration dans la solution d'exposition. L'exposition est de courte durée (une heure), de manière à s'affranchir de certains facteurs susceptibles d'affecter la mesure des paramètres, par exemple des mécanismes de régulation.

Une fois le Cd prélevé par les racines, la difficulté majeure est de distinguer le Cd symplasmique du Cd adsorbé sur les parois, de manière à ce que les paramètres de prélèvement des deux compartiments ne soient pas faussés. Selon les études réalisées à ce sujet, 15 à 30 minutes de désorption permettent d'extraire des parois la quasi-totalité du Cd apoplasmique. Dans la littérature, le Cd restant dans les racines est ensuite quantifié pour tracer l'isotherme d'absorption. Celle-ci est modélisée par une fonction de type Michaëlis-Menten associée à une fonction linéaire, faisant apparaître deux composantes dont l'interprétation n'a jamais été clairement prouvée : la composante saturante est imputée au prélèvement membranaire tandis que la composante linéaire est attribuée à du Cd apoplasmique résiduel. Pourtant, jusqu'à présent, aucune étude ne lève le doute sur cette interprétation des deux composantes (Reid et Liu, 2004) : en effet, la composante linéaire pourrait bien refléter une partie de l'absorption symplasmique du Cd.

Le modèle de prélèvement racinaire de type Barber-Cushman étant très sensible au formalisme de l'isotherme d'absorption, il est très important de parvenir à la décrire façon précise. Or nous ne sommes pas certains que le formalisme michaëlien attribué à l'absorption dans le compartiment intracellulaire sur le court terme soit adéquat. En effet, les seules données disponibles sur les paramètres d'absorption (I_{max} , K_m) du Cd par le maïs (Mullins et Sommers, 1986) sont douteuses. Elles ont conduit à de nouvelles mesures, qui remettent en cause la fonction de Michaelis-Menten dans le cas du maïs et suggèrent une absorption qui soit une fonction linéaire de la concentration en solution (Perriguet *et al.*, 2005), ou tout au moins des valeurs de K_m supérieures de plusieurs ordres de grandeur aux valeurs proposées dans la littérature. Nous avons donc cherché à extraire la fraction symplasmique des cellules racinaires, pour chacune des concentrations d'exposition, de manière à tracer et à caractériser distinctement les isothermes des deux composantes racinaires : l'isotherme d'absorption symplasmique et l'isotherme d'absorption apoplasmique.

Dans le premier chapitre, le contenu symplasmique est extrait des racines par un traitement au méthanol-chloroforme qui dissout les membranes plasmiques. Nos isothermes symplasmique et apoplasmique montrent une forte contribution des parois au prélèvement du Cd lors des 60 minutes d'exposition ; elles montrent également la combinaison de deux systèmes de transport membranaire, l'un à forte affinité et l'autre à faible affinité pour le Cd. Cependant, nos résultats montrent *a posteriori* que ce protocole de fractionnement risque de surestimer significativement la fraction symplasmique. C'est pourquoi une deuxième méthode est mise au point pour fractionner le Cd racinaire. Elle fera l'objet du chapitre 2 de cette deuxième partie. Ce deuxième protocole consiste à suivre dans le temps la cinétique de désorption du Cd apoplasmique, et à extraire le contenu symplasmique en lysant les cellules par une brève congélation/décongélation des racines dans l'azote liquide. Des tests de validation accréditent la validité de ce deuxième protocole de fractionnement (annexe). Le deuxième chapitre viendra confirmer les principaux résultats avancés dans le premier chapitre.

Enfin, les deux méthodes d'obtention des paramètres seront comparées, et ces paramètres intégrés dans le modèle pour simuler des prélèvements que l'on confrontera aux mesures réalisées en pots.

Chapitre 1. Mesure à court terme des paramètres cinétiques de l'absorption racinaire du Cd : fractionnement du Cd racinaire au méthanol chloroforme (MC) et mise en évidence de deux systèmes de transport membranaire (méthode MC)

D'après la littérature, le métal apoplasmique comprend une fraction échangeable et une autre non échangeable. Selon les auteurs, une fois la fraction échangeable désorbée, c'est cette fraction non échangeable, restée sorbée sur les parois des cellules racinaires, qui expliquerait la composante linéaire des isothermes d'absorption racinaire. D'autre part, nous ne sommes pas certains de la pertinence de l'utilisation de la fonction michaëlienne pour décrire la cinétique d'absorption membranaire. C'est pourquoi nous avons séparé physiquement le Cd intracellulaire du Cd de cette fraction apoplasmique non échangeable. Dans ce premier chapitre, à l'issue d'une heure d'exposition au Cd, nous quantifions le Cd désorbé des parois lors des 30 minutes de désorption préconisées par la littérature, puis nous utilisons le mélange de méthanol-chloroforme pour dissoudre les membranes cellulaires et ainsi extraire et quantifier le Cd intracellulaire ; enfin, le Cd resté sorbé sur les parois est également quantifié et additionné à la fraction apoplasmique déjà désorbée lors des 30 premières minutes. Le protocole vise donc à quantifier distinctement les fractions symplasmique et apoplasmique pour une meilleure estimation des paramètres cinétiques du prélèvement racinaire.

I. Matériels et méthodes

I.1. Culture des plantes en conditions contrôlées

I.1.1. Germination du maïs et du tabouret

Deux écotypes du tabouret calaminaire sont étudiés : Nc-H (*Noccaea caerulescens*, High-accumulator), qui hyperaccumule le Cd, et Nc-L (*Noccaea caerulescens*, Low-accumulator), qui n'accumule pas le Cd. Les graines de maïs et de tabouret calaminaire germent dans une boîte en aluminium, sur du papier filtre reposant sur du coton imbibé d'eau. Ces boîtes sont recouvertes d'une feuille d'aluminium pour un maintien efficace de l'humidité. La germination requiert cinq jours pour le maïs, et une dizaine de jours pour le tabouret calaminaire, dans une étuve réglée à 25°C et 20°C respectivement. Quel que soit le type de culture choisi, les plantules sont ensuite placées dans un phytotron caractérisé par une

luminosité de $300 \mu\text{mol photons s}^{-1} \text{ m}^{-2}$, une photopériode de 16 heures, et des températures de jour et de nuit de 25 et 20°C respectivement.

I.1.2. Culture des plantes en hydroponie

Pour la culture en hydroponie, les plantes sont insérées dans des plaques de polystyrène perforées, flottant sur une solution nutritive dans un bac en polyester. Une distance de 5 cm sépare les plants de maïs tandis que les plantules de tabouret calaminaire sont séparées d'une distance de 1 cm. La solution nutritive de *Zea mays* est constituée de (μM) : 3000 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 250 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, 500 K_2SO_4 , 1000 MgSO_4 , 2000 NH_4NO_3 , 46 H_3BO_3 , 9 MnSO_4 , 0.3 CuSO_4 , 0,8 Na_2MoO_4 , 0,8 ZnSO_4 , 7,5 FeSO_4 . Celle de *Noccea caerulea* contient (μM) : 3500 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1500 MgSO_4 , 1200 KNO_3 , 100 K_2HPO_4 , 10 KCl , 10 H_3BO_3 , 10 MnCl_2 , 7,5 FeSO_4 , 5 ZnSO_4 , 0,7 NiSO_4 , 0,2 CuSO_4 , 0,2 Na_2MoO_4 (Perriguet, 2006). Le pH de la solution nutritive est vérifié quotidiennement et ajusté à 5,7 si nécessaire, par addition de KOH ou de NaOH. La disponibilité de tous les nutriments a été vérifiée sur le logiciel CHES (van der Lee, 1998). Pendant toute la durée de la culture, la solution nutritive est continuellement oxygénée par des bouquets de capillaires reliés à une arrivée d'air. L'ensemble de la solution hydroponique est renouvelé deux fois par semaine en ce qui concerne les plants de maïs, et une fois par semaine pour les plantules de tabouret calaminaire. Le volume de solution nutritive est de 40 litres pour le maïs et de 24 litres pour le tabouret calaminaire.

I.2. Exposition au Cd radiomarqué pour l'obtention des isothermes d'absorption

Au terme de la culture hydroponique (12 jours pour le maïs et trois mois pour le tabouret calaminaire), les systèmes racinaires sont rincés à l'eau distillée puis placés dans des erlenmeyers de 650 ml de solution d'absorption. Ces solutions contiennent 0,5 mmol.L^{-1} CaCl_2 , du CdCl_2 (0,05 et 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), le traceur radioactif ^{109}Cd , et 2 mmol.L^{-1} de MES pour tamponner le pH de la solution ; le pH est ajusté à 5,7 à l'aide de quelques gouttes de KOH à 1 mol.L^{-1} . Les solutions d'exposition des racines au Cd contiennent du CaCl_2 0,5 mM pour le bien-être du système racinaire au cours de l'exposition du Cd, et pour mimer la force ionique du sol. La gamme de concentrations (0 à 50 μM) a été choisie d'après les isothermes de la littérature, pour balayer les concentrations du HATS (High-Affinity Transport System) et celles de la composante linéaire attribuée à l'adsorption apoplasmique (Figure 1-9). L'homogénéité de la solution ainsi que l'oxygénation des racines sont assurées par de fins

capillaires en plastique reliés à une arrivée d'air comprimé et plongés dans chacun des erlenmeyers durant les 60 min d'exposition au Cd.

L'absorption se veut à concentration constante, condition *sine qua non* à l'établissement des isothermes d'absorption. Ainsi, les plantes doivent accumuler suffisamment de Cd pour nous permettre de quantifier le métal absorbé, tout en ne réduisant pas la concentration externe de Cd de manière significative. La concentration est considérée constante tant que le Cd absorbé ne dépasse pas 10 % du Cd initial en solution. Après avoir testé la vitesse à laquelle les plants épuisent le Cd en solution, il s'avère que les deux écotypes de tabouret calaminaire absorbent en une heure plus de 10 % du Cd de la solution. Ainsi, pour que le prélèvement s'effectue à concentration constante, les plantes sont transférées dans plusieurs solutions d'absorption successives, dans lesquelles la disparition de Cd n'excède pas 10 %.

I.3. Fractionnement du Cd racinaire au méthanol-chloroforme

I.3.1. Désorption du métal apoplasmique sorbé réversiblement

Le prélèvement de Cd par les systèmes racinaires est immédiatement suivi de quatre étapes visant à quantifier, pour chacune des concentrations de Cd en solution, le métal apoplasmique ainsi que le métal intracellulaire. Dans un premier temps, les systèmes racinaires sont rincés dans de l'eau distillée (moins d'une minute), posés quelques secondes sur du papier absorbant, puis introduits dans trois bains successifs de solution dite « de désorption », très concentrée en CaCl_2 (5 mmol.L^{-1}) et en CdCl_2 (2 mmol.L^{-1}), et dont le pH est ajusté à 5,7 grâce à 2 mmol L^{-1} de MES et quelques gouttes de HNO_3 ou de KOH. Chaque bain désorbant dure 10 minutes. Cette étape permet de désorber le métal apoplasmique par simple échange ionique. Pour réduire au maximum une éventuelle fuite de Cd symplasmique, ou au contraire quelque poursuite de l'absorption membranaire, la désorption s'effectue à une température inférieure à 4°C qui réduit considérablement la perméabilité membranaire. Le Cd récupéré dans ces bains désorbants est appelé « Cd apoplasmique échangé ». Les systèmes racinaires sont ensuite séparés des parties aériennes pour subir les trois étapes suivantes du fractionnement.

I.3.2. Récupération du Cd intracellulaire

Chaque système racinaire est alors introduit dans un volume de méthanol-chloroforme (MC) (v/v ; 2/1) pendant 72 heures, afin de dissoudre les membranes plasmiques tout en préservant le réseau apoplasmique intact (DiTomaso *et al.*, 1992). A la suite de ce traitement, les

systèmes racinaires, morphologiquement inchangés, sont transférés dans deux bains successifs d'eau distillée, d'une durée de 24 h chacun. Deux fois par jours, les pots sont agités manuellement et énergiquement, de manière à stimuler l'évacuation du métal intracellulaire. Enfin, les systèmes racinaires sont à nouveau transférés dans la solution de désorption, pour une durée de 30 minutes et à température ambiante, pour désorber le Cd symplasmique susceptible de s'adsorber aux parois au cours de son évacuation hors du compartiment intracellulaire. La validation de ce protocole est obtenue *a posteriori*, une fois les résultats obtenus ; elle est donc présentée à la fin de ce chapitre.

1.3.3. Dosage du Cd dans les différents compartiments racinaires

Les volumes de méthanol-chloroforme, d'eau et de solution désorbante sont déterminés par pesée. La radioactivité récupérée dans les pots d'eau, de MC et de solution désorbante est quantifiée via des échantillons de 1, 10 ou 20 ml dosés par spectrométrie gamma (Wallac 1480 Wizard®3 de Perkin Elmer Life Sciences Wallac Oy, Turku, Finland). Les mesures de ^{109}Cd permettent d'accéder aux quantités de Cd stable présentes dans les différents compartiments, puisque le ratio isotopique initial $^{109}\text{Cd}/^{112}\text{Cd}$ imposé dans la solution d'exposition reste le même à l'intérieur de la plante.

Les apoplasmes racinaires ainsi que les parties aériennes sont finalement séchés à l'étuve (72°C) pendant 3 jours puis pesés, avant d'être analysés au spectromètre gamma. Le Cd restant dans les apoplasmes racinaires est sera qualifié de « Cd non échangé » puisqu'il s'agit du métal étant resté sorbé sur les parois malgré la désorption.

Lors d'une expérimentation précédente (Redjala, 2005), des systèmes racinaires ont été pesés puis broyés (broyeur à agate Retsch, Allemagne) à une granulométrie inférieure à 250 µm. Les minéralisations (prise d'essai de 0,5 g dans 8 ml HNO_3 et 2 ml H_2O_2) ont été réalisées dans des réacteurs fermés en Téflon®, au four à micro-ondes (Mars 5, CEM Corporation, Matthews, Caroline du Nord, USA). Une fois refroidi, le minéralisat a été filtré sur du papier sans cendres et ajusté à 25 ml avec du HNO_3 0,1 M (Schwartz, 1997). Les comptages de la radioactivité dans les échantillons non broyés, broyés et minéralisés ont permis d'obtenir une relation mathématique permettant de doser le Cd directement dans des échantillons non broyés et d'en déduire le Cd dans la même fraction minéralisée. En effet, il est nécessaire que tous les comptages de l'expérimentation soient réalisés sur des échantillons liquides pour pouvoir être comparés entre eux.

I.4. Analyse des données

Les cinétiques de désorption apoplasmique sont modélisées par la fonction du pseudo-second ordre (Ho, 1995). Les ajustements de Freundlich et de Langmuir sont testés sur les isothermes d'adsorption. Enfin, les isothermes d'absorption symplasmique sont ajustées selon le modèle de Michaëlis-Menten associé ou non à une fonction linéaire ou une deuxième fonction michaëlienne. Tous ces ajustements sont effectués sur le logiciel KaleidagraphTM. Pour toutes les isothermes, les ajustements sont réalisés après transformation logarithmique des deux variables et sur les valeurs correspondant à chaque plante.

Le Cd compté dans les parties aériennes étant négligeable devant les quantités de Cd mesurées dans les différents compartiments racinaires, nous n'en tiendrons donc pas compte.

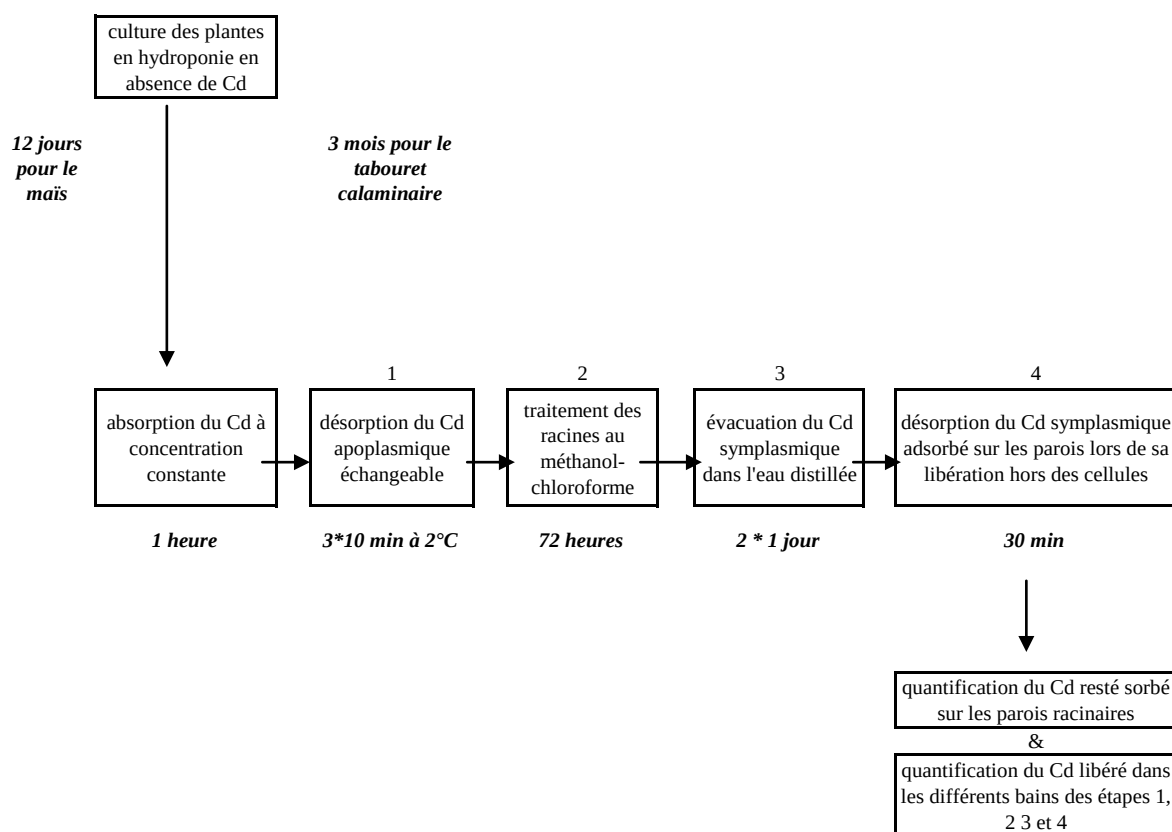


Figure 2-1. Schématisation du protocole de fractionnement du Cd racinaire pour l'obtention des isothermes d'absorption symplasmique et apoplasmique

II. Résultats

II.1. Distribution du Cd dans les différents compartiments racinaires

La fraction apoplasmique échangée est quantifiée en sommant le Cd échangé pendant les 30 minutes de désorption à 2°C. Le prélèvement apoplasmique total est calculé en additionnant le Cd apoplasmique échangé au Cd resté lié aux parois à la fin du fractionnement (Cd non échangé). Ce Cd apoplasmique résiduel représente une part grandissante du compartiment apoplasmique, au fur et à mesure que diminue la concentration externe (Figure 2-5).

La proportion de Cd apoplasmique par rapport au Cd total racinaire, augmente nettement avec la concentration en solution, d'environ 30 à 90 % pour les trois plantes considérées.

Parallèlement, la fraction symplasmique prédomine aux basses concentrations et diminue au fur et à mesure que le Cd apoplasmique prend de l'importance

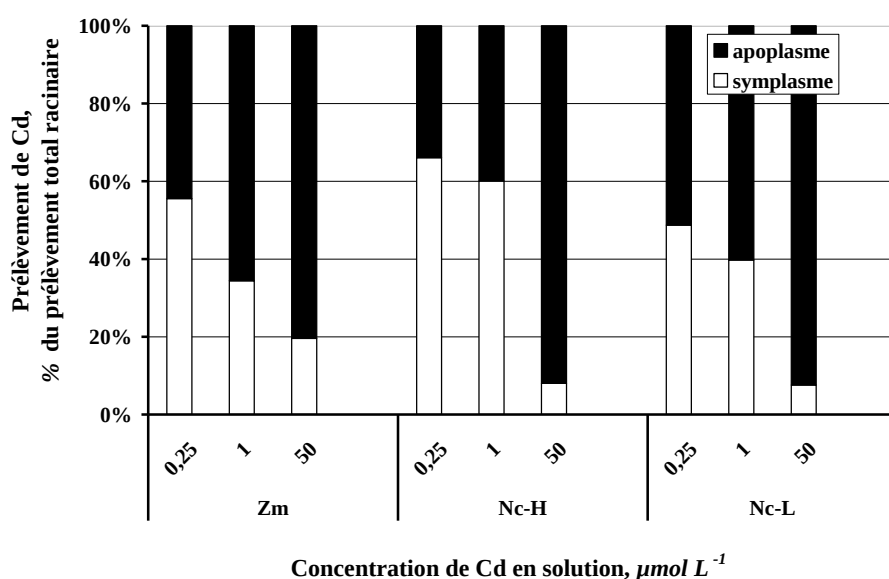


Figure 2-2. Distribution du Cd dans les compartiments racinaires, après une heure l'absorption dans 0,25 µmol L⁻¹, 1 µmol L⁻¹ et 50 µmol L⁻¹.

Le Cd prélevé par les parois racinaires augmente avec la concentration de Cd en solution (Figure 2-3), et pour les trois plantes, la proportion de Cd retenue par les parois cellulaires racinaires augmente avec la concentration externe, d'environ 30 % à 90 % du total de Cd racinaire (Figure 2-2).

II.2. Isotherme de prélèvement apoplasmique

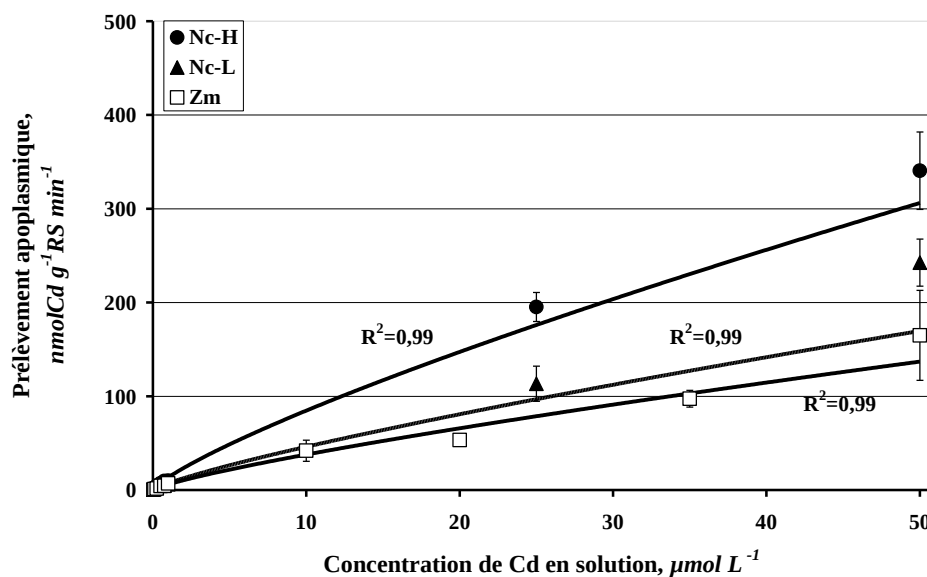


Figure 2-3. Isothermes d'adsorption apoplasmique, après 1 heure d'adsorption à concentration constante ($n=6$ pour Nc-H et Nc-L ; $n=4$ pour Zm).

Tableau 2-1. Paramètres cinétiques de l'isotherme d'adsorption ; figurent à la fois les ajustements sur le Cd échangé et le Cd apoplasmique total.

Ecotype	Cd apoplasmique	K_F	$1/n$	R^2
		L nmol g ⁻¹ DW min ⁻¹ μmol ⁻¹		
Zm	Echangé	4,25 (0,18)	0,88 (0,02)	0,99
	Total	6,01 (0,24)	0,80 (0,02)	0,98
Nc-H	Echangé	6,68 (0,38)	1,03 (0,02)	0,98
	Total	13,47 (0,52)	0,80 (0,02)	0,98
Nc-L	Echangé	5,70 (0,46)	0,92 (0,04)	0,95
	Total	7,16 (0,53)	0,81 (0,04)	0,93

L'isotherme d'adsorption apoplasmique est mathématiquement décrite par le modèle de Freundlich (), le modèle de Langmuir offrant un moins bon ajustement.

$V_{Apop} = K_F [Cd]^{1/n}$ **Équation 2-1**
 V_{Apop} ($\mu\text{g g}^{-1}\text{RS min}^{-1}$) est la vitesse de prélèvement. K_F et $1/n$ sont deux constantes empiriques qui permettent de paramétrer l'équation de sorption de Freundlich, et donc de caractériser l'interaction entre le Cd et les parois racinaires. K_F ($\text{L nmol g}^{-1}\text{RS min}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$) est le facteur de capacité de Freundlich et reflète la capacité d'adsorption des parois vis-à-vis du Cd ; cette capacité augmente lorsque K_F augmente. $1/n$ (sans dimension) est le facteur de linéarité de l'isotherme, ou encore le paramètre d'intensité de Freundlich ou la constante d'hétérogénéité (Pérez *et al.*, 2007) ; sa valeur diminue lorsque l'affinité augmente, et reflète l'hétérogénéité de l'adsorbant lorsqu'elle reste inférieure à 1.

La représentation logarithmique est nécessaire à la détermination des paramètres de Freundlich, pour pallier la dissymétrie de la distribution des concentrations. L'équation 2-1 devient :

$$\log(V_{Apop}) = \log(K_F) + \frac{1}{n} \log[Cd] \quad \text{Équation 2-2}$$

Les constantes de Freundlich des trois plantes sont rapportées dans le Tableau 2-1, à la fois pour le Cd échangé et pour le Cd apoplasmique total (somme du Cd échangé et du Cd resté sorbé dans les parois).

Lorsqu'on considère le Cd apoplasmique total, les affinités des parois des trois plantes pour le Cd ne sont pas significativement différentes, avec une valeur de 0,8. En revanche, si l'on ne considère que le métal échangé, les parois de l'hyperaccumulateur présentent une affinité significativement plus forte que celles des deux plantes non accumulatrices. Cependant, quelle que soit la plante, la constante d'hétérogénéité augmente significativement lorsqu'on ne considère que la fraction échangée du métal apoplasmique.

Dans l'isotherme d'adsorption du Cd échangé, la capacité d'adsorption des deux écotypes du tabouret calaminaire est d'environ 30 % plus élevée que celle du maïs. Concernant le Cd apoplasmique total, la capacité d'adsorption de Nc-H s'avère environ deux fois supérieure à celle de Nc-L ou de Zm (Tableau 2-1).

Le Cd apoplasmique non échangé augmente avec la concentration en solution, sans pour autant dépasser $10 \text{ nmol g}^{-1}\text{RS min}^{-1}$ (Figure 2-4). En revanche, sa proportion par rapport au Cd apoplasmique total augmente lorsque la concentration en solution diminue, atteignant 75 % chez Nc-H (Figure 2-5).

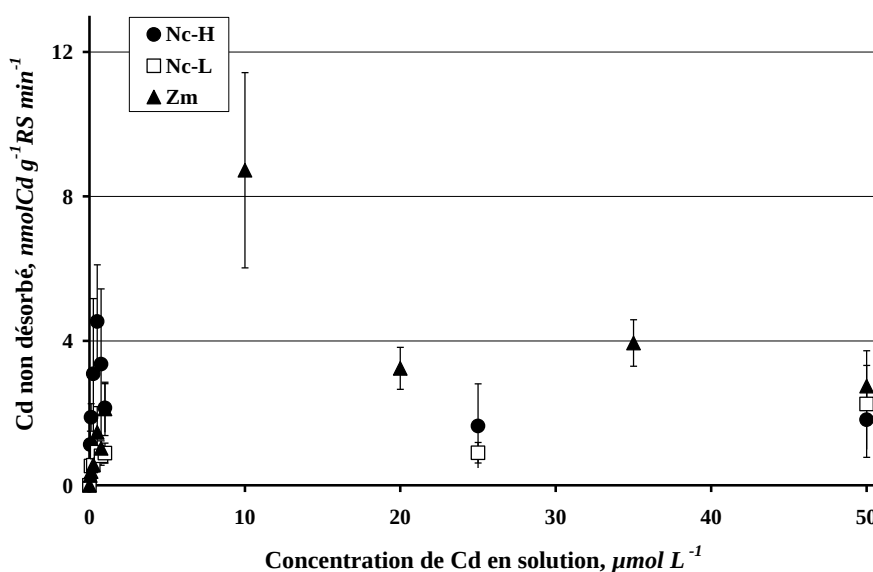


Figure 2-4. Isotherme d'absorption du Cd apoplasmique resté sorbé sur les parois à la fin du fractionnement

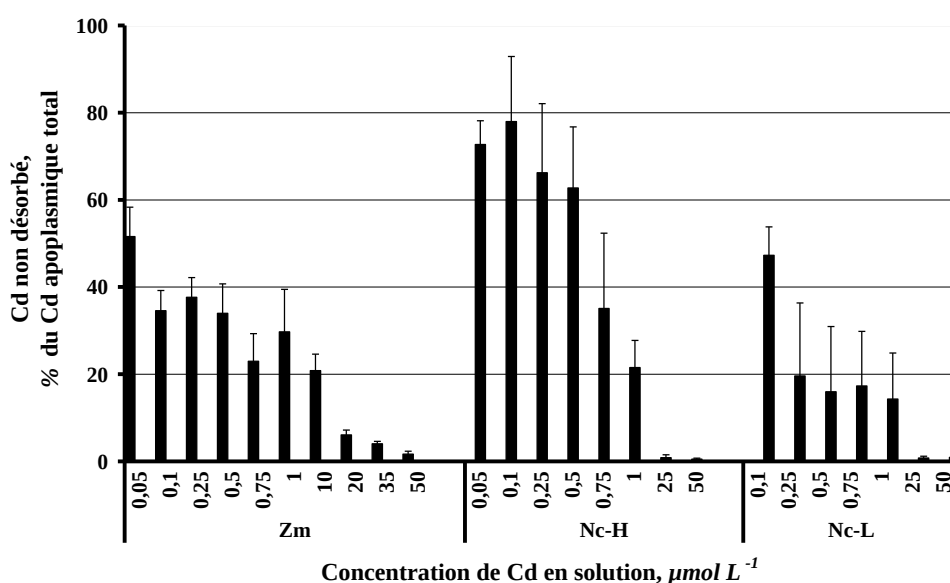


Figure 2-5. Pourcentage de Cd apoplasmique non échangé par rapport au Cd apoplasmique total

II.3. Isothermes d'absorption (ou d'influx) symplasmique

L'influx symplasmique (ou membranaire) est calculé en sommant les quantités de Cd libérées dans les différents bains contenant le MC et l'eau mais également en comptant le métal libéré dans le dernier bain désorbant. Le Cd est retrouvé principalement dans le premier bain d'eau et le dernier bain désorbant. L'influx symplasmique augmente avec la concentration en solution, mais de manière non linéaire (Figure 2-6).

L'isotherme d'influx symplasmique du maïs et du tabouret calaminaire suit le modèle de Michaëlis-Menten associé à une fonction linéaire (MM + linéaire) :

$$I = \frac{I_{\max} [Cd]}{K_m + [Cd]} + a[Cd] \quad \text{Équation 2-3}$$

I représente la vitesse de prélèvement symplasmique ($\text{nmol g}^{-1}\text{RS min}^{-1}$), et $[Cd]$ la concentration de Cd dans la solution externe (μM). $I_{\max}$ ($\text{nmol g}^{-1}\text{RS min}^{-1}$) and K_m (μM) sont les constantes michaëliennes, et a ($\text{nmol g}^{-1}\text{RS min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$) représente la pente de la composante linéaire de l'isotherme d'absorption.

Une fois les variables log-transformées, la fonction MM + linéaire s'écrit :

$$\log(I_s) = \log \left[\frac{I_{\max} \cdot 10^{[Cd]}}{K_m + 10^{[Cd]}} + a \cdot 10^{[Cd]} \right] \quad \text{Équation 2-4}$$

Le modèle s'ajuste très bien aux données ($R^2 = 0,97, 0,83$ et $0,88$ pour Zm, Nc-H et Nc-L respectivement) (Figure 2-6). L'isotherme de Nc-H est également ajustable par le simple modèle de Michaëlis-Menten (MM), mais avec un coefficient de détermination moins bon. Les trois plantes montrent donc une même allure de l'influx en fonction de la concentration externe, à savoir la combinaison d'une composante saturante (décrite par le modèle michaëlien) et d'une composante non saturante (fonction linéaire). Dans les isothermes des trois plantes, la composante saturante prédomine aux basses concentrations, tandis que la composante linéaire prend de plus en plus d'importance à mesure que la solution externe est concentrée en Cd. Cependant, les paramètres $I_{\max}$, K_m et a (Tableau 2-2) montrent des divergences entre les trois plantes étudiées.

Pour l'hyperaccumulateur (Nc-H), $I_{\max}$ est trois fois plus élevé que celui de deux autres plantes, tandis que l'affinité des membranes pour le Cd est plus forte chez Zm et Nc-L que chez Nc-H ; la pente est quant à elle deux fois plus forte chez le maïs que chez les deux écotypes du tabouret calaminaire.

Aussi, le passage de la prédominance michaëlienne à la prédominance linéaire se produit pour une concentration en solution beaucoup plus élevée chez Nc-H que pour les deux autres plantes. En effet, contrairement à ce que montrent les isothermes d'influx symplasmique de Zm et de Nc-L, la composante saturante de Nc-H reste supérieure à la composante linéaire, pour toute la gamme de concentrations testée (Figure 2-7).

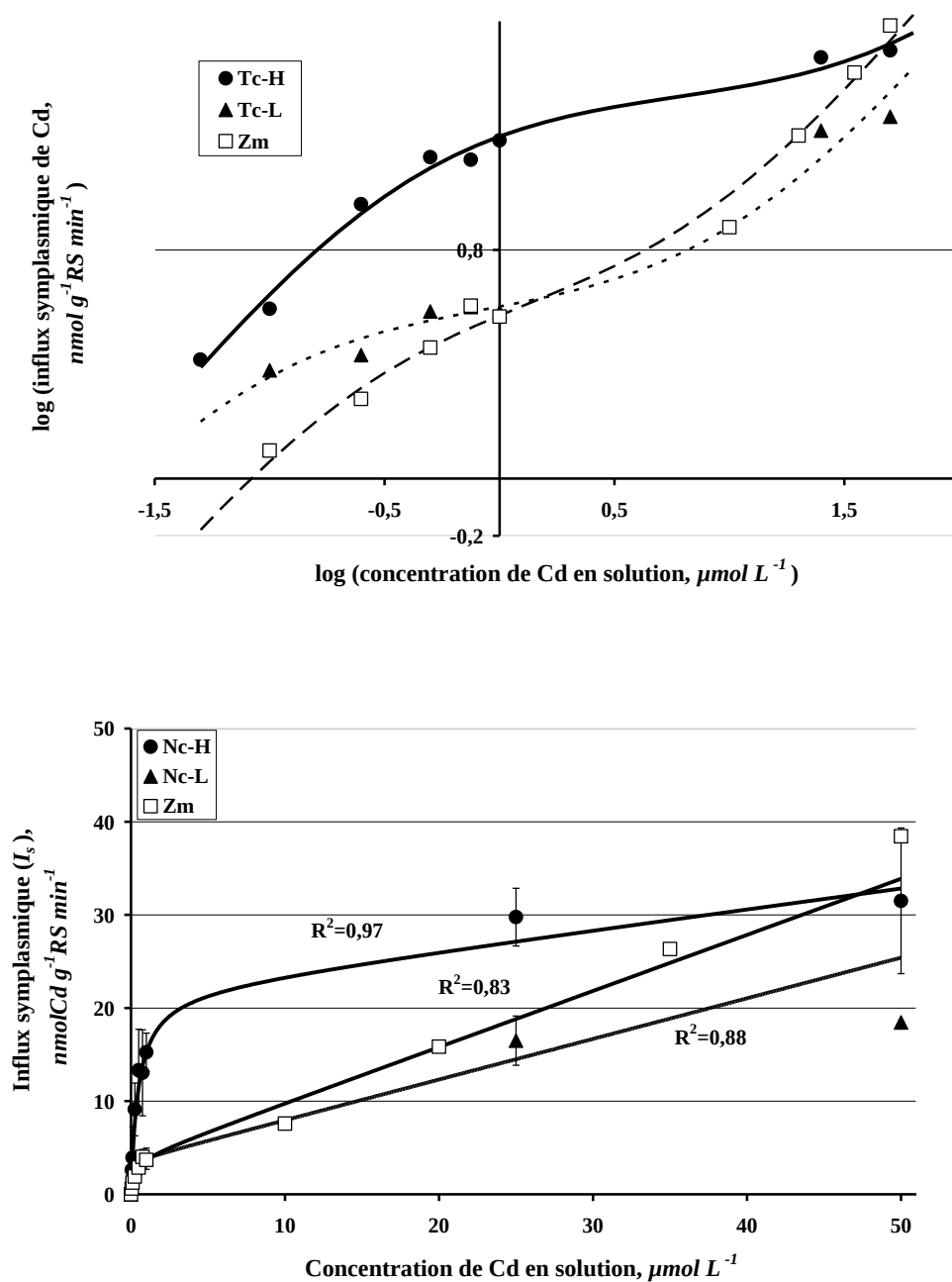


Figure 2-6. Isothermes d'absorption du Cd dans le symplasma racinaire (n = 4 pour Zm ; n = 6 pour Nc-H et Nc-L, après une heure d'exposition dans 650 ml de solution contenant 0,5 mM CaCl₂, 2 mM MES et une concentration de CdCl₂ variant de 0,05 à 50 μM.

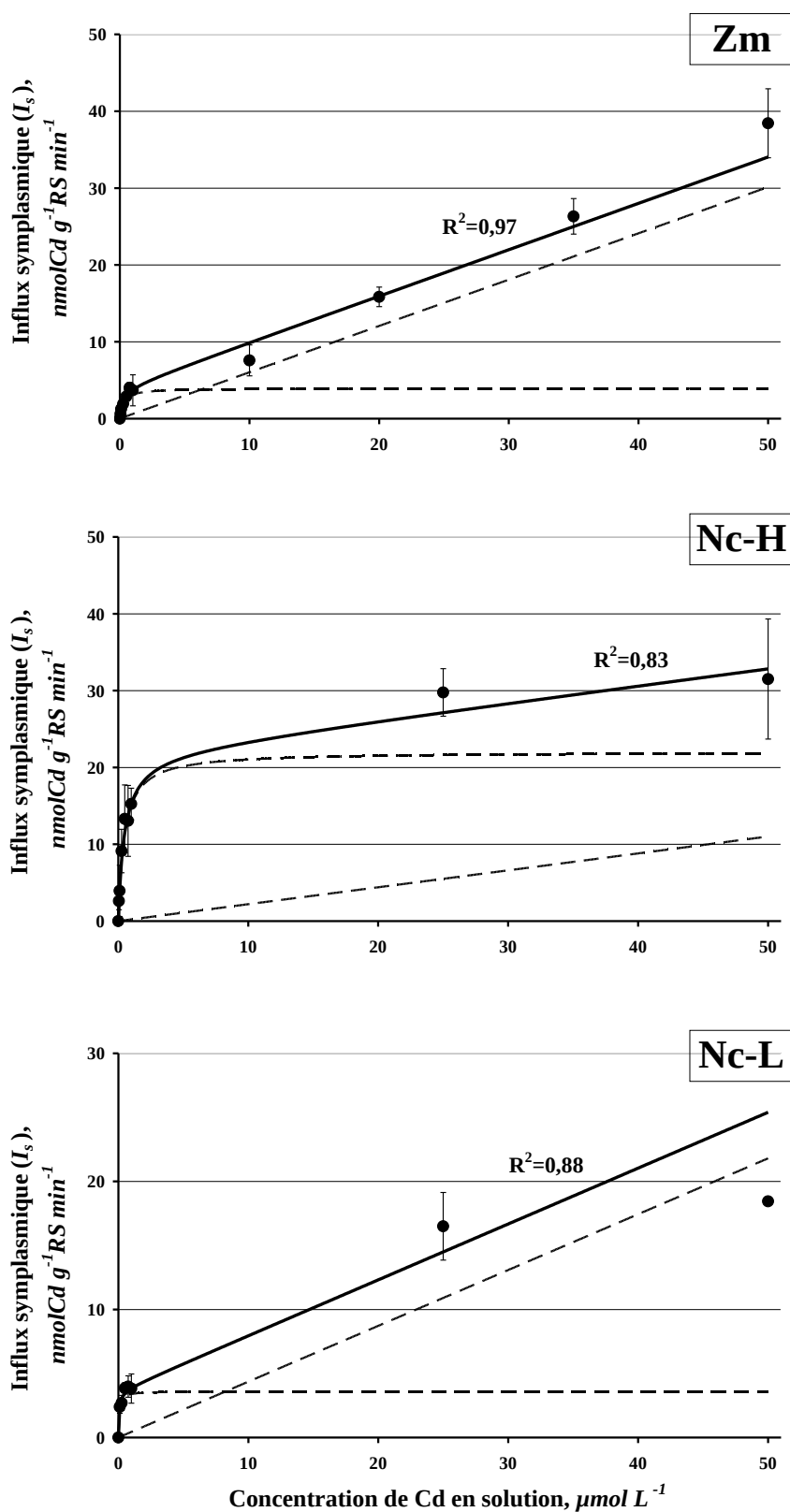


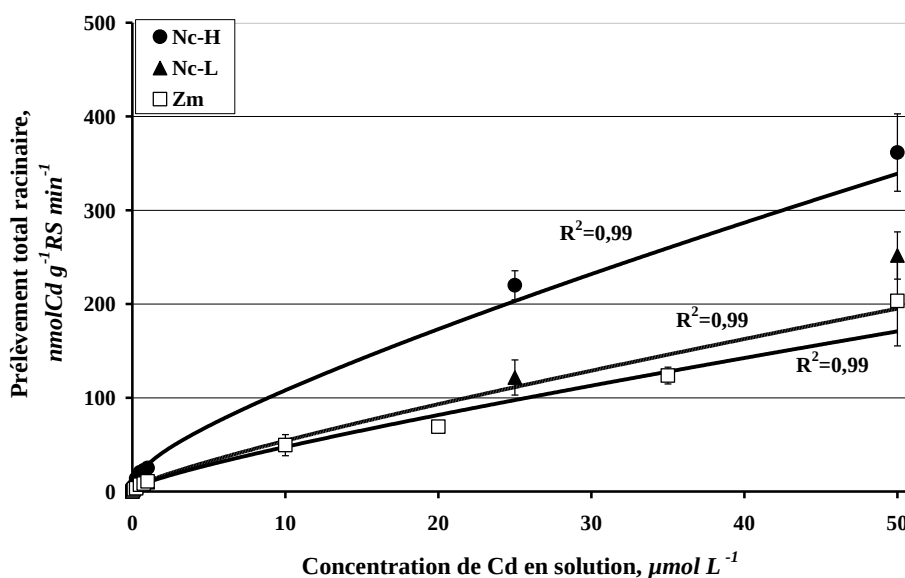
Figure 2-7. Décomposition de l'isotherme d'absorption symplasmique de Zm, Nc-H et Nc-L en composantes saturante et linéaire.

Tableau 2-2. Paramètres cinétiques de l'isotherme d'influx ; pour Nc-H et Nc-L, figurent à la fois les ajustements Michaelis-Menten (MM) et Michaelis-Menten + linéaire (MM + linéaire)

Ecotype	I_{max}	K_m	a	R^2
	$\text{nmol g}^{-1}\text{RS min}^{-1}$	$\mu\text{mol L}^{-1}$	$\text{L nmol g}^{-1}\text{RS min}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$	
Zm	3,82 (0,46)	0,26 (0,06)	0,60 (0,05)	0,97
Tc-H	22,02 (4,29)	0,47 (0,14)	0,22 (0,16)	0,83
Tc-L	3,61 (0,34)	0,06 (0,02)	0,44 (0,07)	0,88

II.4. Isotherme de prélèvement racinaire total

La totalité du Cd prélevé est la somme de toutes les quantités de Cd récupérées dans les différents bains du fractionnement, et du Cd qui n'a pas été extrait des racines. Autrement dit, il s'agit de la somme du Cd symplasmique et du Cd apoplasmique total. En sommant les modèles MM + linéaire et Freundlich, on obtient un très bon ajustement de l'isotherme de prélèvement total du Cd par les racines.

**Figure 2-8. Isotherme de prélèvement racinaire total de Cd.**

L'hyperaccumulateur prélève significativement plus de Cd que les deux autres plantes, sur toute la gamme de concentrations étudiée (Figure 2-8).

III. Discussion

III.1. L'isotherme d'adsorption

Il convient de noter qu'il ne s'agit probablement pas d'une isotherme d'adsorption à l'équilibre, puisqu'aucune étude n'a été menée pour connaître la durée au bout de laquelle l'apoplasme est en équilibre avec la solution externe. C'est pourquoi la masse de Cd adsorbée par unité de masse racinaire est rapportée à l'unité de temps. Il est probable que l'équilibre soit atteint au niveau des parois cellulaires du rhizoderme, mais que les parois du cortex entier tardent à se mettre à l'équilibre puisque le Cd a besoin de plus d'une heure pour atteindre les couches éloignées de l'apoplasme cortical (Seregin et Kozhevnikova, 2008).

Le modèle de Freundlich est le modèle de sorption qui s'ajuste le mieux à nos isothermes d'adsorption (Figure 2-3), ce qui signifie que l'adsorption résulte principalement d'interactions physiques et réversibles et que les parois forment un milieu hétérogène (Perez, 2007). D'autre part, l'ajustement des cinétiques de désorption par le modèle du pseudo-second ordre (Fig. 5) confirme la réversibilité de l'adsorption du Cd sur les parois des cellules racinaires (Ho et McKay, 2000). La présence de Cd non échangé, ainsi que la constante d'affinité $1/n$ inférieure à 1 (Grazia Bridelli et Raimondo Crippa, 2008), confirment l'hétérogénéité des sites d'adsorption, suggérant l'existence de sites d'affinités différentes vis-à-vis du Cd ainsi qu'une porosité variable. L'augmentation de la proportion de Cd non échangée à mesure que la concentration en solution diminue témoigne du remplissage préférentiel des microporosités ou de sites de plus forte affinité pour le Cd.

La similitude des trois plantes quant à la constante d'hétérogénéité de leurs isothermes d'adsorption indique que les groupes réactifs impliqués sont les mêmes dans les trois plantes. En revanche, le fait que l'écotype hyperaccumulateur présente une capacité d'adsorption deux fois plus élevée que l'écotype peu accumulateur du tabouret calaminaire, suggère une concentration plus élevée de sites d'adsorption dans les parois de l'hyperaccumulateur. Cependant, le rôle des parois racinaires dans l'hyperaccumulation des éléments en traces métalliques reste encore mal compris. Par exemple, chez la moutarde des oiseaux, les parois racinaires de la sous-espèce *Brassica pekinensis* ne stockent pas plus de Cd que celles de *Brassica chinensis*, alors que la première accumule davantage de Cd que la seconde (Liu et

al., 2007). Peut-être faut-il chercher le rôle des parois non pas dans leur capacité d'accumulation mais dans leur faculté à augmenter la concentration de Cd au voisinage des membranes plasmiques. Les capacités d'adsorption (K_F) des trois plantes sont dans le même ordre de grandeur, suggérant une densité de sites d'adsorption similaire. Cependant, les racines du tabouret calaminaire et du maïs présentent des structures très différentes, avec un certain nombre de couches cellulaires dans le cortex du maïs, ce qui n'est pas le cas du tabouret calaminaire. Etant donné que la proportion de matériel apoplasmique auquel le Cd a accès est très faible en une heure (une voire deux couches cellulaires seulement), il se peut que cette capacité d'adsorption soit sous-estimée chez le maïs.

III.2. L'absorption symplasmique

III.2.1. La composante saturante de l'influx symplasmique

Les deux espèces présentent dans leur influx symplasmique une composante saturante (Figure 2-7) qui confirme l'existence d'une absorption par des transporteurs membranaires. Etant donné que ce système de transport agit essentiellement aux concentrations externes les plus faibles, il peut être considéré comme un système de transport à forte affinité pour le Cd (High-Affinity Transport System ou « HATS » en anglais), ce qui confirme la composante saturante apportée par la littérature.

III.2.2. K_m ou le paramètre d'hétérogénéité ou d'affinité

La différence est à peine significative entre les K_m des deux espèces, en ce qui concerne le maïs et l'écotype hyperaccumulateur du tabouret des champs (Figure 2-7). Le K_m trouvé pour ce dernier est identique à celui trouvé pour un autre écotipe hyperaccumulateur du Sud de la France (*T. caerulescens* Ganges) (Zhao *et al.*, 2002). Cependant, l'affinité de ces transporteurs apparaît deux fois plus forte (valeur de K_m deux fois plus faible) chez l'écotype non-accumulateur (Nc-L) (Tableau 2-2). De même, les valeurs de K_m obtenues sur Ganges, un autre écotipe hyperaccumulateur du tabouret calaminaire, sont plus élevées que les valeurs trouvées sur des plantes non-accumulatrices comme le maïs (Han *et al.*, 2006), le blé (Harris et Taylor, 2004) ou encore le pois (Cohen *et al.*, 1998). De plus, la littérature rapporte des K_m similaires pour des écotypes contrastés du blé (Hart *et al.*, 1998; Harris et Taylor, 2004) et de *Sedum alfredii* (Lu *et al.*, 2008). Nos résultats confirment donc que l'affinité K_m des transporteurs membranaires n'est pas le principal facteur expliquant le fort prélèvement de métal par les plantes hyperaccumulatrices.

III.2.3. I_{max} ou la vitesse d'absorption maximale

L'influx maximal I_{max} est cinq fois plus élevé chez l'écotype hyperaccumulateur que chez l'écotype non accumulateur (Tableau 2-2). C'est un résultat en accord avec la différence observée entre Ganges et Prayon, deux autres écotypes du tabouret calaminaire dont le premier hyperaccumule le Cd et l'autre non (Lombi *et al.*, 2002). Cela est interprété comme étant dû à une plus forte densité des transporteurs concernés sur les membranes de l'écotype le plus accumulateur. Ce mécanisme a également été mis en évidence dans le cadre du prélèvement du Zn par *T. caerulescens* et *T. arvense* : l'ARN messager du transporteur *ZNT1* est en effet beaucoup plus abondant dans les racines et les parties aériennes de l'hyperaccumulateur que dans celles du non-accumulateur (*T. arvense*), dont l' I_{max} est cinq fois plus faible (Lasat, 2000).

L'influx maximal de Nc-H est également cinq fois plus élevé que chez le maïs (Zm) (Tableau 2-2). Cela pourrait refléter une plus forte densité des transporteurs dans le plasmalemme de Nc-H. Cependant, il n'est pas exclu que la différence d' I_{max} soit simplement due à la différence de structure racinaire entre les deux espèces. En effet, les couches de cellules corticales sont bien plus nombreuses dans le maïs que dans le tabouret calaminaire, ce qui pourrait mener à une différence de ratio entre la surface membranaire disponible et la masse racinaire, créant une différence de vitesse de prélèvement par unité de masse racinaire.

III.2.4. La composante linéaire de l'influx symplasmique ou LATS

Comme indiqué en introduction, la composante linéaire est généralement considérée dans la littérature comme le reflet du Cd non désorbé des parois cellulaires. Cependant, le Cd racinaire était mesuré suite à une désorption insuffisante du Cd apoplasmique, et il n'était pas possible de distinguer clairement la fraction symplasmique de la fraction apoplasmique. D'après notre première méthode de fractionnement visant à isoler le Cd symplasmique du Cd apoplasmique, une composante linéaire symplasmique est mise en évidence (Figure 2-7), révélant un deuxième système de transport, dont le K_m serait probablement trop élevé pour laisser apparaître une saturation dans la gamme de concentrations considérée. Ce serait donc un système de transport à faible affinité pour le Cd (LATS).

La similitude des pentes des deux écotypes du tabouret calaminaire suggère que les deux plantes possèdent le même LATS, tandis que le maïs serait caractérisé par un LATS plus élevé. Bien sûr, la différence de pente entre le tabouret calaminaire et le maïs peut aussi bien refléter la différence de structure racinaire.

IV. Validité du protocole de fractionnement

Deux expérimentations sont ont été réalisées *a posteriori* afin d'éprouver la fiabilité du protocole.

IV.1. Le Cd libéré dans le dernier bain désorbant contient-il du Cd symplasmique ? (Y a-t-il vraiment redistribution ?)

L'objectif de cette expérimentation est de vérifier que du Cd symplasmique s'adsorbe sur les parois lors de son évacuation hors du compartiment intracellulaire, et qu'il est donc nécessaire d'effectuer la dernière désorption pour le récupérer.

Six plantes sont exposées à $0,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Cd radiomarké, pendant 1 h et à concentration constante. Après l'étape de désorption (3 bains désorbants successifs de 10 min chacun à moins de 2°C), les six plantes sont ensuite séparées en deux lots : trois systèmes racinaires sont soumis au traitement des 72 h dans le MC puis des 48 h dans l'eau, tandis que les trois autres sont placés dans l'eau à 4°C pendant ces cinq jours. Chacun des six systèmes racinaires est ensuite transféré dans 180 ml de solution de désorption. La cinétique de désorption est suivie par des prélèvements réguliers d'aliquotes de $250 \mu\text{l}$. Les six systèmes racinaires sont ensuite séchés puis pesés.

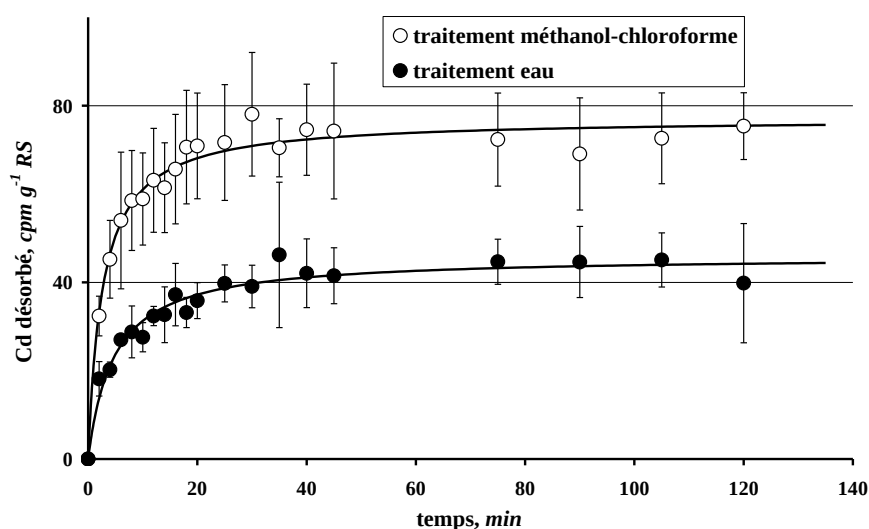


Figure 2-9. Cinétique de désorption du Cd des racines de maïs après une heure d'absorption dans $0,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de CdCl_2 , et 5 jours de traitement ; en blanc, 3 jours dans le MC puis 2 jours dans l'eau à T ambiante ; en bleu, 5 jours dans l'eau à 4°C ($n = 3$).

Les vitesses de désorption sont similaires pour les systèmes racinaires traités au MC puis à l'eau comme pour ceux immergés dans l'eau pendant 5 jours (Figure 2-9). En effet, toutes les deux s'ajustent très bien au modèle du pseudo-second ordre (Ho, 1995) :

$$Q(t) = \frac{q_e k_2 t}{1 + q_e k_2 t} \quad \text{Équation 2-5}$$

q_e représente la quantité de métal désorbée à l'équilibre (nmol g⁻¹RS) pour une efficacité de désorption de 100 % (Singh *et al.*, 2008). k_2 (nmol g⁻¹RS min⁻¹) est la constante de vitesse d'adsorption.

En revanche, les racines traitées au MC libèrent quasiment deux fois plus de Cd par unité de masse racinaire que les racines immergées pendant 5 jours dans l'eau (Tableau 2-3). Or les cellules traitées à l'eau ne sont pas lysées alors que celles traitées au MC sont lysées de manière à permettre l'évacuation du Cd symplasmique. Cela prouve que le bain de désorption réalisé après traitement au MC ne contient pas que du Cd apoplasmique, mais également du Cd symplasmique qui s'est adsorbé aux parois lors de son évacuation hors du compartiment intracellulaire.

Tableau 2-3. Paramètres cinétiques du modèle du pseudo-second ordre ajusté sur les cinétiques de désorption de la Figure 2-8.

Traitement précédant la désorption	q_e ($\mu\text{g g}^{-1}\text{RS}$)	k_2 ($\mu\text{g g}^{-1}\text{RS min}^{-1}$)	R^2
méthanol-chloroforme puis eau	77,1	4,9.10 ⁻³	0,98
eau	45,9	4,6	0,95

IV.2. La fraction apoplasmique échangeable mais non échangée pendant les 30 premières minutes de désorption, est-elle négligeable devant la fraction symplasmique ?

Les cinétiques de désorption permettent de suivre au cours du temps la libération du Cd apoplasmique échangeable dans la solution désorbante. Elle permet en outre d'estimer la quantité totale de Cd apoplasmique échangeable, et d'en déduire la proportion désorbée au cours des 30 minutes de désorption à 2°C.

Après une heure d'absorption dans des solutions d'absorption marquées et contenant 0,05 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 0,75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de CdCl₂, les systèmes racinaires sont immergés dans

une solution désorbante ; le Cd désorbé des racines est décrit au cours temps via des prélèvements réguliers d'aliquotes de 200 ou 250 μL .

Les cinétiques de désorption (Figure 2-10) suivent le modèle du pseudo-second ordre (Ho, 1995). Les trois concentrations testées chez Nc-L montrent que la vitesse de désorption est d'autant plus élevée que la concentration en solution d'absorption est faible (Tableau 2-4). En outre, les cinétiques indiquent que 30 minutes de désorption permettent de désorber 88 à 95 % du Cd échangeable (Tableau 2-4). La désorption est très rapide au cours des 10 premières minutes puis ralentit drastiquement.

Tableau 2-4. Paramètres cinétiques du modèle du pseudo-second ordre ajusté aux cinétiques de désorption pour Nc-L.

Ecotype	concentration initiale en solution d'absorption	q_e (cpm ml^{-1})	k_2 (cpm $\text{ml}^{-1} \text{min}^{-1}$)	R^2	part de q_e désorbé en 30 min (%)
Zm	0,75 μM	265,0	$1,5 \cdot 10^{-3}$	0,96	92
		q_e ($\mu\text{g g}^{-1}\text{RS}$)	k_2 ($\mu\text{g g}^{-1}\text{RS min}^{-1}$)	R^2	
Nc-H	0,05 μM	4,2	$5,7 \cdot 10^{-2}$	0,98	88
Nc-L	0,05 μM	1,7	$1,5 \cdot 10^{-2}$	0,99	88
	0,75 μM	27,6	$1,9 \cdot 10^{-2}$	0,99	94
	50 μM	943,7	$6,6 \cdot 10^{-4}$	0,98	95

D'après nos cinétiques de désorption très bien ajustées au modèle du pseudo-second ordre, les 30 premières minutes de désorption à 2 °C permettent de désorber une large majorité du Cd échangeable (environ 90 %), comme indiqué par la littérature. Cependant, ces 5 à 10 % de Cd échangeable qui ne sont pas désorbés lors de cette désorption risquent d'être désorbés lors du dernier bain désorbant sensé récupérer du Cd symplasmique. Dans le Tableau 2-5, nous estimons la part de Cd apoplasmique dans le total de Cd désorbé au cours du dernier bain désorbant. Il s'agit de $(q_e - Q_{\text{apop échangé}}) \cdot 100 / \text{Cd total dans le bain désorbant}$. Les calculs sont réalisés en supposant que seuls 5 % du Cd échangeable (q_e) se désorbe dans ce bain.

Tableau 2-5. Pourcentage de Cd apoplasmique dans la fraction considérée comme symplasmique, en estimant que 95 % du Cd échangeable (q_e) ont été désorbés avant le traitement au méthanol-chloroforme

Pourcentage de Cd apoplasmique dans la fraction considérée comme symplasmique			
Concentration de Cd en solution	Maïs	Nc-H	Nc-L
0,25 μM	3%	1%	4%
1 μM	7%	2%	7%
50 μM	22%	57%	69%

D'après nos calculs, le Cd apoplasmique représente une part non négligeable du Cd désorbé dans le dernier bain désorbant, en particulier pour les concentrations externes supérieures à 1 μ M, où il représente entre 10 et 80 % du Cd désorbé ! Cette fraction correspond certainement au Cd désorbé des racines non traitées au MC (Figure 2-9). Par conséquent, la fraction symplasmique pourrait être fortement surestimée au niveau des concentrations externes les plus élevées de l'isotherme d'absorption. C'est pourquoi une autre méthode de fractionnement est mise en place, en suivant au cours du temps la désorption apoplasmique avant et après extraction du Cd symplasmique.

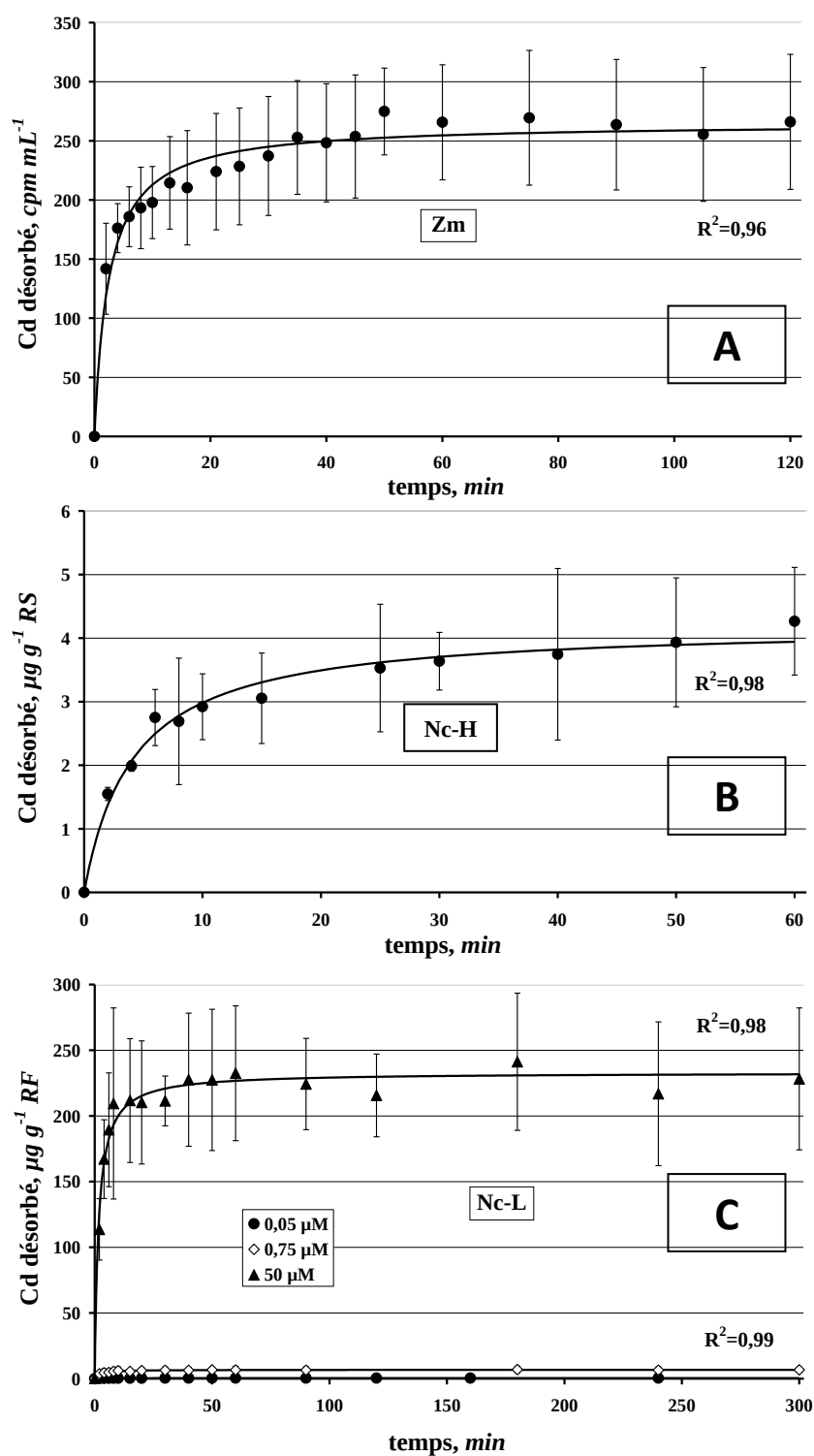


Figure 2-10. (A) Cinétique de désorption du Cd des racines de Zm, après une heure d'absorption dans 0,75 μmol.L⁻¹ de CdCl₂ (n = 3). (B) Cinétique de désorption du Cd des racines de Nc-H après une heure d'absorption dans 0,05 μmol.L⁻¹ de CdCl₂ (n = 3). (C) Cinétique de désorption du Cd des racines de Nc-L après une heure d'absorption dans des solutions de CdCl₂ (n=3)

Chapitre 2. Mesure à court terme des paramètres cinétiques de l'absorption racinaire du Cd : fractionnement du Cd racinaire à l'azote liquide et confirmation des deux systèmes de transport membranaire

Dans la méthode de fractionnement employée précédemment, il est probable que la part de Cd symplasmique soit significativement surestimée, en particulier aux fortes concentrations d'exposition. En effet, une part non négligeable du Cd apoplasmique serait comptabilisée à tort comme appartenant au compartiment symplasmique. Par conséquent, les conclusions du précédent chapitre méritent d'être confortées par une autre méthode permettant de séparer les deux fractions de Cd de façon plus rigoureuse.

Ce deuxième chapitre présente un deuxième protocole de séparation des composantes apoplasmique et symplasmique.

I. Matériels et méthodes

I.1. Culture des plantes et exposition au Cd radiomarké

Cette expérimentation porte uniquement sur le maïs, Zm, et notre écotype hyperaccumulateur du tabouret calaminaire, Nc-H, en raison de la lourdeur de l'expérimentation. Après deux semaines de germination, Nc-H est d'abord cultivé en aéroponie durant trois semaines pour limiter les pertes souvent observées en début de culture hydroponique. La culture en aéroponie est réalisée grâce à un bac (chambre racinaire) en polyester contenant un fond de solution nutritive (12 L) qu'un brumisateur électrique transforme en très fines gouttelettes. Les plantes reposent sur des plaques de polystyrène perforées, posées sur le bac et laissant les racines pendre dans la chambre brumisée. Après trois semaines de culture en aéroponie, les plantes sont transférées en hydroponie pour y être cultivées pendant 6 semaines. Le maïs est cultivé en hydroponie pendant 12 jours (partie 2 chapitre 1).

Au terme de la culture, les plantes sont transférées dans des erlenmeyers de 650 ml pour y être exposées à du Cd marqué dans les mêmes conditions que dans l'expérimentation précédente (partie 2 chapitre 1). L'isotherme d'absorption est construite à partir de 8 concentrations externes en Cd : $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, $1 \mu\text{mol L}^{-1}$, $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, $20 \mu\text{mol L}^{-1}$, $35 \mu\text{mol L}^{-1}$ et $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. L'isotherme d'absorption est établie à partir de 4 et 5 répétitions par concentration pour Zm et Nc-H respectivement. Après les 60 minutes d'absorption à concentration constante, les systèmes racinaires sont brièvement rincés dans de l'eau distillée

puis séparés des parties aériennes. Celles-ci sont alors séchées pour un dosage du ^{109}Cd au compteur gamma.

I.2. Fractionnement des isothermes d'absorption à l'azote liquide

Les systèmes racinaires sont transférés dans une succession de solutions de désorption de 80 ml, au sein de bains-marie glacés. Il s'agit de la même solution de désorption que celle exposée dans le chapitre précédent. Pour les plants de maïs, cette série de désorptions dure 270 minutes, avec une interruption à $t = 90$ min par une immersion des systèmes racinaires dans l'azote liquide (-196°C) pendant 2 minutes (Reid et Liu, 2004). Pour le tabouret calaminaire, la congélation n'intervient qu'après 180 minutes de désorption. En effet, la congélation doit avoir lieu lorsque la cinétique de désorption atteint quasiment un plateau (Reid et Liu, 2004). Le moment de la congélation ($t = 90$ min pour le maïs et $t = 180$ min pour le tabouret calaminaire) a été choisi suite à de nombreuses expérimentations préliminaires visant à décrire la cinétique de désorption du Cd racinaire pour les deux plantes.

Etant donné que les deux minutes dans l'azote liquide congèlent totalement les racines, le premier bain de désorption suivant est placé dans un bain-marie d'eau chaude tandis que la solution est agitée à l'aide d'un cône en plastique : ainsi, le système racinaire est ramolli et le contenu intracellulaire peut être évacué par les cassures provoquées lors de la congélation. Tous les bains de désorptions suivants se font à nouveau dans le bain-marie glacé.

Une des principales difficultés de l'expérimentation est de faire passer le système racinaire d'un bain à l'autre, sachant que l'azote liquide fragmente les racines. Avant congélation, les systèmes racinaires sont pêchés à la pince pour être transférés d'un pot de solution de désorption à l'autre. En revanche, les segments racinaires étant fragmentés après la décongélation, le renouvellement de la solution de désorption a lieu dans un même pot jusqu'à la fin de la cinétique de désorption : chaque bain de désorption est évacué à travers un morceau de tissu qui retient tous les segments racinaires à l'intérieur du pot. Nous avons vérifié au préalable que ce tissu synthétique n'adsorbe pas le Cd et que sa maille est suffisamment serrée pour empêcher les fragments racinaires de le traverser.

I.3. Dosage du Cd

Le Cd radioactif récupéré dans les différents bains de désorption est dosé via des aliquotes de 20 ml filtrées à $0,22\ \mu\text{m}$: cette filtration est une précaution qui s'avère utile lorsque des poils absorbants ou de fins segments racinaires traversent le tissu au cours des désorptions

successives. Le Cd contenu dans ces échantillons de 20 ml est dosé par spectrométrie gamma. Les segments racinaires récupérés à la fin du protocole sont quant à eux rassemblés en pelotes avant d'être séchés à l'étuve (72°C) pendant trois jours ; les pelotes sèches sont pesées puis leur contenu en Cd est dosé au compteur gamma (comme dans le chapitre 1). Le comptage du ^{109}Cd dans l'échantillon minéralisé est estimé par le biais de la relation linéaire entre les comptages sur échantillon broyé et échantillon minéralisé.

I.4. Analyse de données

Comme dans le chapitre 1 de la Partie 2, la radioactivité mesurée dans les parties aériennes ne dépasse pas les limites de quantification. Les isothermes d'absorption sont donc réalisées à partir du Cd quantifié dans les différentes fractions racinaires. Les ajustements sont réalisés sur le logiciel KaleidagraphTM.

Le Cd désorbé des racines au cours du temps jusqu'à la congélation suit le modèle du pseudo-second ordre (Ho et McKay, 2000). Les isothermes d'adsorption apoplasmique sont modélisées par la fonction de Freundlich. Les isothermes de prélèvement symplasmique sont quant à elles ajustées soit par une fonction linéaire combinée à une fonction michaëlienne, soit par la somme de deux fonctions michaëliennes. Tous les ajustements sont obtenus après transformation logarithmique des valeurs obtenues pour chacune des plantes. Les paramètres cinétiques donnés par KaleidagraphTM n'étant pas comparables par un test de Student, la différence entre deux paramètres est considérée significative lorsque leurs intervalles de confiance ne se chevauchent pas.

II. Résultats

II.1. Fractionnement du Cd racinaire par la méthode à l'azote liquide

II.1.1. Les cinétiques de désorption issues du protocole du fractionnement du Cd racinaire

Tout au long des bains de désorption successifs, les racines perdent le métal qu'elles ont préalablement accumulé pendant l'heure d'exposition. Ainsi, le Cd racinaire total (Q_0), qui apparaît au début de la cinétique ($t=0$), est calculé en sommant le Cd évacué dans tous les bains de désorption avec le Cd restant dans les racines à la fin de l'expérimentation (Q_f). A partir de cette valeur du Cd total racinaire, le Cd restant dans les racines au cours de la désorption est représenté au cours du temps, en soustrayant à chaque pas de temps la quantité de Cd évacuée dans le bain de désorption correspondant (Figure 2-11).

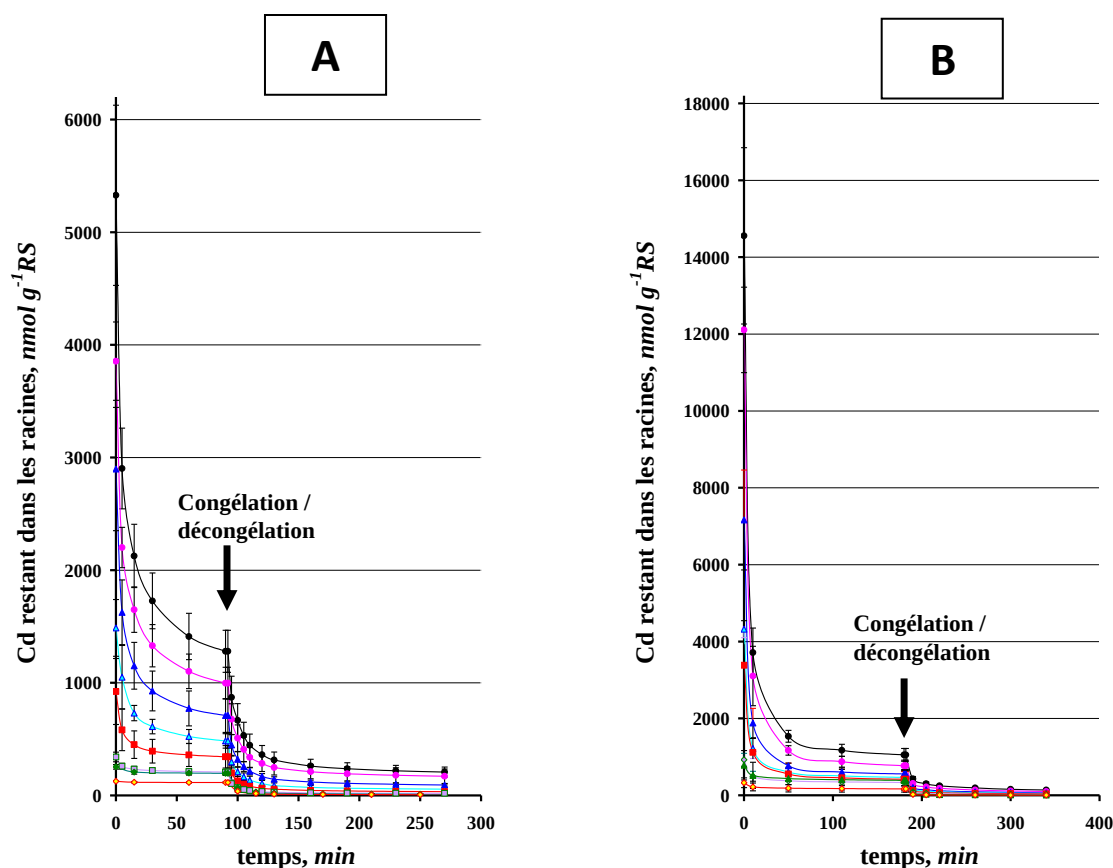


Figure 2-11. Cd restant dans les racines de maïs (A) et de tabouret calaminaire (B) au cours du protocole de fractionnement, après une heure d'exposition à 650 ml de solution contenant 0,5 mM CaCl_2 , 2 mM MES et une concentration de CdCl_2 variant de 0,05 à 50 μM . Les racines subissent une série de bains de désorptions successifs, interrompue par une étape de congélation/décongélation, à $t = 90$ min pour le maïs, et $t = 180$ min pour le tabouret calaminaire. Les symboles représentent les valeurs moyennes de quatre et cinq répétitions pour le maïs et le tabouret calaminaire respectivement.

La libération du Cd racinaire sature clairement avant l'étape de congélation des racines, tandis que la décongélation entraîne une évacuation massive de métal dans la solution de désorption. Cette libération de Cd suite à la congélation/décongélation est causée par la rupture des parois et des membranes cellulaires, entraînant l'enrichissement des bains de désorption en Cd intracellulaire (Reid et Liu, 2004). A la fin de l'expérimentation, la désorption du Cd ralentit à nouveau comme avant la congélation. Pour chacune des concentrations externes de Cd (0,05 à 50 μM), et pour chacune des répétitions, le protocole de fractionnement conduit à des courbes de même allure, avec trois phases distinctes : la phase 1 de désorption rapide puis saturante avant la congélation des racines, la phase 2 avec une brusque libération de Cd, et la phase 3 de désorption lente, qui démarre lorsque la pente de la cinétique rejoint la pente de la courbe au moment de la congélation (Figure 2-12). L'allure de ces courbes en trois phases bien

distinctes témoigne de la possibilité de quantifier distinctement le métal des fractions apoplasmique et symplasmique (Reid et Liu, 2004).

II.1.2. Quantification des fractions apoplasmique et symplasmique

Le métal se désorbant dans la phase 1 correspond à de la désorption apoplasmique tandis que l'étape de congélation et de décongélation assure la libération du métal intracellulaire au cours de la phase 2 (Reid et Liu, 2004). En effet, lorsque les racines sont rapidement immergées dans l'azote liquide, dont la température d'ébullition est de -196°C , l'eau qu'elles contiennent se solidifie et prend de l'expansion. Cette expansion ainsi que la formation de cristaux de glace tranchants causent la rupture des membranes et des parois cellulaires. Au cours de la phase 3, le métal ne se désorbe que très lentement, et proviendrait du compartiment apoplasmique. Dans les travaux de Reid et Liu (2004), cette fraction apoplasmique est considérée négligeable devant le métal libéré dans la phase 2 ; elle est alors comptabilisée comme provenant du milieu intracellulaire : le métal désorbé avant la congélation est considéré apoplasmique, et tout le métal restant dans les racines est considéré comme symplasmique. En revanche, dans nos conditions expérimentales, nos calculs montrent que cette dernière phase n'est pas négligeable devant la fraction symplasmique, en particulier aux fortes concentrations d'exposition. Nous cherchons donc à situer la limite entre les phases 2 et 3 de manière à quantifier le métal restant dans l'apoplasme après la phase de libération du métal intracellulaire.

En extrapolant la phase 1 par le biais d'une fonction d'ajustement (en général, $Q_t = a - (bt/c+t)$), et en translatant la supposée phase 3 de la hauteur appropriée, l'ensemble des points s'ajuste à la même fonction, avec des paramètres non significativement différents (Figure 2-13). Pour chacune des plantes, la limite entre les phases 2 et 3 est alors déterminée de telle sorte à obtenir le meilleur ajustement. Il est donc possible de tracer la cinétique de désorption que les racines auraient présentée en l'absence de congélation/décongélation.

C'est ainsi que les phases 1 et 3 seront imputées à la désorption apoplasmique, et que la phase 2 représentera la libération du Cd intracellulaire. La limite entre les phases 2 et 3 se trouve en général 40 minutes après la décongélation, soit à $t = 130$ min pour le maïs, et à $t = 220$ min pour le tabouret calaminaire. Cette limite est parfois décalée de quelques dizaines de minutes supplémentaires, sans que cela ne modifie significativement les quantités moyennes de Cd libérées au cours des 40 minutes. Les hauteurs de translation $Q_{90} - Q_{130}$ pour le maïs, et $Q_{180} - Q_{220}$ pour le tabouret calaminaire, permettent donc d'estimer les quantités de Cd accumulées

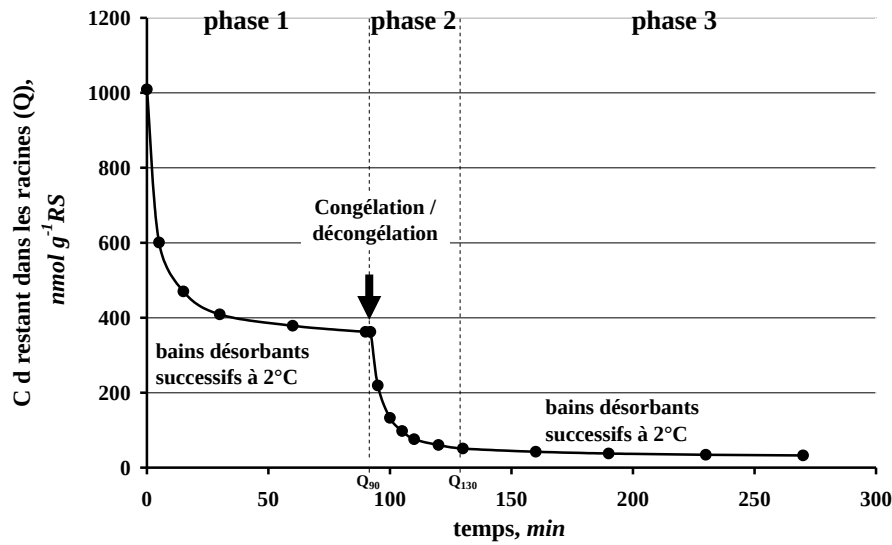


Figure 2-12. Cd restant dans le système racinaire d'un plant de maïs au cours du protocole de fractionnement, après une heure d'absorption dans 650 ml de solution contenant 0,5 mM CaCl_2 , 2 mM MES et 5 mM CdCl_2 . Le système racinaire subit une série de désorptions successives, interrompue par une étape de congélation de 2 min (t_{90} à t_{92}).

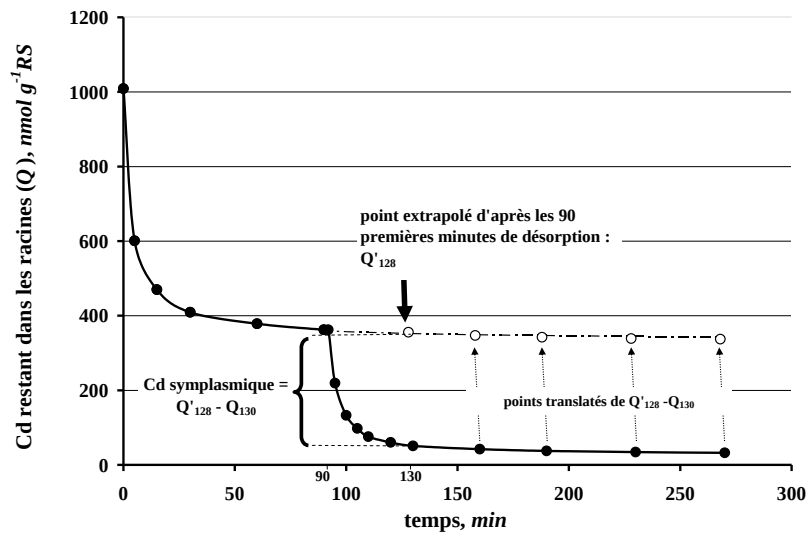


Figure 2-13. (a) Cd restant dans le système racinaire d'un plant de maïs au cours du protocole de fractionnement, après une heure d'absorption dans 650 ml de solution contenant 0,5 mM CaCl_2 , 2 mM MES et 5 mM CdCl_2 ; le système racinaire subit une série de désorptions successives interrompue par une étape de congélation de 2 minutes. (b) Obtention des symboles blancs : Q_{ex130} provient de l'extrapolation des points précédant la congélation, et les points suivants sont issus d'une translation de la hauteur $Q_{ex90} - Q_{130}$.

dans le symplasme racinaire au cours des 60 minutes d'exposition au métal. La quantité racinaire de Cd apoplasmique est alors estimée en soustrayant la quantité de Cd symplasmique à la quantité de Cd total (Q_0) (Figure 2-13).

Le Cd désorbé de l'apoplasme en fonction du temps (Figure 2-14) est particulièrement bien ajusté par le modèle du pseudo-second ordre (Ho, 1995) (Equation 2-6), avec des coefficients directeurs supérieurs à 0,9 pour chaque plante considérée individuellement comme pour les cinétiques moyennes pour chaque concentration (voir annexe).

$$Q(t) = \frac{q_e k_2 t}{1 + q_e k_2 t} \quad \text{Équation 2-6}$$

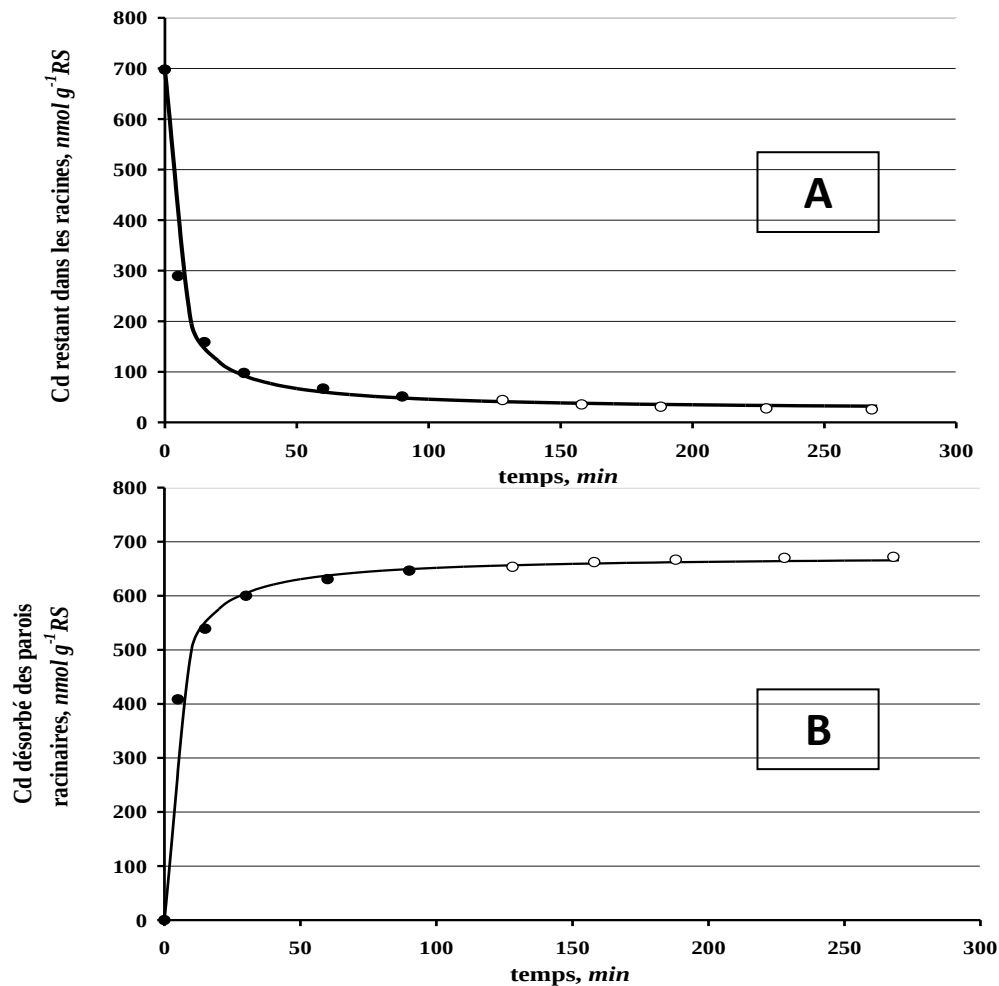


Figure 2-14. (A) Cd restant dans le système racinaire après suppression de la phase 2 (voir figure précédente) ; (B) Cd désorbé des racines, après suppression de la phase 2.

Rappelons que k_2 est la constante de vitesse de la désorption tandis que q_e représente la quantité totale échangeable à l'équilibre et avec 100 % d'efficacité. Dans la suite du texte, la valeur q_e estimée d'après l'ajustement du pseudo-second ordre est donc appelé « Cd échangeable », à différencier de Q_{apo} qui représente la quantité totale de Cd apoplasmique (somme du Cd apoplasmique échangé au cours de la cinétique et du Cd resté sorbé sur les parois à la fin de l'expérimentation). Plus la concentration d'exposition des racines au Cd est élevée, plus la quantité de Cd désorbée à l'équilibre est importante.

II.2. Parts relatives des fractions apoplasmique et symplasmique

Une partie du Cd prélevé est sorbée par les parois pectocellulosiques, tandis que le reste traverse les parois et les membranes et atteint le compartiment intracellulaire. L'importance des parois dans le prélèvement racinaire du Cd est très fortement liée à la concentration du métal dans la solution externe. Dans le cas de Zm comme dans celui de Nc-H, la proportion apoplasmique est d'autant plus élevée que le Cd en solution est concentré ; de manière concomitante, la part de Cd symplasmique augmente à mesure que la concentration de Cd en solution diminue (Figure 2-15). Aux basses concentrations ($< 1 \mu\text{M}$), la quantité de métal absorbée à travers les membranes dépasse la quantité sorbée sur les parois, comme nous l'avait montré le chapitre précédent.

Les courbes sont ajustées par une fonction Michaëlis-Menten-plus-constante, ce qui permet d'estimer les parts de Cd dans les deux fractions dans des conditions limites de concentrations externes. La part de Cd apoplasmique chez l'hyperaccumulateur tend vers 43 % lorsque la concentration externe tend vers 0, tandis que celle du maïs tend vers 8% seulement. Aussi, lorsque le Cd atteint de très fortes concentrations en solution, la part apoplasmique atteint 95% chez Nc-H, alors qu'elle atteint à peine 80 % chez Zm.

II.3. Isothermes d'adsorption du Cd sur les parois des racines

Les quantités totales de Cd accumulées dans l'apoplasme racinaire permettent d'obtenir la relation entre la vitesse de prélèvement apoplasmique (V_{apo}) et la concentration de Cd en solution (Figure 2-16). D'autre part, la désorption du Cd apoplasmique au cours du temps, très bien ajustée par le modèle du pseudo-second ordre, permet d'estimer la fraction apoplasmique « échangeable », q_e . Ces valeurs de q_e permettent de tracer une isotherme d'adsorption qui ne considère quant à elle que le métal apoplasmique « échangeable ». Les deux isothermes (celle

du Cd apoplasmique total et celle du Cd apoplasmique échangeable) sont modélisées par le modèle de Freundlich, dont les paramètres sont exposés dans le Tableau 2-6.

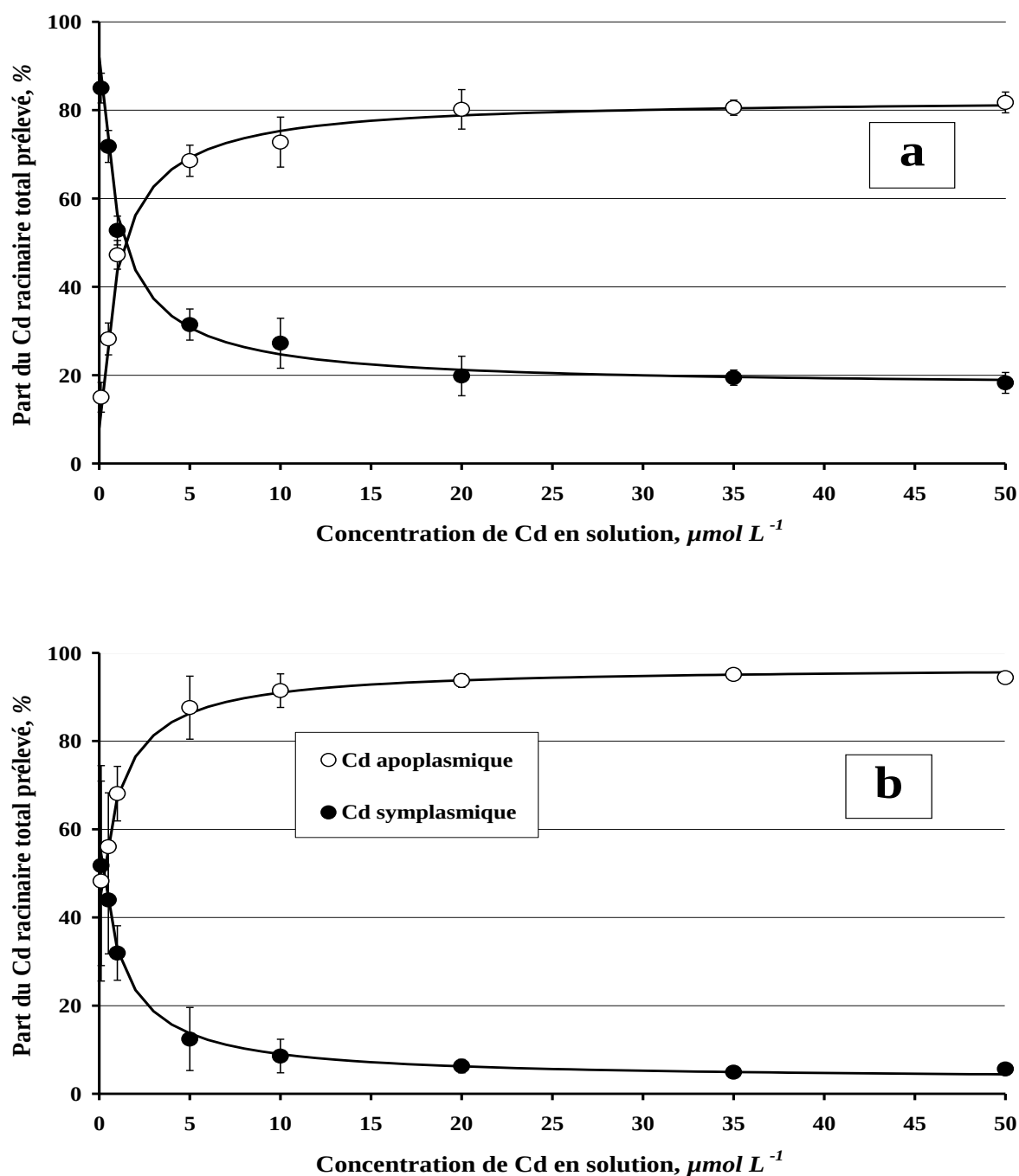


Figure 2-15. Distribution du Cd dans les compartiments racinaires apoplasmique et symplasmique de Zm (a) et Nc-H (b), en fonction de la concentration en solution.

Concernant le Cd apoplasmique total, le paramètre d'hétérogénéité ($1/n$) vaut 0,9 pour le maïs et 0,8 pour le tabouret calaminaire. La capacité d'adsorption (K_F) est quant à elle 5 à 6 fois plus élevée chez le tabouret calaminaire que chez le maïs. Dans le cas de Nc-H, les constantes de Freundlich mesurées à partir du Cd apoplasmique total ou à partir du Cd apoplasmique échangeable sont sensiblement identiques. En effet, les proportions de Cd non échangeable ($((Q_0 - q_e)/100Q_0, \%)$), sont inférieures à 1 % pour toutes les concentrations au-dessus de 1 μM , et ne dépassent pas 4 % pour les concentrations comprises entre 0,1 et 1 μM (Tableau 2-7). En ce qui concerne le maïs, la capacité d'adsorption K_F est plus faible lorsque la modélisation est réalisée à partir des valeurs de q_e . En effet, le Cd apoplasmique non échangeable s'élève entre 2,2 et 4,4 % du Cd apoplasmique total pour les concentrations supérieures à 1 μM , et atteint une proportion de 33 % pour les concentrations les plus basses.

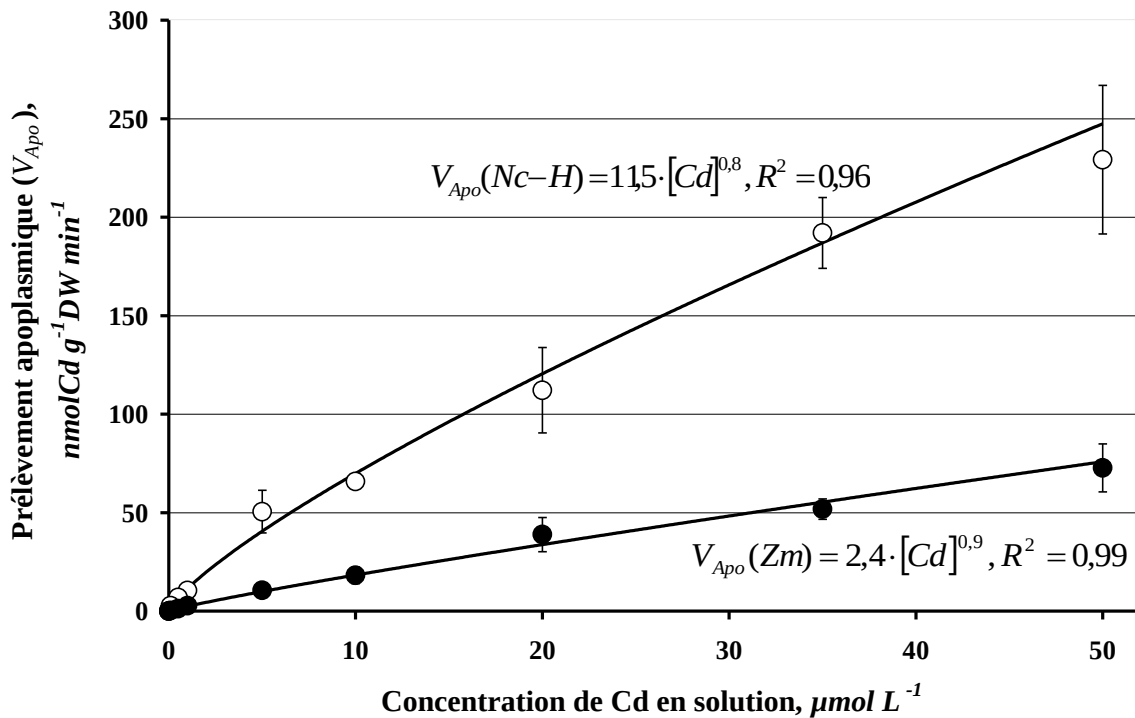


Figure 2-16. Isotherme d'adsorption du Cd sur les parois racinaires de Zm et de Nc-H, après une heure d'exposition à du Cd à concentrations constantes.

Tableau 2-6. Paramètres de Freundlich associés aux isothermes d'adsorption apoplasmique de Zm et Nc-H.

plante	fraction apoplasmique	K_F (L nmol g ⁻¹ DW min ⁻¹ μmol ⁻¹)	$1/n$	R^2
Maïs	estimée par les valeurs de q_e^a	1,97 (0,11)	0,94 (0,02)	0,98
	estimée par les valeurs de V_{Apo}^b	2,40 (0,1)	0,88 (0,02)	0,99
Tabouret calaminaire	estimée par les valeurs de q_e^a	11,88 (0,75)	0,77 (0,03)	0,95
	estimée par les valeurs de V_{Apo}^b	11,46 (0,73)	0,79 (0,03)	0,96

Tableau 2-7. Pourcentage de Cd non échangeable par rapport au Cd apoplasmique total (moyennes +/- écart-type).

	concentration en solution (μmol L ⁻¹)	(apopl total - qe) * 100 / apopl total
Nc-H	50	0,08 ± 0,90
	35	-0,16 ± 0,85
	20	0,15 ± 0,63
	10	0,66 ± 0,92
	5	0,37 ± 1,05
	1	3,56 ± 1,94
	0,5	1,97 ± 4,19
	0,1	4,03 ± 6,72
Zm	50	3,58 ± 0,96
	35	4,12 ± 2,26
	20	2,38 ± 0,57
	10	2,24 ± 3,65
	5	4,26 ± 0,59
	1	10,74 ± 3,90
	0,5	15,38 ± 6,51
	0,1	33,35 ± 20,76

Comme dans les résultats obtenus par la première méthode de fractionnement, la part de Cd non échangeable est d'autant plus importante que la concentration externe est faible.

II.4. Isothermes d'absorption symplasmique

Les résultats du fractionnement à l'azote liquide confirment la décomposition de l'isotherme d'absorption symplasmique en une composante saturante et une composante linéaire (Figure 2-18), selon le modèle suivant :

$$I_s = \frac{I_{\max} [Cd]}{K_m + [Cd]} + a[Cd] \quad \text{Équation 2-7}$$

Ce modèle s'ajuste aussi bien sur le maïs que sur le tabouret calaminaire.

Dans le cas du maïs, la deuxième composante peut également être modélisée par une fonction maichaëlienne, mais avec un K_m bien plus élevé que celui de la première composante saturante (b) :

$$I_s = \frac{I_{\max} [Cd]}{K_m + [Cd]} + \frac{I_{\max}' [Cd]}{K_m' + [Cd]} \quad \text{Équation 2-8}$$

Tableau 2-8. Paramètres cinétiques du prélèvement symplasmique de Cd par les racines de Zm et de Nc-H

plante	$I_{\max}$ (nmol g ⁻¹ RS min ⁻¹)	K_m (μM)	a (L nmol g ⁻¹ RS min ⁻¹ μmol ⁻¹)	R^2
Maïs	3,29 (0,24)	8,77 10 ⁻² (2,29 10 ⁻²)	2,74 10 ⁻¹ (2,29 10 ⁻¹)	0,96
Tabouret calaminaire	4,99 (0,59)	9,79 10 ⁻² (4,53 10 ⁻²)	1,40 10 ⁻¹ (3,61 10 ⁻¹)	0,58

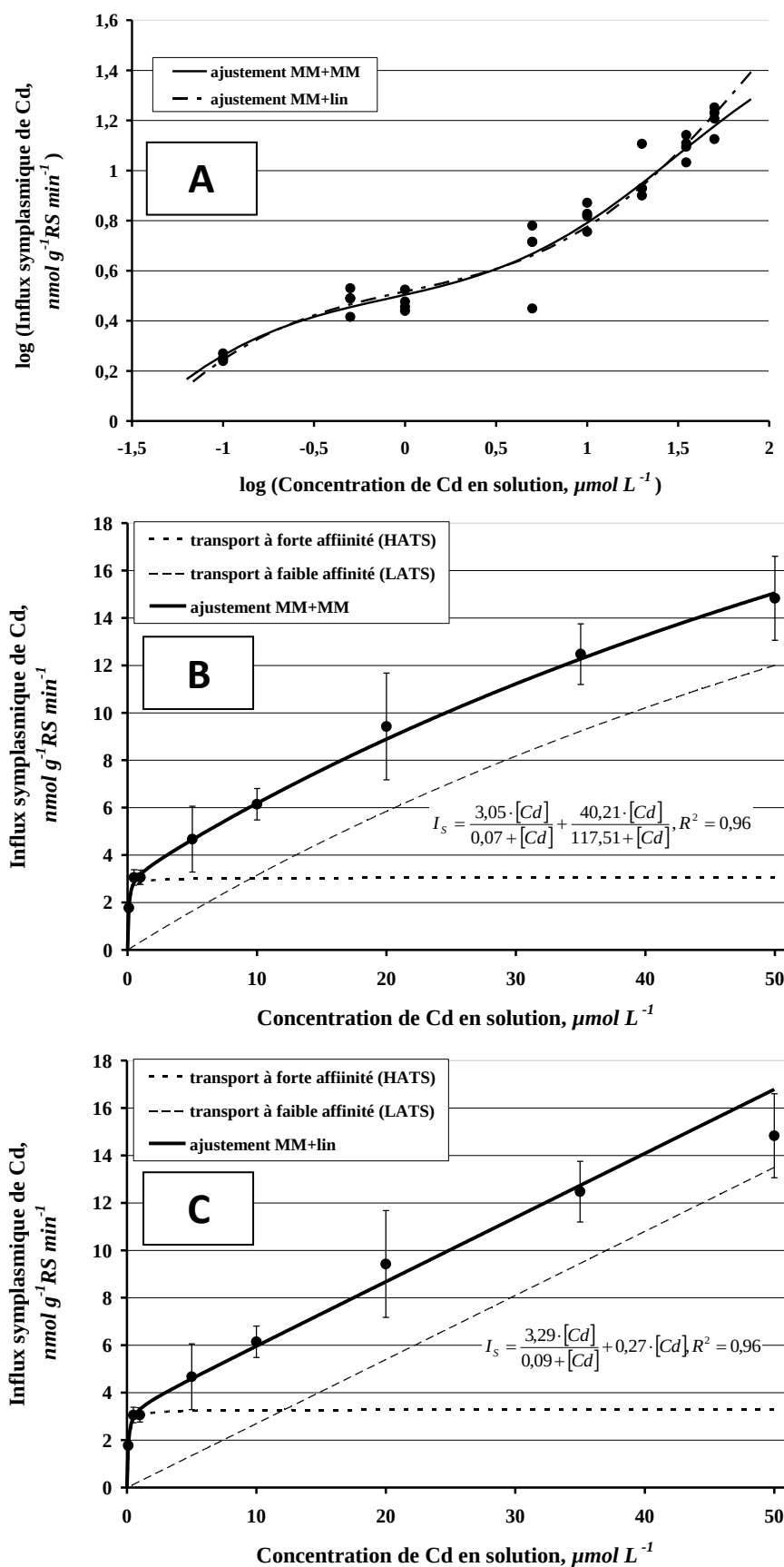


Figure 2-17. Représentation logarithmique de l'isotherme d'absorption symplasmique du Cd par le maïs, après une heure d'exposition à 650 ml de solution contenant 0,5 mM

CaCl_2 , 2 mM MES et une concentration de CdCl_2 variant de 0,05 à 50 μM (A). Décomposition de l'isotherme d'influx symplasmique du maïs en deux composantes michaéliennes (B). Décomposition de l'isotherme d'influx symplasmique du maïs en une composante mickaélienne et une composanté linéaire (C).

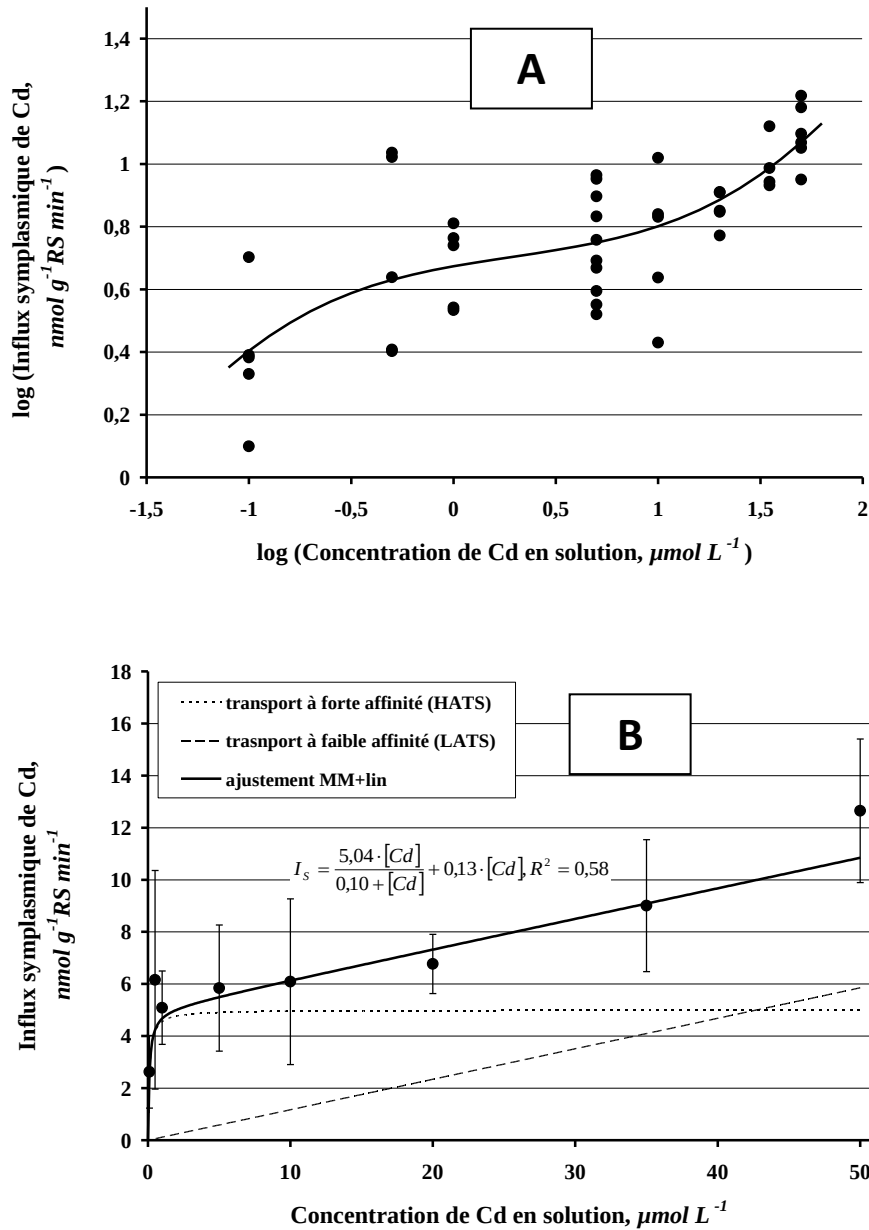


Figure 2-18. Représentation logarithmique de l'isotherme d'absorption symplasmique du Cd par le tabouret calaminaire, après une heure d'exposition dans 650 ml de solution contenant 0,5 mM CaCl_2 , 2 mM MES et une concentration de CdCl_2 variant de 0,05 à 50 μM (A). Décomposition de l'isotherme d'influx symplasmique du tabouret calaminaire en une composante michaélienne et une composante linéaire (B).

III. Discussion

III.1. L'influx apoplasmique

La modélisation des isothermes d'adsorption apoplasmique par la fonction de Freundlich (Tableau 2-8) est en accord avec l'hétérogénéité bien connue des parois cellulaires, et suggère que l'adsorption du Cd est réversible (Pérez *et al.*, 2007). D'après nos cinétiques de désorption, la libération de Cd est très forte durant les 10 premières minutes, puis ralentit sensiblement jusqu'à parvenir à un quasi-plateau. Cette allure de cinétique serait due à l'existence de différentes forces de liaison entre le Cd et les groupes réactifs des parois cellulaires : le Cd compris dans l'espace libre intercellulaire serait facilement échangeable tandis que le métal situé dans les structures microporeuses serait fixé plus fortement. L'ajustement des cinétiques de désorption au cours du temps par le modèle du pseudo-second ordre traduit également le caractère échangeable de la sorption apoplasmique du métal.

III.2. Le système de transport à forte affinité

Les deux espèces présentent une composante d'influx michaëlienne avec un K_m faible de l'ordre de 0,1 μM . Cette composante confirme l'existence d'un système de transport à forte affinité pour le Cd (HATS). La question de la spécificité de ce HATS est encore sans réponse, bien qu'il semble que le Cd^{2+} emprunte des transporteurs appartenant aux familles Nramp et ZIP et qui assurent le passage transmembranaire d'autres cations en traces comme Zn^{2+} , Cu^{2+} ou encore Fe^{2+} , pour lesquels ils ont une forte affinité (partie 1).

Les I_{max} obtenus par la deuxième méthode (LN2) ont des valeurs plus faibles qu'avec la première méthode de fractionnement, d'une part à cause d'une désorption plus efficace, mais surtout parce que les plantes ont accumulé plus de Cd lors de la première expérimentation (pour des raisons inconnues). L'influx maximal de Cd dans le compartiment intracellulaire (I_{max}), qui est 1,5 fois plus élevé chez l'hyperaccumulateur que chez le maïs, pourrait indiquer une plus forte expression des transporteurs à forte affinité pour le Cd. Cependant, pour une même biomasse racinaire, il se peut que le maïs et le tabouret calaminaire n'offrent pas la même surface membranaire d'absorption, en raison de la différence notoire de structure racinaire entre les deux plantes. En revanche, l' I_{max} de notre écotype hyperaccumulateur est dans le même ordre de grandeur que celui trouvé pour d'autres hyperaccumulateurs de l'espèce *N. caerulescens* (Ganges et Viviez), et se révèle deux à cinq fois plus élevé que ceux mesurés sur un écotype non accumulateur de la même espèce (Prayon) (Tableau 2-8). Ces

considérations alimentent l'hypothèse d'une plus forte expression des transporteurs de Cd chez les écotypes hyperaccumulateurs (Lombi *et al.*, 2001).

Contrairement à I_{max} , K_m est un paramètre indépendant de la structure racinaire. C'est pourquoi les K_m similaires mesurés sur le maïs et le tabouret calaminaire suggèrent que les deux espèces, bien que contrastées, empruntent probablement les mêmes mécanismes de transport membranaire. Cependant, nos valeurs de K_m sont clairement plus faibles que celles rapportées par la littérature sur les mêmes espèces. Ceci pourrait être dû à la méthode que nous avons employée pour séparer les composantes du prélèvement racinaire : notre séparation est basée sur un fractionnement physique qui permet de distinguer clairement les fractions apoplasmique et symplasmique, tandis que les K_m rapportés dans la littérature sont probablement surestimés à cause d'une désorption incomplète du Cd apoplasmique.

III.3. Le système de transport à faible affinité

Notre seconde méthode de fractionnement, qui assure une séparation plus rigoureuse des compartiments apoplasmique et symplasmique, confirme une composante symplasmique linéaire. Nos résultats prouvent ainsi l'existence d'un deuxième système de transport membranaire du Cd. Cette voie peut être considérée comme un système de transport à faible affinité (LATS), pouvant faire intervenir des protéines-canaux et/ou des transporteurs dont le K_m serait particulièrement élevé. En effet, le K_m de ce LATS a pu être estimé dans le cas du maïs, et serait trop élevé dans le cas de l'hyperaccumulateur pour pouvoir être évalué.

La mise en évidence d'un LATS pour le transport du Cd n'est pas en contradiction avec les isothermes d'absorption effectuées sur des cellules animales (Endo, 2002; Lecoeur *et al.*, 2002; DelRaso *et al.*, 2003) et des organites végétaux (Hinkle *et al.*, 1987). De plus, on a montré à travers un colorant fluorescent (the 5-nitrobenzothiazole coumarin, BTC-5N) que des canaux faiblement sélectifs, perméables à la fois au calcium et au potassium, étaient impliqués dans l'absorption du Cd à travers les membranes des cellules racinaires du blé (Lindberg *et al.*, 2004). Le LATS tend à contrôler l'influx symplasmique aux plus fortes concentrations, comme c'est le cas pour les éléments essentiels tels le Zn (Hacisalihoglu *et al.*, 2001). Ce LATS serait constitué de protéines membranaires n'ayant que peu d'affinité pour le Cd. Parmi ces protéines de transport, citons les canaux comme ceux destinés au Ca, au Mg ou encore au K, mais également des transporteurs membranaires comme LCT1, qui assure le transport à faible affinité de Na, Ca, K et Cd, ou ZNT1 (partie 1).

La similitude de pente pour les deux populations de tabouret calaminaire Nc-H et Nc-L (Tableau 2-2) suggère que les deux écotypes possèdent le même système de transport à faible affinité pour le Cd. En revanche, la pente du LATS est deux fois plus forte chez le maïs que chez le tabouret calaminaire, ce qui pourrait refléter une plus forte expression des transporteurs à faible affinité ; cette différence de pente entre les deux plantes peut néanmoins s'expliquer également par la différence de structure racinaire entre les deux plantes ; en effet, la surface apparente racinaire ne rend pas bien compte de la surface réelle d'absorption membranaire au cours des 60 minutes d'exposition au Cd.

L'existence d'un LATS chez des espèces aussi distantes phylogénétiquement que le maïs et le tabouret calaminaire, suggère sa possible généralisation à l'ensemble des plantes vasculaires.

Chapitre 3. Comparaison entre les différentes méthodes de mesure des paramètres cinétiques

La méthode de mesure des paramètres cinétiques rapportée dans la littérature consiste à désorber les racines pendant 30 minutes au maximum à la suite de la période d'exposition, puis à quantifier le Cd restant dans les racines. L'isotherme d'absorption obtenue présente une composante michaëlienne et une composante linéaire. Les auteurs considèrent la composante linéaire comme résultant de résidus de Cd dans l'apoplasme, et postulent que la composante michaëlienne représente l'isotherme pure symplasmique.

I. Comparaison entre nos deux méthodes de fractionnement

La deuxième méthode de fractionnement (utilisant l'azote liquide) a été mise en place pour vérifier les conclusions obtenues à l'issue de la première méthode de fractionnement (au méthanol-chloroforme). Il s'avère que nos conclusions majeures sont validées. Les isothermes d'adsorption apoplasmique obéissent au modèle de Freundlich. Quant à l'isotherme d'absorption membranaire, elle suit une cinétique combinant un HATS (fonction de Michaëlis-Menten avec un faible K_m), à un LATS (fonction michaëlienne à fort K_m ou fonction linéaire si K_m trop élevé). En revanche, la comparaison entre nos deux méthodes de mesure des paramètres cinétiques met en évidence, dans le premier protocole, une surestimation de la fraction symplasmique au profit de la fraction apoplasmique, certainement en raison de la durée insuffisante de la désorption apoplasmique

II. Evaluation des paramètres cinétiques à partir des isothermes d'absorption : comparaison entre la méthode de fractionnement à l'azote liquide et la méthode utilisée dans la littérature

D'après les cinétiques du protocole de fractionnement à l'azote liquide (Partie 2 Chapitre 2), 10 à 50 % du Cd restant dans les racines à l'issue de 30 minutes de désorption appartiennent à la fraction apoplasmique, ce pourcentage étant d'autant plus important que la concentration en solution est élevée (Tableau 2-9). Cela n'est pas en contradiction avec la littérature, dans laquelle les racines désorbées pendant 30 min ou moins, contiennent une part de Cd apoplasmique augmentant avec la concentration en solution. En revanche, l'incapacité à distinguer précisément les deux fractions de Cd ne permettait pas de mettre en évidence le LATS que nous observons dans l'isotherme d'absorption symplasmique.

Tableau 2-9. Pourcentage de Cd apoplasmique se trouvant dans les systèmes racinaires après 30 minutes de désorption. Les plantes ont été exposées pendant une heure à 650 ml de solution contenant 0,5 mM CaCl₂, 2 mM MES et 5 mM CdCl₂

Part apoplasmique du Cd restant dans les racines après 30 min de désorption (%)		
Cd en solution (μM)	tabouret calaminaire	maïs
50	50	44
35	62	44
20	59	39
10	68	35
5	69	27
1	25	19
0,5	14	13
0,1	23	15

Tableau 2-10. Comparaison entre les paramètres cinétiques d'absorption symplasmique mesurés par notre méthode (Partie 2 Chapitre 2) et par la méthode utilisée dans la littérature

plante	méthode de fractionnement	Imax (nmol g ⁻¹ DW min ⁻¹)	Km (μM)	a (nmol g ⁻¹ DW min ⁻¹ μM ⁻¹)	R ²
maïs	présent manuscript	3,29 (0,24)	0,09 (0,02)	0,27 (0,02)	0,96
	littérature	5,19 (1,15)	0,36 (0,34)	/	0,94
tabouret calaminaire	présent manuscript	5,04 (0,60)	0,10 (0,05)	0,13 (0,04)	0,58
	littérature	7,84 (0,92)	0,13 (0,09)	/	0,91

Les isothermes d'absorption symplasmique que nous observerions avec nos plantes si nous utilisions le protocole décrit dans la littérature sont présentées dans les figures suivantes.

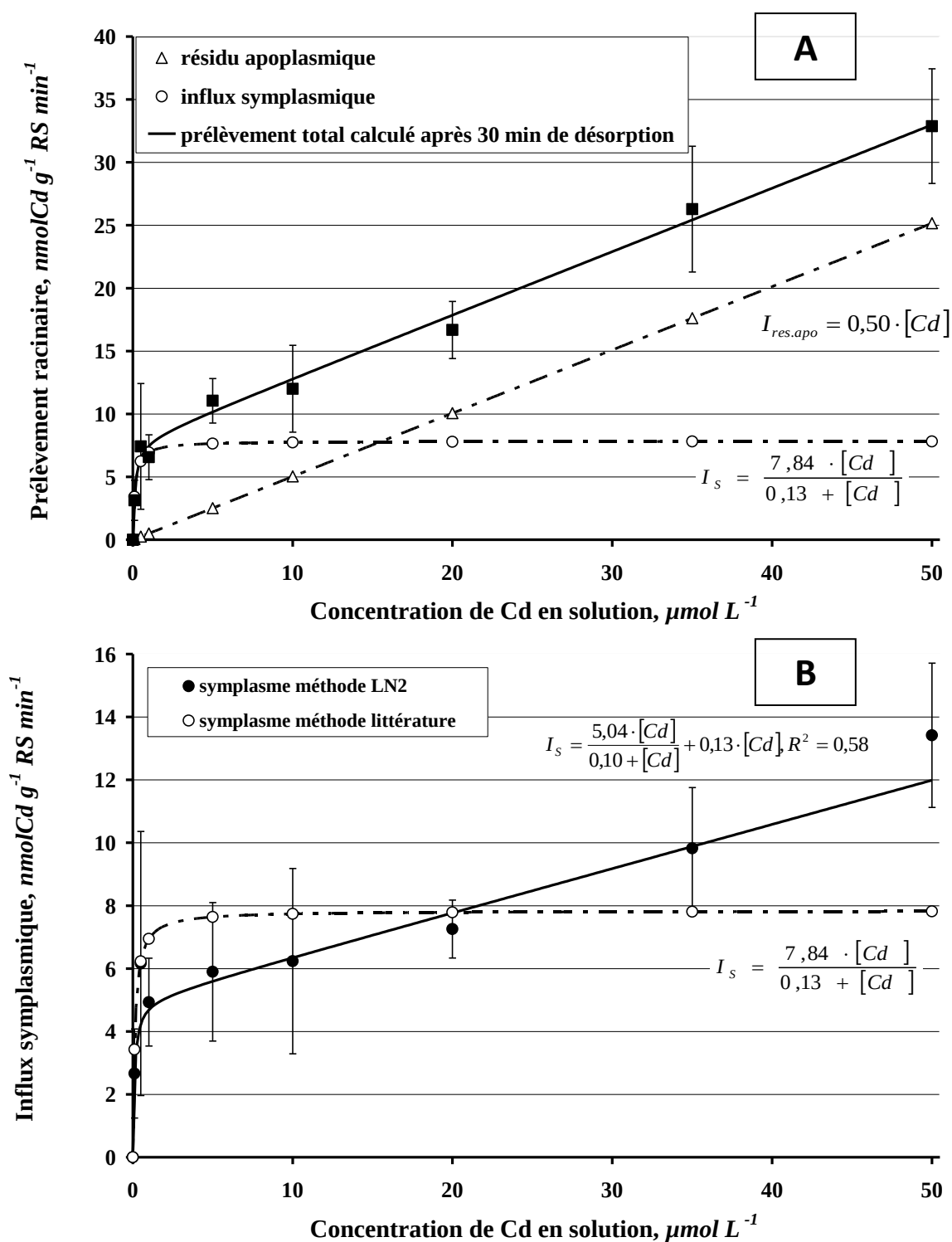


Figure 2-19. Isotherme d'absorption du tabouret calaminaire après 30 minutes de désorption, avec isolation de la composante symplasmique selon la méthode de la littérature (A) ; isothermes d'absorption symplasmique du tabouret calaminaire d'après la méthode de la littérature (symboles blancs) et la méthode mise au point dans ce chapitre (symboles noirs) (B).

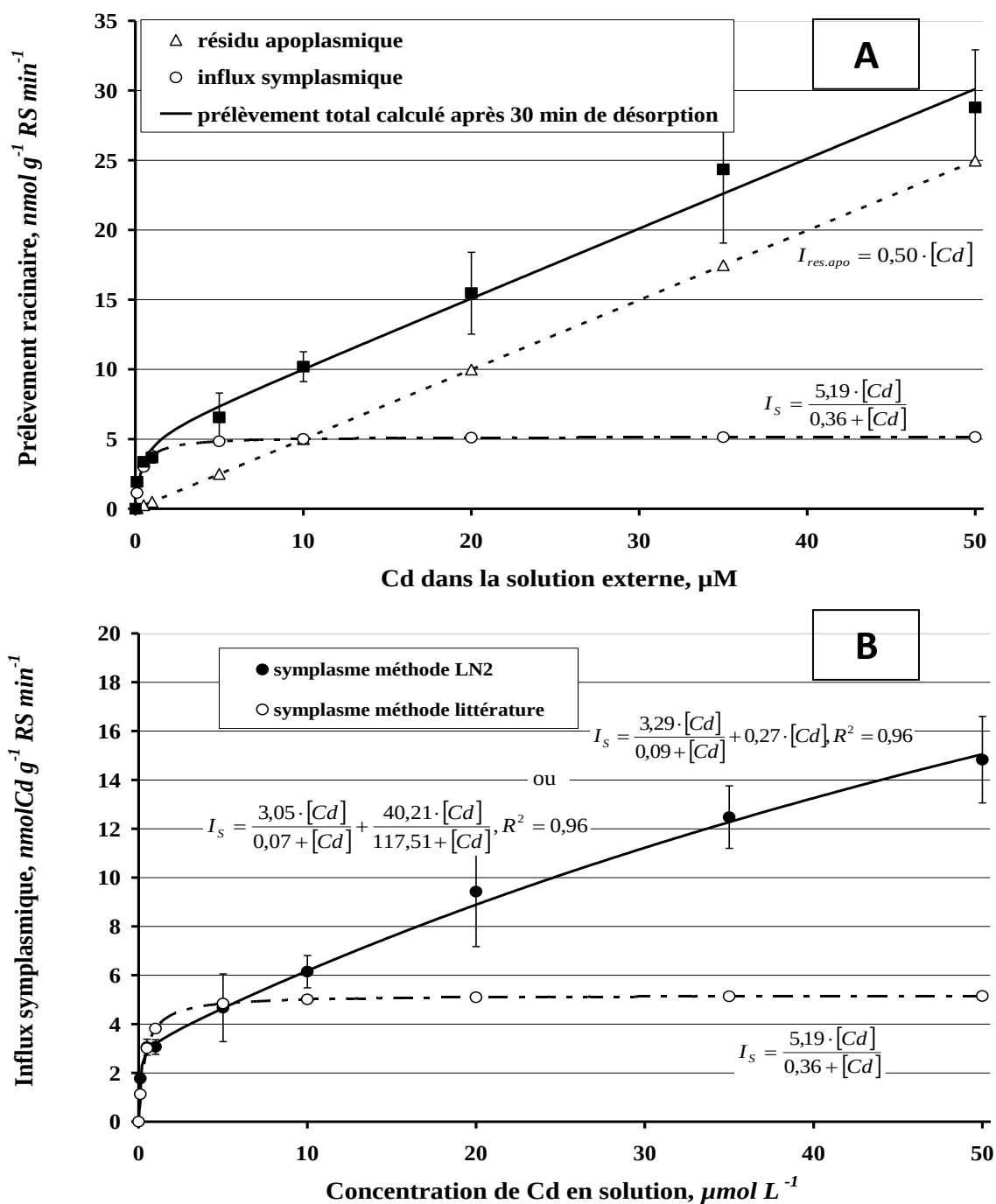


Figure 2-20. Isotherme d'absorption du maïs après 30 minutes de désorption, avec isolation de la composante symplasmique selon la méthode de la littérature (A) ; isothermes d'absorption symplasmique du maïs d'après la méthode de la littérature (symboles blancs) et la méthode mise au point dans ce chapitre (symboles noirs) (B).

Comme le montrent les isothermes d'absorption (Figure 2-19 et Figure 2-20) ainsi que les paramètres cinétiques correspondants (Tableau 2-10), la méthode de la littérature surestime à peine l'influx symplasmique aux basses concentrations. Ainsi, pour des concentrations externes inférieures à 1 μM , la méthode de mesure des paramètres cinétiques communément appliquée dans la littérature est validée par nos travaux.

En revanche, la méthode de la littérature sous-estime significativement le prélèvement intracellulaire aux fortes concentrations (Tableau 2-10), car suite aux 15 ou 30 minutes de désorption, elle attribue arbitrairement la composante linéaire à un résidu de Cd apoplasmique et la composante michaëlienne au prélèvement membranaire. Notre protocole sépare physiquement les fractions apoplasmique et symplasmique, et met ainsi en évidence l'implication de deux systèmes de transport membranaire du Cd.

Chapitre 4. Modélisation du prélèvement racinaire avec les paramètres mesurés précédemment

I. Description du modèle de prélèvement

Le modèle UPTAKE (Oates et Barber, 1984) a été développé pour prévoir le prélèvement d'éléments du sol par les racines des plantes, en décrivant le transport de l'ion dans le sol par diffusion et advection, la réalimentation de la solution du sol par le compartiment de l'élément sorbé sur la phase solide et son absorption à la surface racinaire. Il est basé sur la résolution de l'équation de transport décrite par Nye et Marriott (1969) avec les méthodes de résolution proposées par Barber et Cushman (1981). Dans le modèle UPTAKE, la description du système racinaire tient compte essentiellement de la vitesse d'augmentation de la surface racinaire, ainsi que des propriétés d'absorption de la racine en fonction de la concentration de l'élément en solution. Ce modèle repose sur plusieurs hypothèses :

Le milieu est homogène et isotrope : les processus du système considéré sont identiques dans tout l'espace.

Les conditions d'humidité du sol sont maintenues à l'état stationnaire et proches de la capacité au champ, ce qui permet d'assurer l'indépendance entre les coefficients de l'équation du transport et l'état d'humidité du milieu.

Le prélèvement de nutriments a lieu uniquement à la surface racinaire, sans intervention de la microflore.

La vitesse de prélèvement de l'élément en fonction de la concentration en solution peut être décrite par une équation de Michaëlis-Menten.

Le transport des éléments a lieu uniquement par diffusion (en solution) et convection, et seulement en direction radiale.

Les propriétés de diffusion, de convection et les caractéristiques d'absorption racinaire sont toutes indépendantes les unes des autres.

Le système racinaire est assimilé à un cylindre lisse avec un rayon constant et sans poils absorbants.

Le coefficient de diffusion de l'élément dans l'eau et le pouvoir tampon du sol pour l'élément sont deux grandeurs indépendantes de la concentration en solution.

Les paramètres de la cinétique d'absorption ne changent pas au cours du temps de la culture

Le flux de masse n'est pas influencé par la concentration en solution de l'élément considéré.

Pour estimer la quantité de métal prélevée par le végétal, il est donc indispensable de bien décrire la demande de la plante au niveau de la surface racinaire. Les connaissances sur la complexité des protéines de transport impliquées dans l'absorption des ETM ont certes avancé. Cependant, ces mécanismes n'ont jamais été intégrés dans le modèle. La fonction d'absorption (condition limite interne) est décrite par une relation de Michaëlis-Menten.

Dans le chapitre 2, nous avons montré que cette fonction est pertinente pour décrire la vitesse d'entrée du métal dans le symplasme racinaire, mais qu'elle se combine à une fonction linéaire qui prend d'autant plus d'importance que la concentration externe en solution est élevée. D'autre part, nous avons également formalisé le prélèvement apoplasmique par une fonction de Freundlich. Nous avons voulu évaluer l'incidence que pourrait avoir la formalisation de l'absorption racinaire par les fonctions que nous avons décrite, en comparaison avec la simple fonction de Michaëlis-Menten habituellement utilisée.

Pour cela, nous avons utilisé le modèle RUSE (pour « Root Uptake of Soil Elements ») développé sous MATLAB® par Perriguet (2006) sur la base des formalismes du modèle UPTAKE. RUSE se distingue d'UPTAKE essentiellement par la possibilité de décrire l'absorption racinaire par la fonction mathématique qui peut être différente de la fonction de Michaëlis-Menten.

II. Simulation par le modèle RUSE des prélèvements de Cd des deux plantes

Le modèle est sensible à plusieurs processus rhizosphériques ou propres à la plante. Parmi ces mécanismes, l'offre du sol et les paramètres d'absorption racinaire occupent une place très importante. Dans cette thèse, nous nous sommes focalisés sur l'estimation de ces paramètres de prélèvement racinaire, pour savoir si une détermination plus juste de ces constantes permettrait une amélioration des prédictions du modèle. En effet, les paramètres cinétiques de la littérature (Lombi *et al.*, 2001; Perriguet, 2006) ont mené à une mésestimation du prélèvement de Cd dans les cultures en pot, en particulier une sous-estimation de 66% du prélèvement de Cd par le tabouret calaminaire.

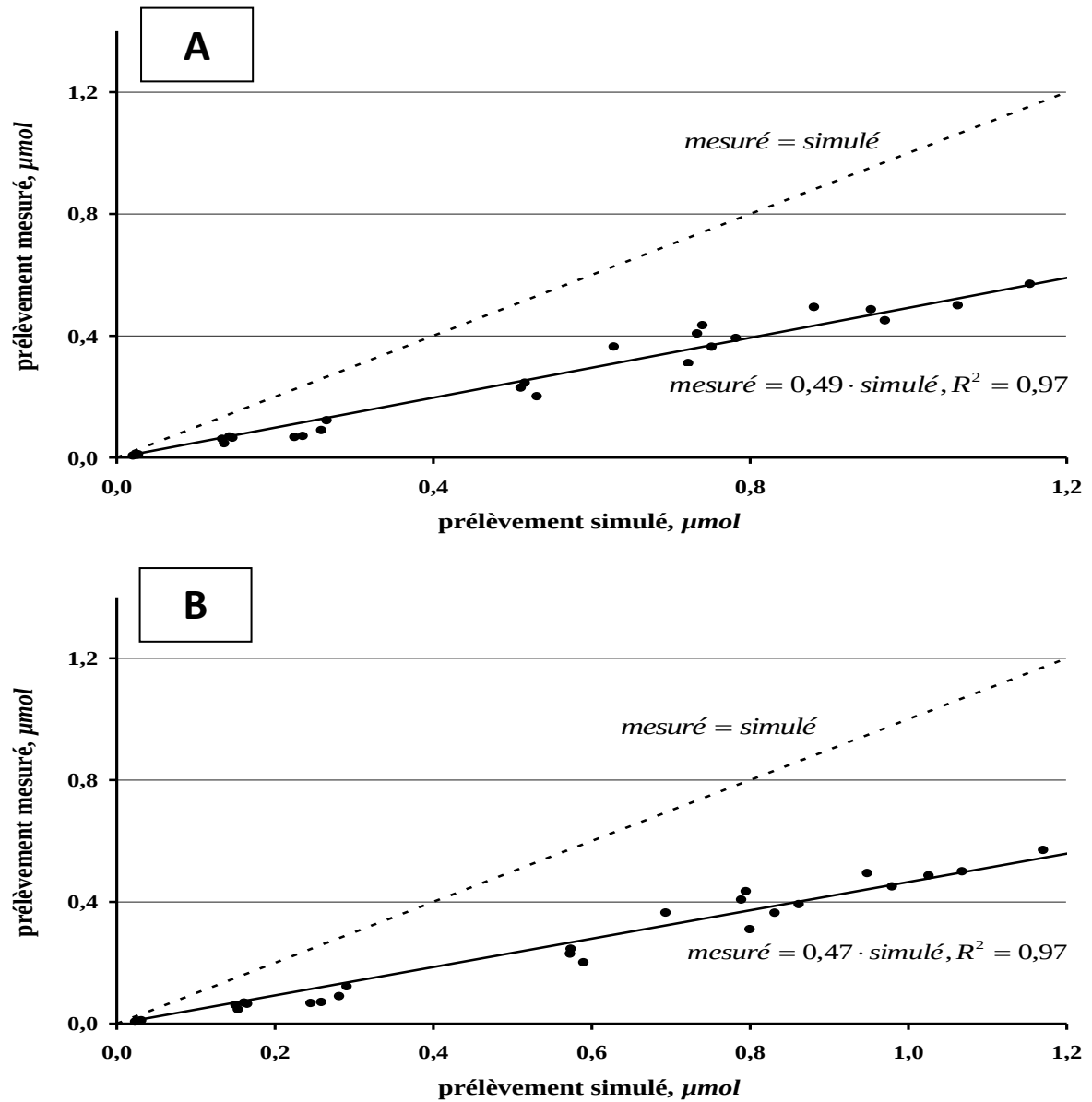


Figure 2-21. Relation entre les prélèvements de Cd simulés par le modèle RUSE et mesurés dans le cas du maïs ; les paramètres cinétiques sont issus des méthodes de fractionnement au méthanol-chloroforme (A) et à l'azote liquide (B).

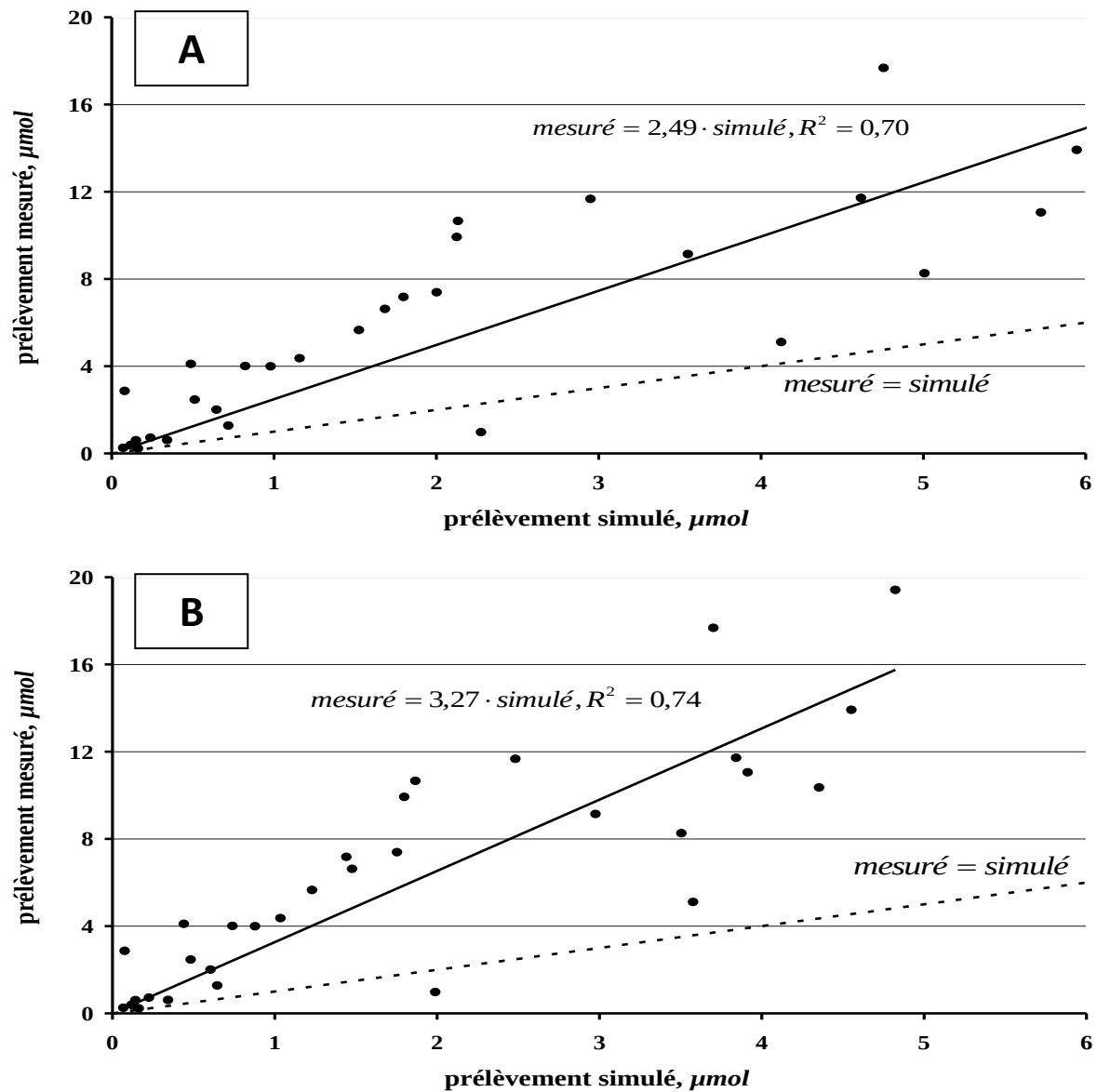


Figure 2-22. Relation entre les prélèvements de Cd simulés par le modèle RUSE et mesurés dans les plantes de tabouret calaminaire ; les paramètres cinétiques sont issus des méthodes de fractionnement au méthanol-chloroforme (A) et à l'azote liquide (B).

Le cadmium mesuré dans les plants cultivés en sol compte tout le métal restant accumulé dans la plante après simple rinçage des racines. Par conséquent, les valeurs d'accumulation mesurées en pot correspondent à la somme du métal accumulé dans le milieu intracellulaire et du métal resté sorbé sur les parois des cellules racinaires. Les prélèvements apoplasmique et symplasmique (I_{net} et Q_{apo}) dépendent des concentrations en solution. Ces concentrations en solution, mesurées pour pouvoir confronter les simulations aux prélèvements réels, ont été

estimées par centrifugation (Perrigüey, 2000) et varient entre 10 nmol L^{-1} et $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Les prélèvements simulés sont calculés pour chacune de ces concentrations de manière à comparer les influx mesurés aux influx simulés.

La cinétique d'influx symplasmique est intégrée à la fois sur la surface racinaire et le temps d'exposition au métal dans le sol, à savoir 12 jours pour le maïs et 79 jours pour le tabouret calaminaire.

Contrairement au compartiment symplasmique capable d'accumuler le métal de façon considérée comme infinie, les parois des cellules racinaires constituent un compartiment dont la capacité maximale d'adsorption serait limitée : une fois l'équilibre atteint entre l'apoplasme et la solution externe, la concentration du Cd dans les parois ne peut plus augmenter ; l'apoplasme n'accumulera pas davantage de métal et ne servira que de lieu de passage vers les membranes plasmiques. Dans ce cas, pour simuler la quantité totale de Cd dans le compartiment apoplasmique, il serait faux d'intégrer sur la durée de la culture les paramètres de Freundlich obtenus lors de l'étude des isothermes d'adsorption. En considérant que l'équilibre est atteint en moins d'une heure, les paramètres de l'isotherme de prélèvement apoplasmique obtenus dans les chapitres 2 et 3 correspondent bien aux constantes de Freundlich (K_F et $1/n$) qui se mesurent à l'équilibre. Pour pouvoir faire intervenir le compartiment apoplasmique dans la simulation du Cd prélevé au cours de la culture, nous calculons, à partir de nos paramètres de Freundlich, la quantité totale de Cd adsorbée sur la surface totale racinaire atteinte en fin de culture en sol. Par conséquent, le prélèvement racinaire est simulé en sommant le prélèvement symplasmique (intégré sur le temps et la surface racinaire), avec le prélèvement apoplasmique ayant lieu en une heure et intégré sur la surface racinaire mais pas sur la durée totale de la culture.

Dans le cas de la simulation du prélèvement du Cd par le maïs, la proportion de Cd apoplasmique par rapport au Cd total prélevé est alors inférieure à 10% en considérant le jeu de paramètres issu du fractionnement au méthanol-chloroforme, et ne dépasse pas 2 % avec le jeu de paramètres issu du fractionnement à l'azote liquide. Dans le cas du tabouret calaminaire, la part de Cd apoplasmique racinaire reste inférieure à 4% quel que soit le jeu de paramètres utilisé.

Le prélèvement simulé par le modèle RUSE surestime d'un facteur 2 le prélèvement mesuré dans le maïs. En revanche, il sous-estime d'un facteur 3 le prélèvement mesuré dans les plants

de tabouret calaminaire. Cette surestimation reste inchangée lorsque le compartiment apoplasmique n'est pas considéré.

Les résultats des simulations sont sensiblement les mêmes quelle que soit la méthode de fractionnement utilisée, ce qui est en accord avec le fait que les concentrations en sol ne dépassent pas $1 \mu\text{mol L}^{-1}$.

III. Discussion

Le prélèvement du Cd par le tabouret calaminaire est sous-estimé de 66 %. Or Perriguet (2006) avait trouvé que le modèle sous-estimait de 65 % le prélèvement mesuré de Cd par le tabouret calaminaire en reprenant les paramètres cinétiques de Lombi *et al.* (2001). De même, la technique d'épuisement avait également donné des paramètres cinétiques entraînant une sous-estimation du prélèvement mesuré, de 66 %. En effet, les paramètres obtenus par nos méthodes de fractionnement sont dans le même ordre de grandeur que les paramètres de la littérature.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer la surestimation du prélèvement du maïs par le modèle RUSE.

La matrice d'absorption utilisée pour estimer les paramètres cinétiques ne contient que du Ca concentré à 0,5 mM, soit des conditions de faible compétition ionique qui favorisent l'absorption, comme nous le verrons dans le chapitre 1 de la partie 3, où nous analyserons l'influence de certains cations divalents dans la matrice d'absorption sur la vitesse d'absorption du Cd. Perriguet (2006) a en effet observé que la mesure des paramètres cinétiques en présence d'une force ionique plus élevée entraîne des simulations très proches de la réalité. Mais le lien de cause à effet n'a pas été établi clairement. Deuxièmement, les paramètres ont été mesurés sur des plantes n'ayant pas connu de Cd au cours de leur culture ; or l'accumulation préalable de Cd pourrait générer des phénomènes de régulation du prélèvement racinaire, se concrétisant par une diminution ou au contraire une stimulation de l'influx net. Cette hypothèse sera également testée (chapitre 2 de la Partie 3). D'autre part, les paramètres cinétiques de l'absorption racinaire du Cd ont été mesurés suite à une culture hydroponique. Or d'après la littérature, les racines cultivées en hydroponie ne présentent pas la même structure que les racines cultivées en sol, avec notamment une maturation plus tardive de l'exoderme, et par conséquent une surface membranaire accessible au métal

significativement plus importante par unité de masse ou de surface racinaire. Cette hypothèse sera testée dans le chapitre 3 de la partie 2.

Compte tenu de ce qui vient d'être dit, les conditions expérimentales utilisées pour mesurer les paramètres cinétiques tendent vers une surestimation du prélèvement de Cd par le maïs. Pourtant, le modèle sous-estime de 66 % l'absorption de Cd par le tabouret calaminaire. Il est à noter que la mesure des paramètres suite à un prélèvement de Cd par des racines plongées dans une solution cadmiée, présente un inconvénient de taille. Dans l'erlenmeyer, la concentration de métal au voisinage le plus proche des racines est la même que la concentration dans les 650 ml de solution d'exposition ; en revanche, dans le sol, les mm rhizosphériques peuvent présenter une concentration bien différente de celle mesurée par centrifugation dans le sol, caractérisant soit une zone de déplétion, soit au contraire une accumulation. Or de récents travaux montrent que le Cd des fractions organique et carbonée s'accumule dans la rhizosphère des plantes tolérantes ou hyperaccumulatrices, ce qui n'est pas le cas des écotypes non tolérants ou non accumulateurs de la même espèce (Ru Shuhua *et al.*, 2006 ; Vysloužilová *et al.*, 2006). Etant donné que *Noccaea caerulesens* prélève justement le Cd de cette fraction du sol (Hammer & Keller, 2002), il est probable que les concentrations de Cd dans la rhizosphère des tabourets calaminaires en pots soient sous-estimées, menant ainsi à une sous-estimation des prélèvements simulés. D'où une éventuelle sous-estimation ou surestimation du prélèvement simulé, même si la mesure des paramètres cinétiques est juste. Il serait intéressant d'étudier la concentration de Cd dans la rhizosphère du maïs et du tabouret calaminaire, les résultats de nos simulations laissant supposer une zone de déplétion au voisinage des racines de maïs et une zone d'accumulation du métal au voisinage des racines de l'hyperaccumulateur.

Partie 3. Etude de paramètres susceptibles d'influer sur la cinétique de l'absorption racinaire

Chapitre 1. Influence de certains cations divalents sur l'influx net de Cd dans les racines

Introduction

Le caractère non essentiel du Cd dans la nutrition des plantes vasculaires suggère fortement qu'il n'existe pas de transporteur spécifique au Cd^{2+} . En revanche, l'inhibition du prélèvement de Cd par la présence d'un certain nombre de cations divalents (Cataldo *et al.*, 1983 ; Costa & Morel, 1993) suggère que le Cd emprunte certainement des transporteurs membranaires tels que ceux à Zn, Cu ou Fe (Welch et Norvell, 1999) ou des canaux à cations comme les canaux à Ca^{2+} ou à Mg^{2+} (Nies, 1995). L'intérêt d'étudier les compétitions ioniques est double. D'une part, cela permettra de vérifier que les deux systèmes de transport (HATS et LATS) mis en évidence dans la partie I ont bien des comportements différents vis-à-vis d'éventuels cations inhibiteurs de l'absorption racinaire du Cd. En effet, le HATS ayant une affinité pour le Cd nettement plus forte que le LATS, il devrait logiquement être relativement moins sensible aux ions compétiteurs. Le deuxième objectif de l'expérimentation est d'identifier, dans nos conditions expérimentales, les ions agissant sur l'adsorption apoplasmique et/ou sur l'influx unidirectionnel membranaire, pour pouvoir identifier éventuellement les canaux ou transporteurs responsables du prélèvement racinaire du Cd.

I. Matériels et Méthodes

Divers cations monovalents et divalents sont testés individuellement pour évaluer l'effet de leur présence sur l'influx net de Cd dans les racines. Chacun d'eux est ajouté séparément à la solution d'absorption (identique à celle utilisée pour la mesure des paramètres cinétiques de la Partie 2), de façon à comparer la vitesse de prélèvement racinaire du Cd en présence du cation avec la vitesse de prélèvement du Cd dans les plantes témoins.

I.1. Influence des ions de la solution externe sur la vitesse de prélèvement racinaire de Cd

La germination et la culture du maïs sont réalisées dans les mêmes conditions que dans la partie II. Les plantes sont sacrifiées au bout de 12 jours. Comme dans les chapitres précédents,

les plantes sont exposées au Cd pendant une heure, sans que la concentration de Cd en solution ne diminue significativement : la quantité de Cd qui disparaît de la solution n'atteint pas 10% de la quantité initiale. Chaque modalité d'exposition au Cd est répétée sur quatre systèmes racinaires différents.

1.1.1. Influence de la concentration en Ca et du pH

Quatre concentrations de Ca sont testées. Pour ce, les 650 ml de solution d'absorption contiennent 1 μM CdCl_2 marqué, 2 mM MES (pH=5,7) et quatre concentrations croissantes de CaCl_2 : 0 μM , 1 μM , 0,5 mM et 2 mM.

L'effet de trois pH est étudié : pH = 4, pH = 5 et pH = 6. Les 650 ml de solution d'exposition contiennent 1 μM CdCl_2 marqué, 0,5 mM CaCl_2 et 2 mM MES (pH = 5,7).

Suite aux 60 minutes d'exposition à la solution d'absorption, les racines sont placées dans trois bains de désorption successifs de 10 minutes chacun. Le Cd apoplasmique échangé en 30 minutes est dosé dans les bains de désorption à travers des aliquotes de 20 ml. Les systèmes racinaires sont ensuite séchés à l'étuve (72°C) pendant trois jours avant d'être pesés ; le Cd contenu dans chaque système racinaire sec et non broyé est alors dosé au compteur gamma.

1.1.2. Effet des cations divalents sur la vitesse de prélèvement du Cd par les deux systèmes de transport

Les cations monovalents étudiés sont Na^+ , NH_4^+ et K^+ . Neuf cations divalents sont testés : Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} . Les 650 ml de solution d'absorption contiennent 0,5 mM CaCl_2 , 2 mM MES (pH = 5,7), et la concentration choisie de CdCl_2 . Deux concentrations de Cd sont testées. Leur choix s'est fait à partir des résultats de la partie II, qui ont mis en évidence deux systèmes de transport simultanés : le HATS qui agit d'autant plus majoritairement que les concentrations sont basses, et le LATS qui prend de l'importance à mesure que la concentration externe augmente. L'objectif étant d'étudier les interactions ioniques au niveau de chacun de ces systèmes de transport, les concentrations de Cd testées sont de 1 μM pour l'étude du HATS et de 30 μM pour l'étude du LATS. En effet, à une concentration externe de 1 μM , le HATS constitue 92 % du prélèvement symplasmique tandis qu'à 30 μM , c'est le LATS qui prédomine, comptant 72 % du prélèvement symplasmique (Partie 2 chapitre 2). Le ratio entre la concentration en Cd et la concentration du cation testé est de 1/5 (Reid et Liu, 2004). Par conséquent, une première série d'absorptions a lieu avec 1

μM Cd et $5 \mu\text{M}$ d'ion testé, et une deuxième série avec $30 \mu\text{M}$ Cd et $150 \mu\text{M}$ d'ion testé. A l'issue de l'heure d'exposition dans les différentes modalités, chaque système racinaire est séparé des parties aériennes avant de subir le protocole de fractionnement du Cd racinaire en Cd apoplasmique et symplasmique (Figure 2-13) : le Cd est progressivement désorbé au cours d'une cinétique de désorption dans un bain marie glacé, interrompue par une brève congélation/décongélation des racines. Le Cd des bains de désorptions est dosé via des aliquotes de 20 ml ; les apoplasmes racinaires sont séchés (trois jours à l'étuve à 72°C) et pesés avant d'être passés au spectromètre gamma. Le Cd désorbé au cours des 40 min suivant la décongélation représente la fraction symplasmique, tandis que le reste du Cd prélevé appartient à la fraction apoplasmique.

Le Cd ainsi que les différents cations testés sont tous sous la forme nitrate, à l'exception du Fe et du Mn, sous forme sulfate car non disponibles sous forme nitrate.

I.2. Statistiques

Pour chacun des cations testés, un test t de Student permet de comparer les vitesses d'accumulation du Cd dans les compartiments racinaires (apoplasmique et symplasmique) en présence et en absence du cation testé.

II. Résultats

II.1. Influence de la concentration externe en Ca

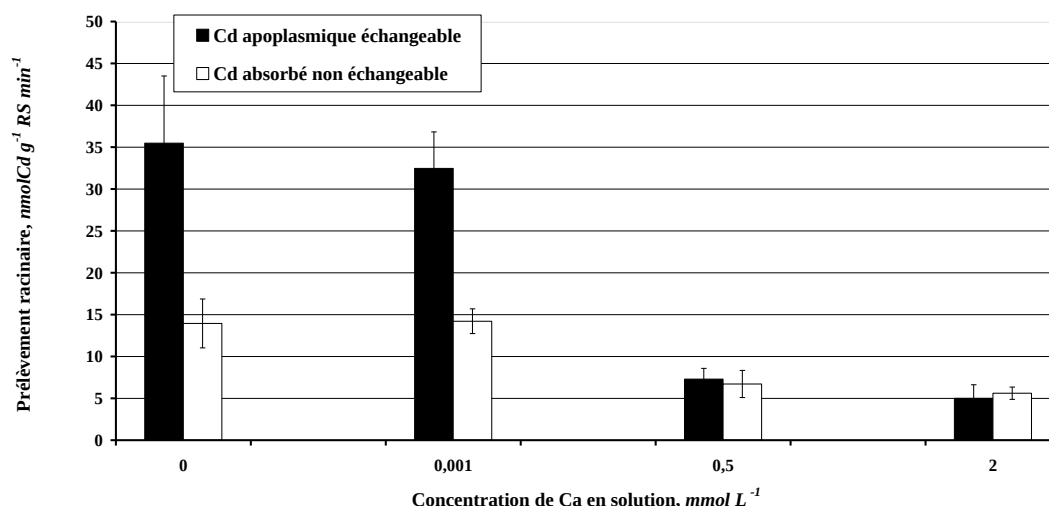


Figure 3-1. Prélèvement du Cd par les racines en 60 minutes d'exposition à $1 \mu\text{M}$ CdCl_2 , en présence de concentrations croissantes de CaCl_2 . Les barres noires représentent le Cd échangé en 30 minutes, et les barres blanches le Cd restant dans les racines.

Le Ca inhibe très significativement l'influx de Cd lorsque le rapport Ca/Cd dépasse 500 ; l'inhibition a lieu de façon évidente au niveau de l'adsorption sur les parois, mais probablement également au niveau de l'absorption membranaire (Figure 3-1). En revanche, cette inhibition ne s'observe pas lorsque les deux cations se trouvent tous les deux concentrés à 1 μM .

II.2. Influence du pH sur l'influx net de Cd dans les racines

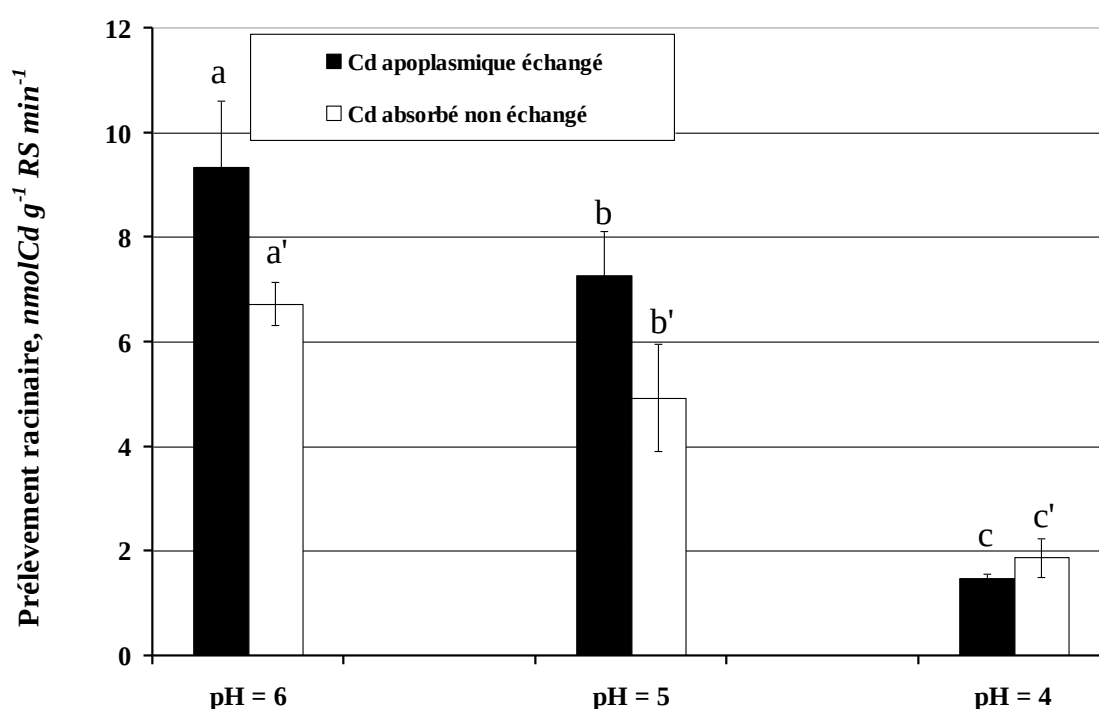


Figure 3-2. Prélèvement du Cd par les racines en 60 minutes d'exposition à 1 μM CdCl_2 , à trois pH différents. Les barres noires représentent le Cd échangé en 30 minutes, les barres blanches le Cd restant dans les racines.

L'influx de Cd diminue très significativement lorsque le pH passe de 6 à 5 puis à 4 (Figure 3-2) : les ions H^+ ralentissent l'adsorption apoplasmique ainsi que l'absorption membranaire du Cd.

II.3. Effet des cations divalents sur la vitesse de prélèvement du Cd par les deux systèmes de transport

II.3.1. Effet des cations divalents sur le HATS

Dans la solution contenant 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Cd et 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ du cation ajouté, aucun des ions testés n'interagit significativement avec l'adsorption du Cd sur l'apoplasme (Figure 3-3). Au niveau

sytoplasmique, seul un cation divalent affecte l'absorption du Cd : le Cu réduit significativement la vitesse d'accumulation du Cd dans le milieu intracellulaire (Figure 3-4), d'environ 30%.

II.3.2. Effet des cations divalents sur le LATS

En présence de 30 μM de Cd et de 150 μM de cation testé, l'adsorption apoplasmique du Cd est significativement affectée par la présence de Pb et de Cu, et dans une moindre mesure, de Mg (Figure 3-5). Par contre, dans une solution contenant 1 μM Cd, l'adsorption du Cd sur les parois des cellules racinaires n'est pas significativement affectée par la présence de 5 μM de n'importe lequel des cations testés (Figure 3-3). L'absorption intracellulaire à travers le LATS (30 μM de Cd) est significativement réduite par le Pb, le Cu, le Zn, le Co, le Mg, le Mn et le Ni, mais pas par le Ca (Figure 3-6).

III. Discussion

D'après les isothermes d'absorption réalisées dans la partie I, il apparaît qu'à l'issue de 60 minutes d'exposition à 30 μM de Cd, 80 % du métal prélevé par les racines se trouvent dans le compartiment apoplasmique (Figure 3-5 et Figure 3-6). Pour cette raison, un manque de rigueur dans la séparation des fractions symplasmique et apoplasmique pourrait conduire à des résultats erronés ; en particulier, si la fraction symplasmique est surestimée à cause d'une désorption insuffisante du Cd apoplasmique, des interactions significatives au niveau de l'apoplasme pourraient biaiser les résultats en se répercutant sur la fraction symplasmique. Or dans le cas d'une concentration en solution de 30 μM , les résultats montrent que le prélèvement symplasmique est sensible à davantage de cations que le prélèvement apoplasmique, ce qui suggère que le fractionnement est réalisé correctement.

D'autre part, l'absence d'effet du Ca concentré à 150 μM sur l'adsorption et sur l'absorption du Cd prouve que les cations qui se révèlent inhiber le prélèvement du Cd agissent par leur affinité pour les sites d'adsorption apoplasmique et d'absorption membranaire, et non seulement par la force ionique qu'ils imposent à la solution.

La diminution de l'influx de Cd avec l'abaissement du pH (Figure 3-2) confirme la littérature. En effet, les ions H^+ peuvent entrer en compétition avec le Cd sur les sites de fixation et de transport du Cd. Cette inhibition de l'influx du Cd peut être due également à l'écran de charges positives que les ions H^+ créent autour des racines, masquant l'électronégativité des

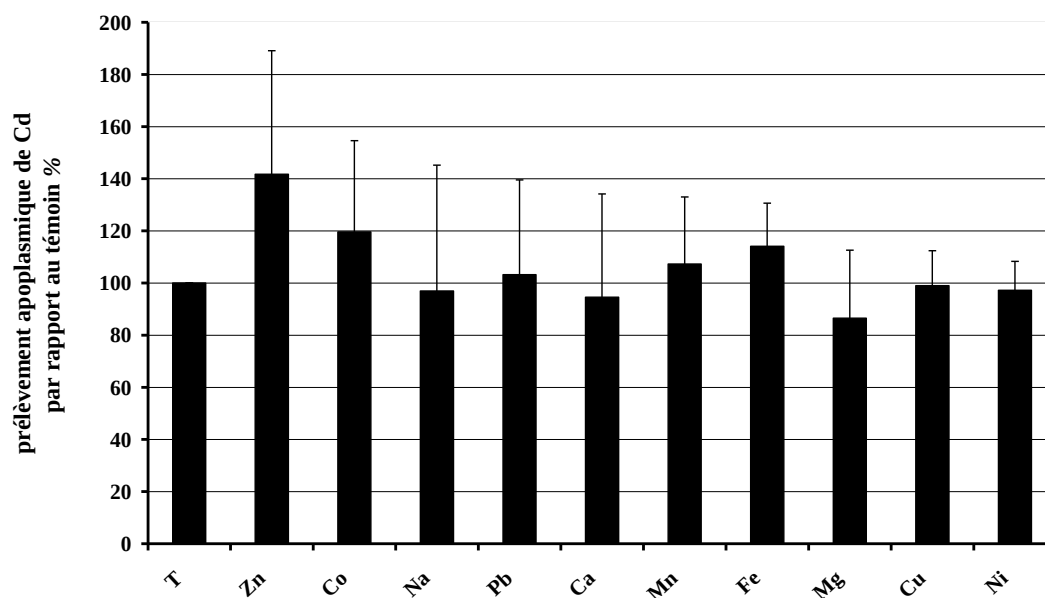


Figure 3-3. Prélèvement du Cd dans l'apoplasme racinaire, selon les différents ions ajoutés en solution, en fonction du témoin. L'absorption dure une heure, dans $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd et en présence de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de l'ion testé. $n = 4$

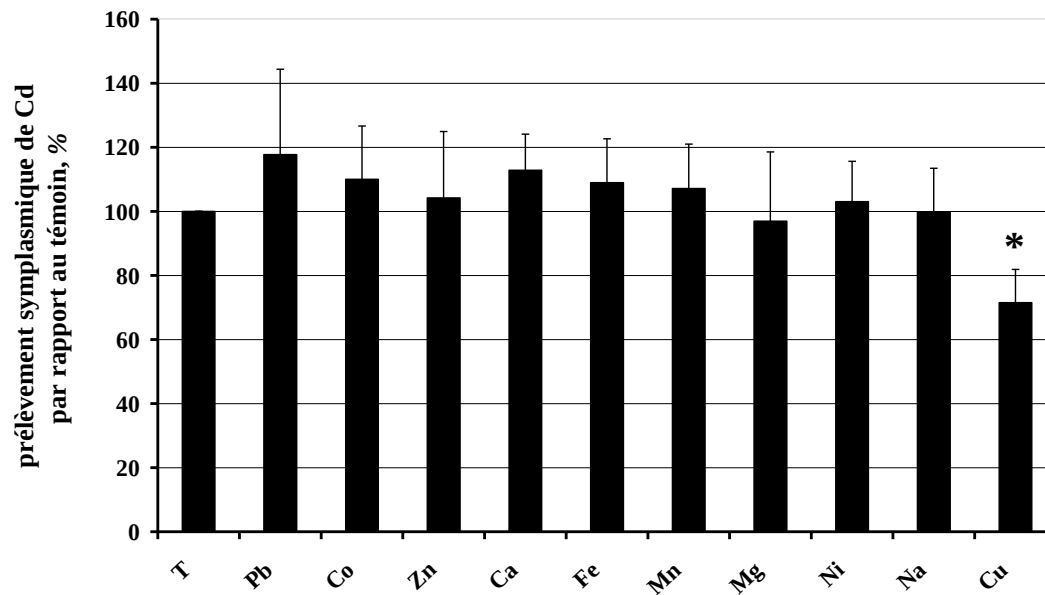


Figure 3-4. Prélèvement du Cd dans le symplasme racinaire, selon les différents ions ajoutés en solution, en fonction du témoin. L'absorption dure une heure, dans $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd et en présence de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de l'ion testé. $n = 4$.

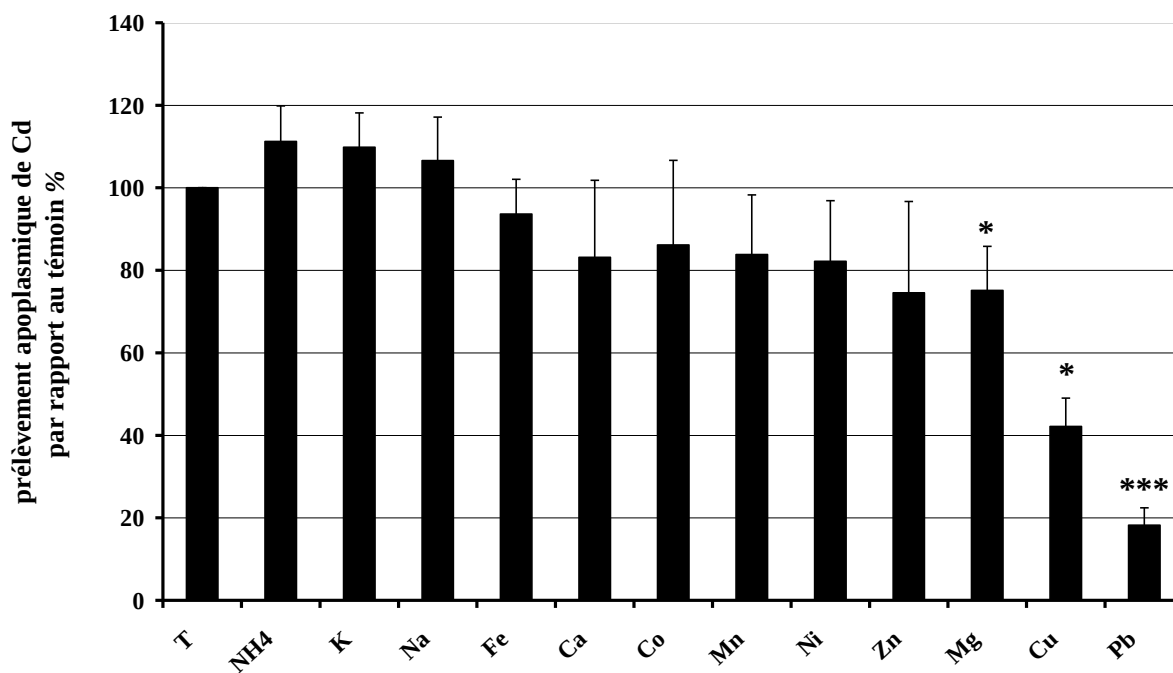


Figure 3-5. Prélèvement du Cd dans l'apoplasme racinaire, selon les différents ions ajoutés en solution, en fonction du témoin. L'absorption dure une heure, dans $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd et en présence de $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ de l'ion testé. $n = 4$.

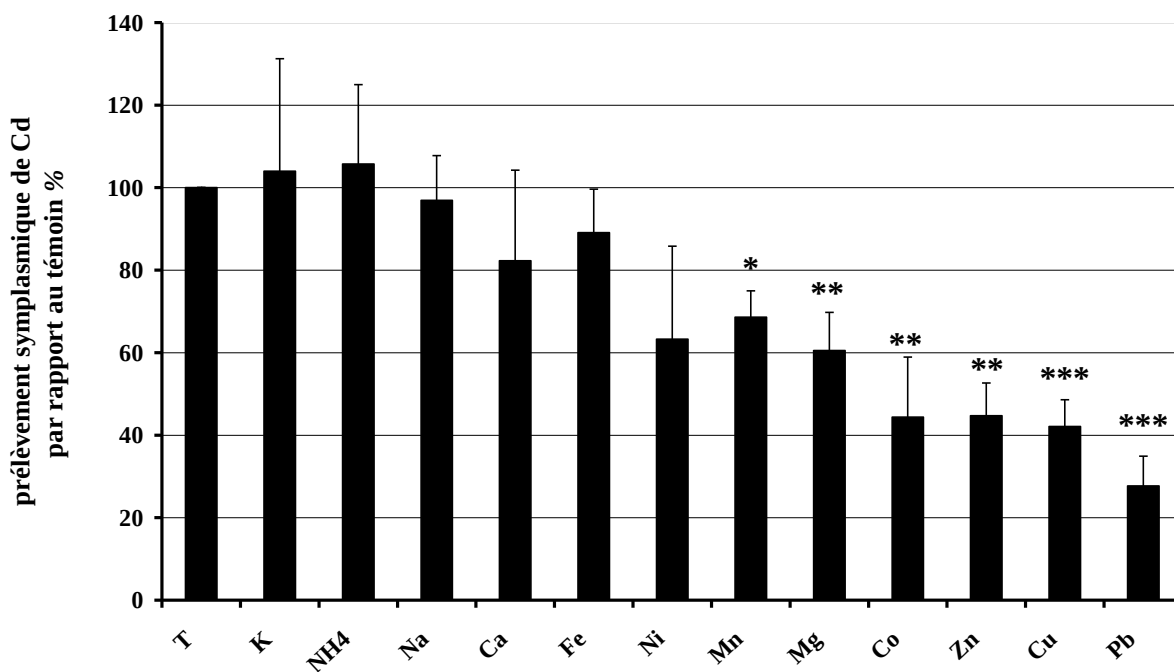


Figure 3-6. Prélèvement du Cd dans le symplasme racinaire, selon les différents ions ajoutés en solution, en fonction du témoin. L'absorption dure une heure, dans $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd et en présence de $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ de l'ion testé. $n = 4$

parois. Yanai (2005) a montré qu'un pH compris entre 5 et 6 était favorable pour le prélèvement et l'accumulation du Cd. Cependant, il est intéressant de noter qu'en solution hydroponique, la corrélation s'avère positive entre le pH et l'absorption du Cd, en raison d'une compétition entre les ions H^+ et Cd^{2+} (Tyler *et al.*, 1982 ; Florijn *et al.*, 1993 ; Yanai *et al.*, 2005).

Le prélèvement membranaire de Cd dans les basses concentrations ($Cd = 1 \mu M$) est insensible à tous les cations testés sauf le Cu, ce qui laisse supposer que le Cd emprunte soit des transporteurs de Cu ayant une affinité plus élevée pour le Cu que pour Cd, soit des transporteurs ayant une affinité plus grande pour le Cd que pour le cation essentiel qu'il transporte originellement. L'inhibition du prélèvement du Cd par le Cu est en accord avec les récents travaux de Cui *et al.* (2008) portant sur différents géotypes de riz. Des observations similaires ont été faites sur d'autres plantes vivantes (Nasu *et al.*, 1984), mais aussi sur de la tourbe (Fei Qin *et al.*, 2006), ainsi que sur des protoplastes animaux (Endo, 2002).

Le fait que le prélèvement de Cd soit affecté par plus de cations divalents dans les fortes concentrations en Cd que dans les faibles concentrations en Cd, est en accord avec l'interprétation des isothermes d'absorption décrites dans la partie 1 ; l'existence de deux systèmes de transport membranaire du Cd : le premier qui prédomine aux basses concentrations avec une forte affinité pour le Cd, le deuxième qui prévaut aux concentrations élevées et dont l'affinité pour le Cd est moindre.

Dans le cadre de la modélisation, ces résultats sont très importants car ils prouvent que les paramètres cinétiques sont significativement modifiés par la composition ionique de la solution du sol. Il peut s'agir de cations comme Ca ou Mg, qui ont une faible affinité pour les parois et les racines par rapport au Cd, mais qui se trouvent en solution mille fois plus concentrés que le Cd, comme il peut s'agir de métaux pour lesquels les racines ont plus d'affinité que pour le Cd, et qui vont alors inhiber sa fixation sur les sites d'adsorption et d'absorption.

Bien que cette expérimentation soit menée sur les racines de maïs seulement, les conclusions obtenues sont certainement généralisables à toutes les plantes. Dans le cas du tabouret calaminaire, étant donné que le HATS prédomine sur le LATS, il est fort probable que le prélèvement symplasmique soit moins sensible que le maïs aux cations susceptible d'entrer en compétition avec le Cd.

Chapitre 2. Régulation de l'influx net de Cd dans les racines : effet de la teneur en Cd dans la plante entière

Le prélèvement du Cd par les plantes résulte de l'adsorption du Cd sur les parois des cellules et de son absorption à travers les membranes des cellules racinaires. Les isothermes d'absorption réalisées sur des plantules de maïs et de tabouret calaminaire permettent de paramétrer l'influx unidirectionnel du Cd dans les deux compartiments racinaires. Dans la plupart des travaux, les paramètres cinétiques sont mesurés sur des plantes n'ayant jamais été exposées au métal durant leur culture. C'est d'ailleurs ce que nous avons fait dans la partie précédente. Pourtant, dans les conditions naturelles, les végétaux sont exposés au métal dès leur germination. D'autre part, si la littérature témoigne de mécanismes de régulation de l'entrée du Cd dans les racines, rares sont les informations concernant un éventuel effet de la teneur interne de la plante en Cd sur la vitesse d'absorption racinaire du métal. Enfin, très peu de travaux ont porté sur la régulation au niveau de la CEC racinaire.

L'hypothèse testée est la suivante : l'exposition chronique des plantes au Cd pourrait être à l'origine d'une modification de l'influx unidirectionnel du Cd dans les racines et, par conséquent, des paramètres cinétiques mesurés précédemment. Le maïs et le tabouret calaminaire, dont les demandes en Cd sont aussi contrastées, pourraient présenter des mécanismes de régulation différents, pouvant éventuellement expliquer le stockage racinaire chez l'une et l'hyperaccumulation du Cd chez l'autre.

Le but de cette étude n'est pas d'identifier les mécanismes de régulation, qui nécessiteraient de travailler à l'échelle moléculaire sur les transductions de signaux, mais de déceler, suite à une longue exposition au Cd, d'éventuelles modifications des propriétés de prélèvement racinaire susceptibles d'affecter les paramètres cinétiques.

Le principe consiste à réaliser à nouveau des isothermes d'absorption (influx en fonction de la concentration dans la solution externe, lors d'une heure de prélèvement), en y ajoutant un facteur, celui du niveau de contamination pendant la culture. Le fractionnement du Cd racinaire, tel que décrit dans le chapitre 2 de la partie 1, permet de distinguer l'adsorption du Cd sur les parois, de l'absorption du métal dans le milieu intracellulaire. L'expérimentation est menée sur deux plantes dont les demandes en Cd sont contrastées : d'une part notre variété de maïs, et d'autre part notre écotype hyperaccumulateur du tabouret calaminaire (Nc-H).

I. Matériels et méthodes

I.1. Culture des plantes

Après germination, les plantules sont cultivées en conditions hors-sol dans le même phytotron. Les tabourets calaminaires sont dans un premier temps cultivés en aéroponie (trois semaines) pour accélérer la croissance et éviter les pertes, puis en hydroponie (cinq semaines). Les maïs sont quant à eux directement cultivés en hydroponie. La durée totale de la culture est de 20 jours pour le maïs et de huit semaines pour le tabouret calaminaire. Les cultures sont menées de telle sorte à obtenir des plantes contenant trois teneurs contrastées en Cd à l'issue de la culture. Trois lots de plantes sont donc cultivés pour chacune des deux espèces. Le premier lot est le celui des plantes témoins, cultivées en absence totale de Cd. Pour les deux autres lots de plantes, la solution hydroponique est contaminée en Cd (sous forme de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) pendant la deuxième moitié du temps de culture, la première phase permettant aux trois ordres racinaires de se développer. Pour assurer un contraste de teneur en Cd entre ces deux lots de plantes, les concentrations en solution sont de 0,1 μM pour l'un, et de 10 μM Cd pour l'autre.

Le choix de la durée des cultures (8 semaines pour le tabouret calaminaire et 20 jours pour le maïs) a été fait selon deux critères. Le premier concerne la masse racinaire. Celle-ci doit être suffisamment importante pour contenir, au bout d'une heure d'exposition, des concentrations quantifiables de ^{109}Cd dans les différentes solutions de désorption lors du fractionnement du Cd racinaire ; d'autre part, elle doit être suffisamment réduite pour ne pas prélever plus de 10 % du Cd initial dans les 650 ml de solution marquée, de manière à ce que la concentration externe puisse être considérée constante. Le deuxième critère concerne l'exposition des plantes au Cd au cours de la culture : pour savoir si des mécanismes internes sont mis en œuvre pour réguler le prélèvement, nous avons voulu limiter un facteur externe de taille qui est la morphologie racinaire. En effet, des essais préliminaires montrent qu'une contamination au Cd dès le premier jour de culture réduit drastiquement la croissance racinaire, tant dans son élongation que dans sa ramification.

I.2. Cadmium total dans les plantes

Des plantes de chaque lot sont sacrifiées au terme de la culture pour quantifier le Cd stable qu'elles ont accumulé. Pour cela, les parties racinaires et aériennes sont séparées, séchées dans un four (trois jours à 72°C), puis broyées dans un broyeur à agate (Retsch, Germany) avant d'être digérées dans un four à micro-ondes (Mars 5, CEM Corporation, Matthews, Caroline du Nord, USA). Le Cd présent dans le matériel végétal minéralisé est alors quantifié par un

Spectromètre d'Absorption Atomique à plasma induit d'argon (ICP-OES Liberty II, Varian, Inc, Palo Alto, Californie, USA).

I.3. Caractérisation du prélèvement racinaire

Les autres plantes issues de chacun des six lots sont utilisées pour des prélèvements de courte durée dans des solutions marquées (chapitre précédent). Le système racinaire de chaque plante est exposé pendant une heure à 650 ml de solution de Cd marqué, de manière à estimer la vitesse de prélèvement du métal en fonction de la concentration externe en solution et du niveau de Cd dans les tissus de la plante. En raison de la lourdeur de l'expérimentation, ces solutions d'exposition sont limitées à trois concentrations au lieu des huit utilisées pour tracer les isothermes d'absorption : 0,1 μM , 10 μM et 50 μM . Le choix de ces concentrations est directement lié aux résultats obtenus dans le chapitre précédent. La concentration externe de 0,1 μM nous informera sur le comportement du HATS et celle de 50 μM sur le comportement du LATS, tandis que 10 μM est choisie comme concentration intermédiaire pour vérifier la tendance entre les deux concentrations extrêmes.

Avant leur immersion dans la solution radiomarkée, les racines sont rincées et exposées à un traitement de désorption. Cette étape est nécessaire pour minimiser la contamination de la solution d'exposition (marquée au ^{109}Cd) par du Cd stable se désorbant des parois cellulaires, puisque celles-ci ont été exposées au métal durant la culture. Pour cela, chaque système racinaire est immergé pendant quatre heures dans 80 ml de solution contenant 5 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ et tamponnée avec 2 mM de MES (pH=5,7), puis pendant deux heures dans 80 ml de solution contenant 0,5 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, également tamponnée à pH 5,7. Enfin, après un bref rinçage dans de l'eau distillée, les racines sont immergées dans les 650 ml de solution de CdCl_2 marquée au ^{109}Cd et contenant 0,5 mM de CaCl_2 et 2 mM de tampon MES (pH=5,7). L'exposition est conduite sans que la concentration en solution ne diminue significativement. Chaque système racinaire est ensuite séparé des parties aériennes avant de subir le protocole de fractionnement établi dans le chapitre précédent (Figure 2-13).

I.4. Statistiques

Pour chacune des concentrations d'exposition courte (0,1 μM , 10 μM et 50 μM), un test t de Student permet de comparer la quantité moyenne de Cd prélevée par des plantes faiblement ou fortement contaminées, avec la quantité de métal prélevée par les plantes témoins, qui n'ont pas été exposées au Cd durant la culture.

II. Résultats

II.1. Accumulation de Cd stable pendant la culture

La masse racinaire sèche n'est pas affectée par le niveau de contamination de la culture (Figure 3-7).

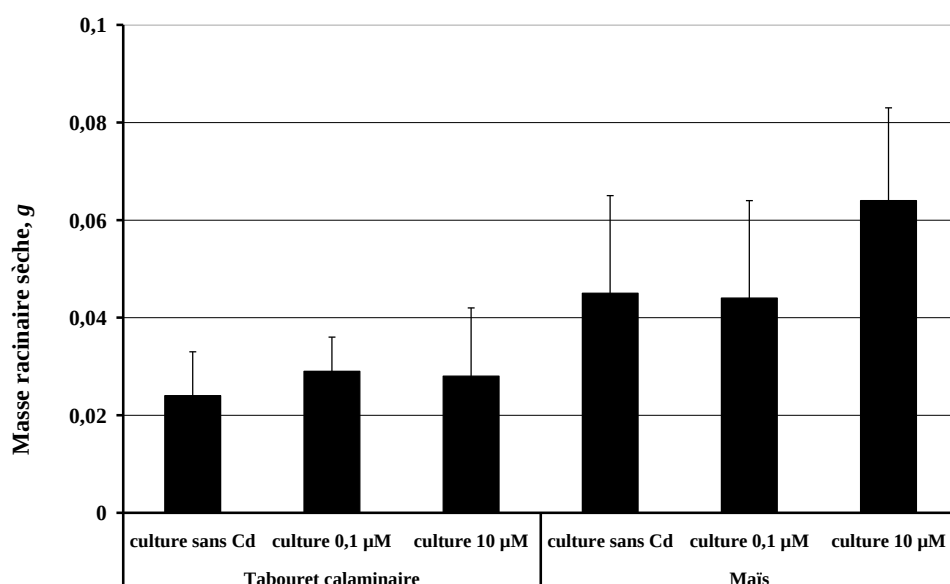


Figure 3-7. Masses racinaires sèches à l'issue des cultures en absence ou en présence de Cd

En revanche, des chloroses internervaires sont observées dans les plantules de tabouret calaminaire exposées pendant quatre semaines à 10 µM de Cd. Le tabouret calaminaire accumule plus de Cd dans ses parties aériennes que dans ses racines (par unité de masse sèche). C'est l'inverse chez le maïs (Figure 3-8) De plus, les quantités de Cd accumulées sont positivement corrélées au niveau de contamination du milieu de culture, ce qui montre que les niveaux de contamination choisis assurent l'obtention de teneurs en Cd contrastées au sein des plantes.

Chez le maïs de 20 jours cultivé pendant 10 jours dans 0,1 µM Cd, le métal se trouve 12 fois plus concentré dans les racines que dans les parties aériennes. Avec 10 µM dans la solution de culture, la teneur en Cd des parties aériennes se voit multipliée par 5,3 contre seulement 2,9 dans les parties racinaires. Cependant, la teneur en Cd dans les racines de maïs reste sept fois plus élevée que dans les parties aériennes (Figure 3-8 a).

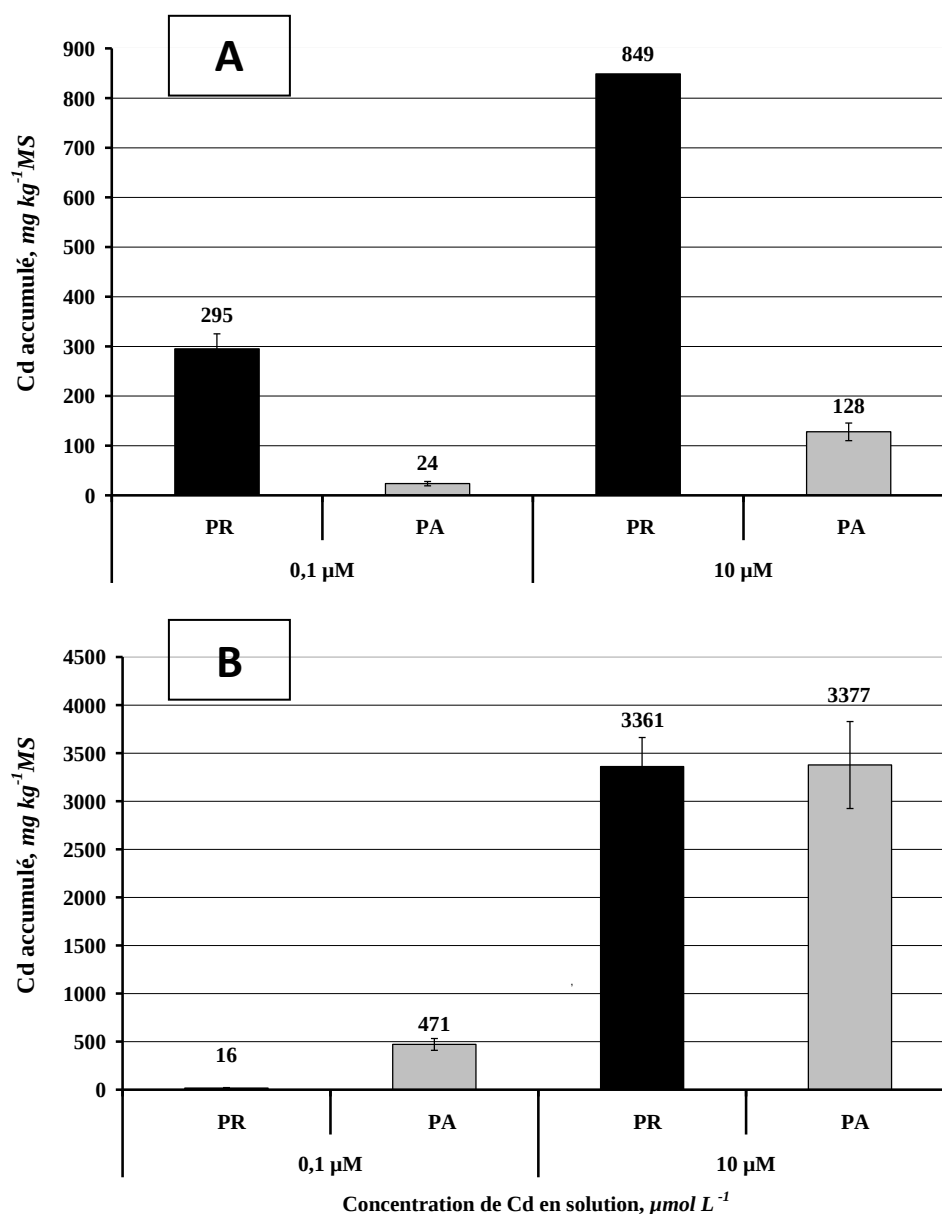


Figure 3-8. Teneurs de Cd dans les parties aériennes (PA) et les parties racinaires (PR) du maïs (A) et du tabouret calaminaire (B), à l'issue de 20 jours et 8 semaines de culture respectivement. Le Cd a été intégré à la solution de culture à raison de 0,1 µM et 10 µM, au cours de la deuxième moitié de la culture.

Le tabouret calaminaire présente des caractéristiques d'accumulation différentes (Figure 3-8 b). Suite à quatre semaines d'exposition à 0,1 µM Cd, le tabouret calaminaire âgé de huit semaines accumule 29 fois plus de Cd dans ses parties aériennes que dans ses parties racinaires. Cet écart est très significativement réduit lorsque la plante est cultivée dans 10 µM de Cd. En effet, de la contamination de 0,1 µM à celle de 10 µM, la teneur en Cd est multipliée par 210 dans les racines, tandis qu'elle n'augmente que d'un facteur de 7 dans les

parties aériennes. Il en résulte des teneurs identiques dans les deux parties de la plante, avec 3,4 g de Cd par unité de masse sèche dans les racines comme dans les feuilles (Figure 3-8 b).

II.2. Exposition courte au Cd marqué après culture dans les trois niveaux de contamination

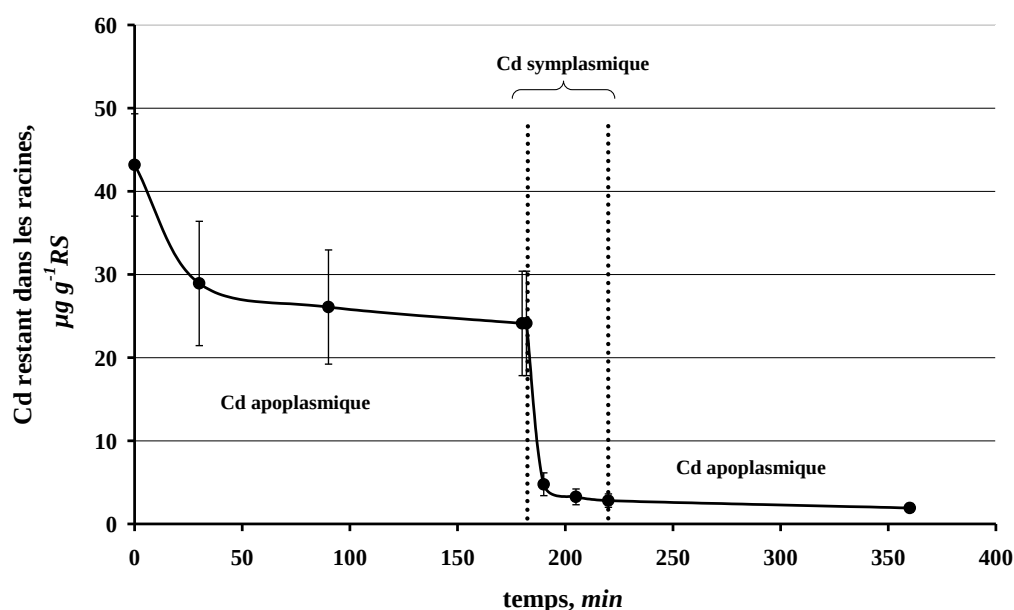


Figure 3-9. Cd restant dans les racines de tabouret calaminaire au cours du protocole de fractionnement, après une heure de prélèvement dans 0,1 μM Cd ; la culture hydroponique était contaminée avec 0,1 μM de Cd pendant les quatre dernières semaines de culture.

Le fractionnement donne des résultats similaires à ceux présentés dans le chapitre 2 de la partie 1, avec une distinction claire entre le Cd apoplasmique et le Cd intracellulaire (Figure 3-9).

Les sorptions apoplasmique et symplasmique augmentent avec la concentration externe en solution, quelle que soit la quantité de Cd accumulée au cours de la culture (Figure 3-9 et Figure 3-10). Dans ce qui suit, les résultats obtenus pour les plantes témoins ne sont pas analysés puisque ce travail a été fait de façon exhaustive dans le chapitre 2 de la partie 1 ; les résultats des plantes pré-exposées au Cd sont comparés statistiquement aux résultats des plantes témoins.

II.3. Après la culture dans 0,1 μM Cd

Chez les deux espèces, la faible accumulation interne de Cd (pendant la culture dans 0,1 μM Cd) n'affecte pas la vitesse de prélèvement dans la solution de 0,1 μM Cd, que ce soit dans le compartiment apoplasmique (Figure 3-11) ou dans le compartiment symplasmique (Figure 3-10). En revanche, les deux espèces montrent des comportements contrastés lorsqu'elles sont exposées à 10 μM ou 50 μM de Cd après culture dans 0,1 μM Cd. En effet, les racines de la plante hyperaccumulatrice présentent une augmentation significative de l'influx membranaire, mais aucun impact sur l'adsorption apoplasmique. Au contraire, les racines de maïs montrent une réduction significative du prélèvement de Cd, à la fois dans les compartiments symplasmique et apoplasmique.

II.4. Après la culture dans 10 μM Cd

Après une accumulation interne élevée en Cd (après culture dans 10 μM Cd), l'influx symplasmique dans les racines est généralement réduit chez les deux espèces, quelle que soit la concentration de la solution d'exposition. Cette réduction dans la vitesse d'absorption est plus significative chez le maïs que chez le tabouret calaminaire. Néanmoins, les deux espèces montrent que cette réduction est nettement plus significative lorsque l'on considère les concentrations les plus basses en solution (0,1 μM Cd et 10 μM Cd). En ce qui concerne la sorption du métal sur les parois, il apparaît chez les deux espèces que la culture dans 10 μM Cd est responsable d'une augmentation significative de la vitesse d'adsorption du Cd.

III. Discussion

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que le transport du Cd à travers les membranes des cellules racinaires est assuré par au moins deux systèmes de transport différents : l'un prédominant aux basses concentrations (système de transport à forte affinité pour le Cd ou HATS) et l'autre prévalant aux fortes concentrations (système de transport à faible affinité pour le Cd ou LATS). Pour le maïs, le HATS prédomine pour les concentrations externes inférieures à 1 μM , tandis qu'il prédomine jusqu'à 30 μM pour le tabouret calaminaire. Ainsi, l'exposition à 0,1 μM concerne le HATS pour les deux plantes étudiées, tandis que les concentrations externes de 10 et 50 μM concerneront plus ou moins le LATS.

D'après nos résultats, l'accumulation chronique de Cd n'exerce pas la même influence sur les différentes composantes du prélèvement racinaire (parois et symplasme). D'autre part,

l'impact de cette exposition chronique au Cd varie selon la concentration dans la solution externe, c'est-à-dire en fonction du système de transport concerné.

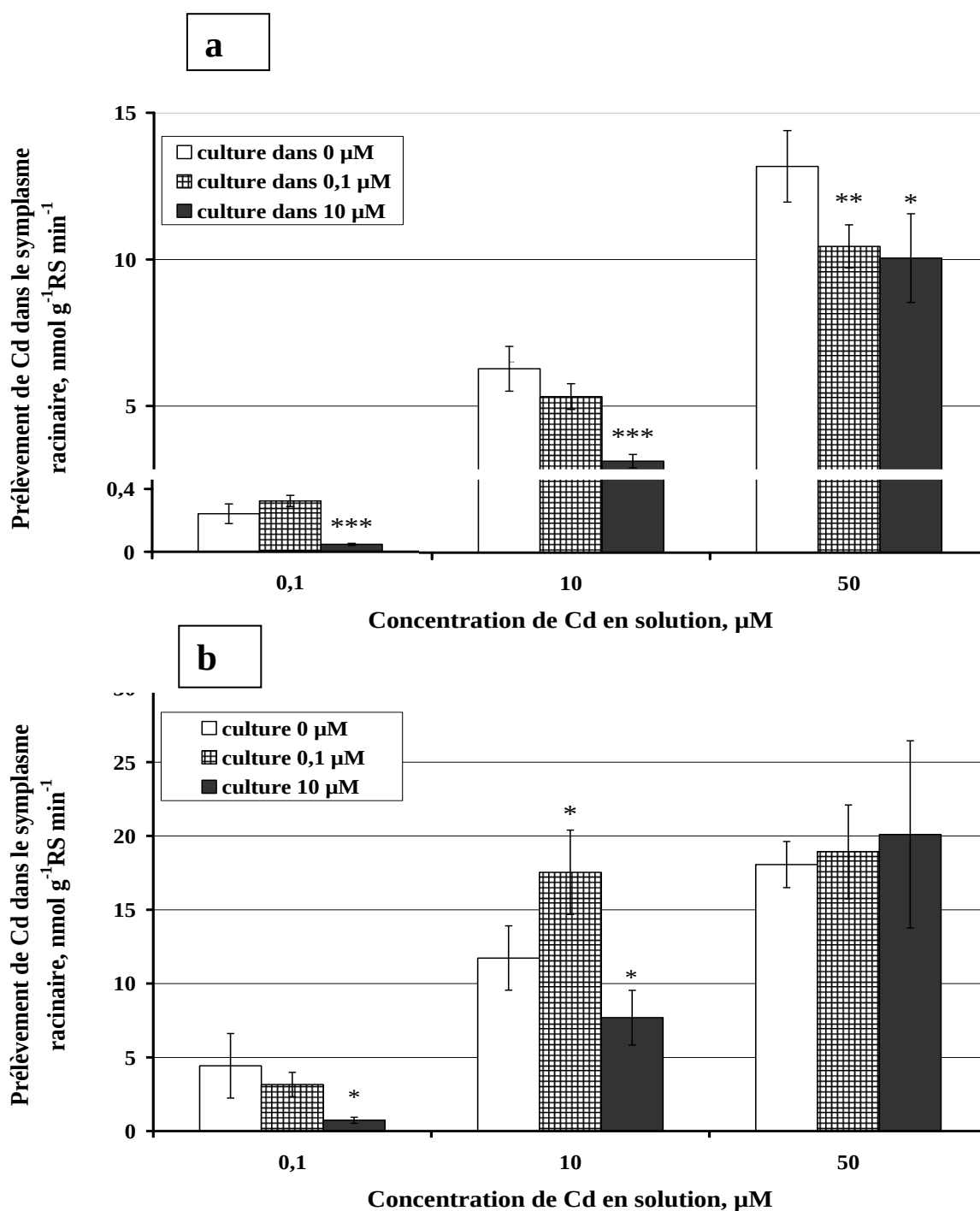


Figure 3-10. Influx symplasmique de Cd après une heure d'exposition à 0,1 μM , 10 μM ou 50 μM de CdCl_2 ; les plantes ont été cultivées dans des solutions hydroponiques, selon trois modalités : en absence de Cd, dans 0,1 μM Cd ou dans 10 μM Cd. Les barres représentent les valeurs moyennes de 4 et 5 répétitions pour le maïs (a) et le tabouret calaminaire (b) respectivement, et les barres d'erreur représentent deux écarts-types.

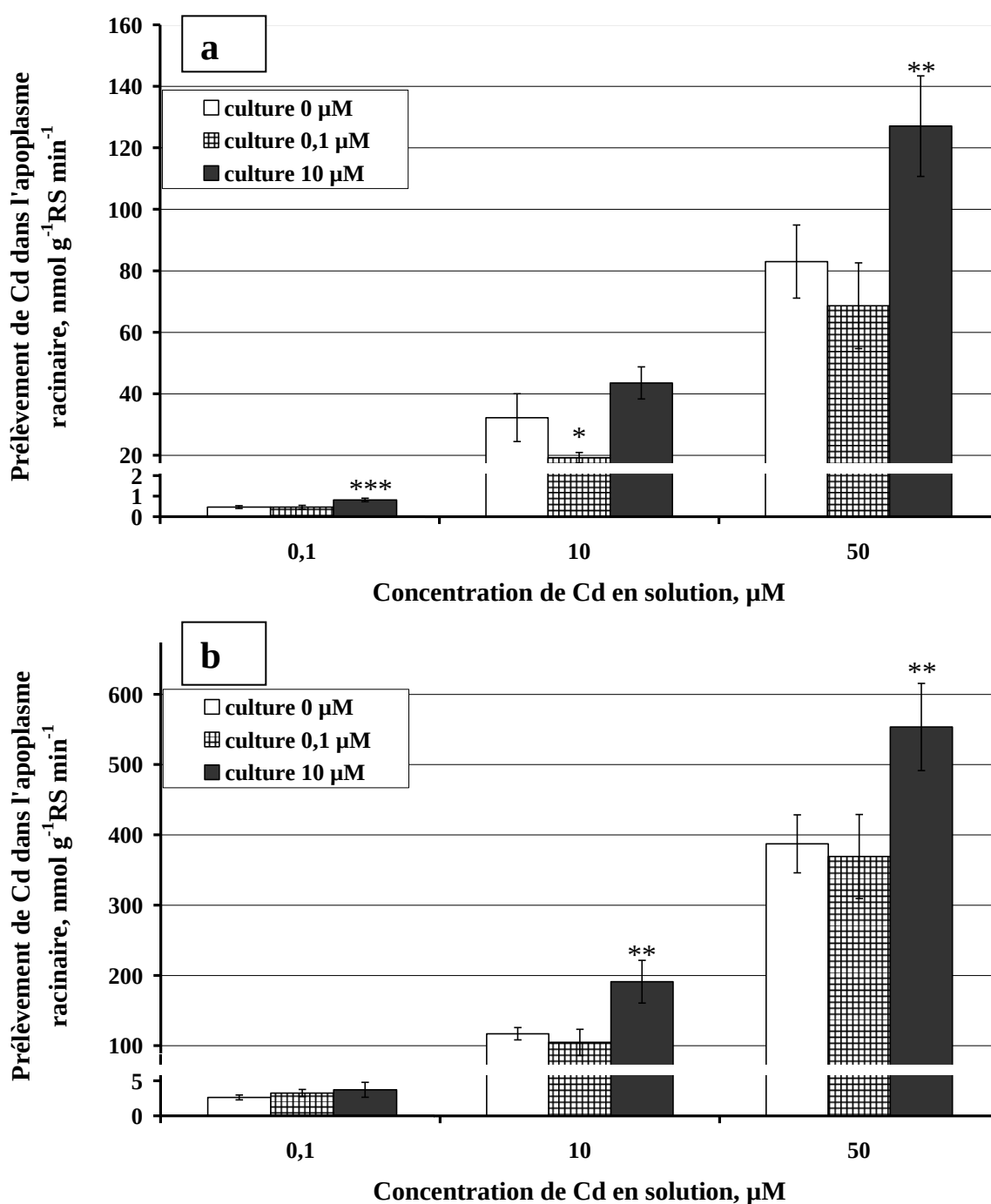


Figure 3-11. Prélèvement apoplasmique de Cd au cours d'une heure d'exposition à 0,1 µM, 10 µM ou 50 µM µM de CdCl₂ ; les plantes ont été cultivées dans des solutions hydroponiques, selon trois modalités : en absence de Cd, dans 0,1 µM Cd ou dans 10 µM Cd. Les barres représentent les valeurs moyennes de 4 et 5 répétitions pour le maïs (a) et le tabouret calaminaire (b) respectivement, et les barres d'erreur représentent deux écart-types.

III.1. Accumulation du Cd pendant la culture

La distribution du Cd dans les plantes confirme les données de la littérature sur les caractéristiques des hyperaccumulateurs et des non-accumulateurs.

0,1 μM est une concentration de Cd réaliste, représentative de ce que beaucoup de sols contaminés peuvent contenir dans leur solution. Après une exposition à long terme à cette concentration en solution, le maïs et le tabouret calaminaire dévoilent des caractéristiques d'accumulation très contrastées, en accord avec les données de la littérature : l'hyperaccumulateur accumule le métal préférentiellement dans les parties aériennes, tandis que le non-accumulateur stocke le métal dans ses parties racinaires. La translocation du Cd vers les parties aériennes du maïs n'est pas négligeable pour autant. D'où les risques bien connus de transfert du polluant métallique du sol vers la chaîne alimentaire.

10 μM est une concentration très élevée qui ne se présente dans la nature que de façon très localisée, par exemple sur des friches industrielles. A l'issue de 10 jours de culture dans 10 μM , le maïs accumule toujours sensiblement plus de Cd dans le système racinaire que dans les parties aériennes. Cependant, comparée à la culture dans 0,1 μM , il apparaît que la culture dans 10 μM n'accroît pas les teneurs racinaires autant que les teneurs foliaires. C'est le contraire chez le tabouret calaminaire, pour qui la culture dans 10 μM entraîne une toute autre distribution du Cd, avec des teneurs qui s'équilibrent entre les parties racinaires et aériennes ; cette nouvelle distribution du Cd proviendrait soit d'une absorption racinaire qui ne compense pas la vitesse de translocation vers les parties aériennes, soit d'une redistribution du Cd foliaire vers les racines des plantes.

III.2. Régulation symplasmique

III.2.1. Après une exposition chronique à une faible concentration (0,1 μM)

L'influx du HATS du maïs et du tabouret calaminaire n'est pas du tout affecté par une faible accumulation interne de Cd pendant la culture (exposition chronique à 0,1 μM). La soustraction du Cd libre du cytosol par sa complexation avec les phytochélatines (PCs) et son transport éventuel vers la vacuole ou les parties aériennes pourrait en effet limiter le besoin d'une réduction de l'influx symplasmique (Larsson *et al.*, 2002). En revanche, les plantes ne présentent pas le même comportement face aux fortes concentrations en solution : la faible contamination pendant la croissance régulerait négativement le LATS du maïs mais pas celui du tabouret calaminaire, chez qui un effet stimulateur est observé pour l'exposition courte à une solution contenant pour 10 μM Cd (Figure 3-10).

III.2.2. Après une exposition chronique à une forte concentration (10 μM)

A la suite d'une forte accumulation de Cd pendant la croissance, l'influx de Cd symplasmique dans les deux plantes se trouve significativement réduit. Une telle réduction du prélèvement intracellulaire de Cd a déjà été observé sur les protoplastes racinaires de blé (Lindberg *et al.*, 2007). Elle pourrait provenir d'une régulation négative des systèmes de transport à forte et à faible affinité pour le Cd. Cette régulation de l'absorption est plus élevée dans le cas des expositions courtes aux concentrations les plus basses, ce qui suppose que cette régulation négative affecte en premier lieu le système de transport à forte affinité.

La diminution de l'influx intracellulaire de Cd suite une exposition chronique à 10 μM de Cd peut également résulter d'une régulation positive de l'extrusion du Cd^{2+} , de l'espace intracellulaire vers l'espace extracellulaire. Cette régulation peut provenir de la stimulation de l'efflux de complexes PC-Cd (Jasinski *et al.*, 2003), du système antiport $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^{+}$ (Salt et Wagner, 1993) ou encore de l'excrétion de vésicules (Seregin et Kozhevnikova, 2008).

III.2.3. Conclusion sur la régulation de l'influx symplasmique

Nos résultats suggèrent, chez les deux espèces, une régulation de l'influx membranaire contrôlée par une valeur seuil de teneur interne en Cd. Une accumulation chronique de Cd suite à une longue exposition à 0,1 μM de Cd, se situerait en-deçà de cette valeur seuil, grâce par exemple à la séquestration du métal libre par les PC.

En revanche, la longue exposition à 10 μM conduirait à dépasser cette limite, ce qui expliquerait la régulation négative significative de l'influx symplasmique. On peut imaginer que la densité ou l'activité des protéines membranaires du HATS serait régulée par l'organisme de la plante en réponse à l'insuffisance de PCs pour prendre en charge la grande quantité de Cd libre dans le cytosol. Il est également envisageable qu'une régulation soit déclenchée par une concentration seuil dans les parties aériennes. Enfin, comme nous le verrons dans les paragraphes suivants, une meilleure séquestration du Cd par les parois cellulaires pourrait aussi réduire significativement la vitesse d'absorption du Cd à travers les membranaires des cellules racinaires.

III.3. Régulation apoplasmique

Chez les deux espèces, l'efficacité de sorption du Cd par les parois est améliorée suite à une pré-exposition prolongée dans un milieu fortement contaminé (10 μM), alors qu'une exposition à seulement 0,1 μM n'a en général aucune incidence sur les teneurs en Cd

retrouvées dans les parois cellulaires de racines. Cette augmentation des capacités d'adsorption du métal après une forte exposition au Cd peut s'expliquer de différentes manières.

Elle pourrait provenir tout simplement de la régulation négative du prélèvement intracellulaire : en effet, si l'influx transmembranaire du Cd est ralenti par une disponibilité réduite des transporteurs ou canaux membranaires, le métal s'accumule dans le compartiment apoplasmique. Cependant, la réduction de l'influx symplasmique est très faible comparée à l'augmentation de l'adsorption apoplasmique. Elle ne suffit donc pas à expliquer le niveau accru d'adsorption du métal sur les parois. En conséquence, ce sont les propriétés pariétales qui pourraient être à l'origine de la diminution de l'influx symplasmique ; le flux du métal à travers les parois serait davantage freiné que dans les plantes témoins, ce qui ralentirait son flux à travers les membranes.

Cette réaction des parois vis-à-vis du Cd semble résulter d'une augmentation de leur CEC. Or la CEC est directement liée aux pectines très présentes dans les parois externes de la cellule, à savoir la lamelle moyenne en particulier. Il a été démontré en outre que le Cd exerce un stress sur la plante, et que la composition des parois des cellules racinaires s'en trouve affectée. En effet, la CEC des parois peut être accrue par le biais d'enzymes capables de réguler la méthylestérification des acides uroniques contenus dans la pectine et l'hémicellulose. En présence de stress cadmié, la pectinméthylestérase (PME), enzyme produite dans le système de Golgi des cellules et excrétée vers la paroi, voit son activité fortement réduite : les groupes carboxyliques qui se trouvent sur les acides uroniques sont moins méthylés ou moins estérifiés, rendant la pectine plus apte à adsorber les métaux, puisque le groupe acide est plus hydrophile que les groupes méthyl et ester. Ainsi, le stress cadmié augmente significativement le ratio pectines acides/pectines estérifiées, d'où l'élévation de la CEC racinaire, particulièrement dans la lamelle moyenne (Konno *et al.*, 2005; Iraki *et al.*, 1989; Shedletzky *et al.*, 1990; Kaplan *et al.*, 1987; Douchiche *et al.*, 2007). Ces résultats sont par ailleurs confortés par ceux rapportés sur le Cu (Konno *et al.*, 2005), l'Al (Eticha *et al.*, 2005) ou encore le Pb (Khotimchenko *et al.*, 2004 ; Kartel *et al.*, 1999 ; Sergucshenko *et al.*, 2007). C'est donc l'abaissement du degré d'estérification qui stimulerait l'adsorption des ETM (Kupchik *et al.*, 2006), améliorant ainsi la tolérance de la plante vis-à-vis du métal. Les pectines, très présentes sur toutes les surfaces pariétales externes, joueraient donc un rôle éminent dans l'adsorption du Cd et dans la régulation de la tolérance de la plante vis-à-vis du métal.

Dans une moindre mesure, la production de lignine par la plante peut également augmenter les capacités de rétention du Cd dans les parois racinaires. En effet, la lignine est composée de polymères d'alcools aromatiques, et sa porosité est particulièrement appropriée à l'adsorption des métaux, puisque la taille de ses pores équivaut à la taille des métaux (Martin, 1980). Etant donné que le Cd stimule les dépôts de lignine dans les parois (Yang *et al.*, 2007 ; Van de Mortel *et al.*, 2008), le stress cadmié peut donc augmenter la proportion de lignine dans le matériel pariétal, augmentant ainsi la capacité d'adsorption du Cd (Basso *et al.*, 2005).

Etant donné que le niveau de contamination n'a pas eu d'influence significative sur la masse sèche racinaire, il est fort probable que les différents traitements n'aient pas affecté significativement la proportion de racines jeunes par rapport aux racines âgées, et n'aient donc pas diminué la CEC par le biais de la moyenne d'âge racinaire. Par conséquent, l'effet non significatif de la faible contamination en Cd sur l'adsorption apoplasmique pourrait s'expliquer par l'existence d'un seuil de stress au-dessous duquel les mécanismes de régulation de la PME ou de la lignification sont insignifiants.

Enfin, n'oublions pas les exsudats racinaires, ainsi que les microorganismes présents bien sûr dans nos solutions de culture non stériles. Les exsudats racinaires et les micro-organismes sont bien connus pour leur capacité d'adsorption des ETM. D'après la littérature, l'effet des micro-organismes peut être significatif. Par exemple, des études rapportent que des exsudats stériles, non stériles, et stériles mais filtrés à 0,45 μm , augmentent l'adsorption du Cd de 66, 102, and 72%, respectivement (Lin *et al.*, 2003, dans Dong *et al.* 2007). La culture en présence de Cd peut avoir augmenté l'excrétion d'exsudats racinaires et/ou la prolifération de bactéries à forte capacité d'adsorption pour le métal.

IV. Conclusion

Nos résultats montrent que la CEC des parois et le HATS sont plus sensibles à la régulation que ne l'est le LATS. Cela suggère que la CEC et les transporteurs membranaires sont plus sujets à la régulation que ne l'est celle des canaux ioniques. D'ailleurs, si la littérature rapporte un transport de Cd significativement régulé par des transporteurs de Fe et de Zn (Cohen *et al.*, 1998 ; Hart *et al.*, 2002), elle ne mentionne en revanche aucune régulation des canaux calciques ou magnésiques empruntés par le métal.

Contrairement aux concentrations de 10 μM et 50 μM , celle de 0,1 μM correspond à une teneur réaliste de Cd en solution de sol. D'après nos résultats, les éventuels mécanismes

internes de régulation ne modifient pas significativement les paramètres cinétiques dans la gamme des concentrations inférieures à 0,1 μM en solution, mais qu'ils peuvent les affecter pour des sols plus contaminés.

D'autre part, il faut bien noter que cette expérimentation avait pour but de déceler d'éventuels mécanismes internes de régulation du prélèvement racinaire du Cd, en limitant l'impact du métal sur la morphologie et la croissance racinaires. Pour ce, le Cd n'a été introduit en solution qu'après développement des ordres racinaires. Il serait intéressant de cultiver des plantes dans du Cd dès le stade de germination, pour estimer cette fois l'influence des caractéristiques morphologiques et histologiques sur l'absorption du Cd.

Enfin, les résultats de cette expérimentation apportent un argument supplémentaire à l'interprétation de la composante linéaire de l'isotherme d'absorption. En effet, si cette composante ne renfermait que du Cd apoplasmique, sa valeur augmenterait significativement après la culture dans 10 μM , de la même façon que la fraction apoplasmique. Or ce n'est pas le cas, ce qui prouve bien que la composante linéaire distinguée par le fractionnement à l'azote liquide ne renferme que du Cd symplasmique.

Chapitre 3. Influence de l'architecture et de l'anatomie racinaires sur l'absorption du Cd par les racines de maïs

Introduction

Le prélèvement du Cd et des autres cations par les racines dépend de nombreux paramètres. C'est pourquoi la modélisation du transfert de Cd de la solution du sol vers les plantes exige de travailler dans des conditions contrôlées. Jusqu'à présent, les chercheurs qui étudient le prélèvement racinaire des éléments en conditions contrôlées, cultivent leurs plantes en hydroponie dans des phytotrons. En effet, c'est un milieu de culture permettant d'imposer des conditions environnementales comme la composition ionique de la solution, la température, l'hygrométrie ou encore la luminosité. Deuxièmement, ce milieu hors-sol produit des racines propres, dépourvues de particules de sol qui pourraient interférer avec le prélèvement et provoquer un biais dans l'évaluation de l'adsorption et de l'absorption racinaires. Dans les chapitres 1 et 2 de la Partie 2, nous avons mesuré les paramètres cinétiques de l'absorption du Cd par des racines de maïs cultivés en hydroponie ; avec de tels paramètres, le modèle RUSE (Perriguet, 2006) surestime de 100 % le prélèvement de Cd par le maïs cultivé en sol. C'est pourquoi nous nous sommes demandé si des différences d'architecture et d'anatomie entre les racines cultivées en sol et en hydroponie pouvaient expliquer cet écart entre les prélèvements simulé (par le modèle) et mesuré (en pot). En effet, l'hydroponie promouvrait la ramification racinaire (da Silva *et al.*, 2003), et il a été démontré que certaines conditions environnementales réduisent sensiblement la proportion de longueur racinaire portant des barrières apoplasmiques matures (Enstone *et al.*, 2003; Lux *et al.*, 2004; Schreiber *et al.*, 2005). Ces deux paramètres sont susceptibles de provoquer une meilleure absorption des cations en hydroponie qu'en sol.

Nous posons donc l'hypothèse que le milieu de culture utilisé pour estimer les paramètres cinétiques de l'absorption du Cd, à savoir l'hydroponie, expliquerait au moins en partie la surestimation du prélèvement de Cd par le modèle d'absorption racinaire. Pour ce, nous comparons les cinétiques d'absorption du Cd par des racines de maïs présentant des différences de caractéristiques architecturales et anatomiques. Ces systèmes racinaires contrastés sont obtenus par le biais de différents milieux de culture, à savoir l'hydroponie, l'aéroponie et le sol. Des observations macroscopiques et microscopiques permettent de caractériser l'architecture ainsi que l'avancement de maturation des racines primaires dans les

trois milieux de culture. Les cinétiques d'épuisement sont immédiatement suivies d'un fractionnement du Cd racinaire, afin d'estimer l'influence des barrières apoplasmiques sur les capacités d'accumulation de chacun des compartiments apoplasmique et symplasmique.

I. Matériels et méthodes

I.1. Cultures en hydroponie, aéroponie et sol

Les cultures de maïs (cultivar précédemment utilisé) sont menées en hydroponie, aéroponie et sur le sol (Figure 3-12). Les cultures dans les différents milieux durent 12 jours. La solution nutritive utilisée pour les cultures en hydroponie et en aéroponie est de la même composition que celle utilisée précédemment (chapitre 1 de la Partie 2). Les renouvellements sont réalisés deux fois par semaine. Les cultures en sol sont réalisées dans des rhizotrons contenant environ 3 kg d'horizon de surface d'un sol brun cultivé (Vannecourt, 57). Ce sol présente un pH légèrement acide, une texture limoneuse et une teneur en matière organique habituelle pour un horizon labouré. Après séchage et homogénéisation, le sol est tamisé à 5 mm. Chaque rhizotron contient un seul plant de maïs, et le sol est maintenu à 30 % de sa capacité au champ.

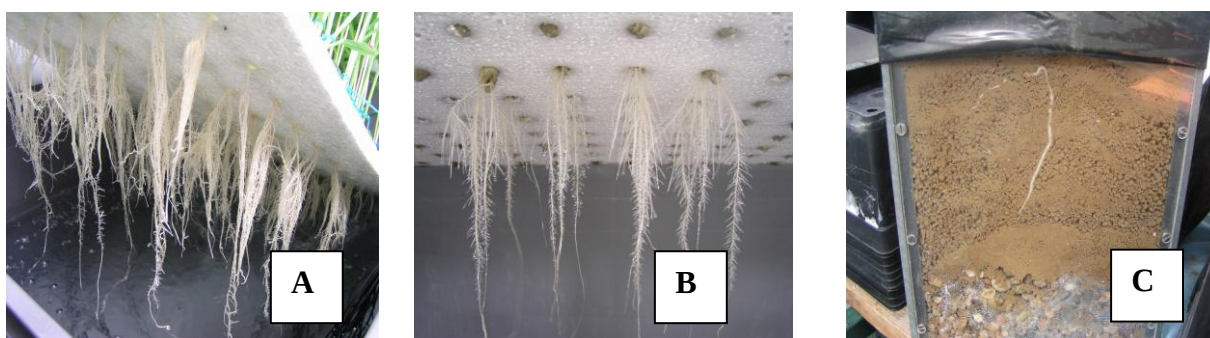


Figure 3-12. Culture de maïs en hydroponie (A), aéroponie (B) et sol (C).

I.2. Analyse de la morphologie et de l'anatomie racinaires

I.2.1. Observation macroscopique

Au terme des cultures en hydroponie, aéroponie et sol, les systèmes racinaires sont pesés à l'état frais, puis scannés pour être analysés par le logiciel WinRhizo en vue de mesurer divers paramètres comme le nombre d'apex par unité de masse ou de surface racinaire, la longueur racinaire totale et la surface totale. Les systèmes racinaires sont ensuite récupérés pour être séchés à l'étuve et pesés.

I.2.2. Anatomie racinaire

Les colorations sont réalisées sur des coupes de racines fraîches.

Les coupes transversales sont réalisées à main levée : des fentes sont pratiquées dans des tiges de moelle de sureau, et des segments racinaires d'environ 1 cm y sont introduits en forçant légèrement ; les segments racinaires et leur support sont alors finement coupés à l'aide de lames de rasoir Gillette. Les coupes longitudinales sont quant à elles effectuées à l'aide d'un vibratome. Le cas échéant, des segments racinaires de 4 mm sont inclus dans de l'agarose à 6 % (m/v). Après solidification de l'agarose au réfrigérateur, un cube d'inclusion est découpé autour de chaque segment racinaire, puis placé dans le vibratome pour la réalisation de coupes fines d'environ 40 µm.

Observation de la subérine amorphe

Avant de colorer les coupes racinaires, celles-ci sont « éclaircies » par une solution de berbérine hémisulfate (Sigma Aldrich) (0,1 % m/v) dissoute dans de l'acide lactique (Roth) saturé avec de l'hydrate de chloral (forme hydratée du trichloroacétaldéhyde). Les coupes restent immergées dans cette solution pendant une heure à température ambiante, puis sont rincées avant d'être colorées par une solution de berberine hémisulfate aqueuse à 0,1 % (w/v) pendant une demi-heure. Ensuite, les coupes sont rincées quelques secondes avant d'être post-colorées dans de la toluidine bleue O (Roth) à 0,1 % pendant 20 secondes, ou bien pendant moins d'une minute dans de la safranine O (Roth) (0,5 % dans de l'éthanol 50 %) (Lux *et al.*, 2005).

Observation des lamelles de subérine

Pour détecter les lamelles de subérine, une solution de jaune Fluorol 088 (Sigma Aldrich) concentré à 0,1 % dans de l'acide lactique saturé avec de l'hydrate de chloral, est chauffée à l'étuve à 70°C pendant une heure (Brundrett *et al.*, 1991; Lux *et al.*, 2005). Les coupes racinaires sont alors immergées durant une heure dans cette solution fraîchement préparée (solution instable). Les coupes subissent ensuite une post-coloration de 15 minutes dans la Safranine O (0,5 % dans de l'éthanol à 50 %).

Une fois colorées, les coupes sont montées entre lame et lamelle dans une goutte d'eau et de glycérol (v/v ; 1/1) ; lame et lamelle sont scellées avec du vernis à ongles. Les fluorochromes étant sensibles à la lumière et à la chaleur, les échantillons sont conservés en chambre froide (4°C) et à l'abri de la lumière.

La fluorescence est détectée par observation au microscope à épifluorescence.

Les bandes de Caspary sont observées grâce à un filtre d'excitation BP 365, tandis que les lamelles de subérine sont détectées grâce à des longueurs d'onde supérieures à 420 nm.

I.3. Cinétiques d'épuisement et compartimentation du Cd

I.3.1. Cinétiques de prélèvement du Cd

Les racines cultivées en sol sont dépotées, soigneusement lavées dans de l'eau distillée et soumises une dizaine de minutes aux ultrasons, pour détacher les nombreux agglomérats de sol attachés aux poils absorbants. Les racines cultivées en aéroponie et en hydroponie sont uniquement rincées dans l'eau distillée.

Chaque système racinaire (3 répétitions par milieu de culture) est ensuite immergé dans 650 ml de solution d'absorption marquée (Figure 3-13). La matrice de prélèvement contient le traceur radioactif ^{109}Cd , 0,5 mM de CaCl_2 , 0,5 (ou 1) μM de CdCl_2 , et enfin 2 mM de tampon MES. Le pH est ajusté à 5,7 par addition de quelques gouttes de KOH 1 M. Selon l'essai réalisé, la durée de prélèvement varie entre 9 et 21 heures. Des aliquotes de 250 ou 500 μl sont prélevés au sein de la solution pendant toute la durée de l'absorption racinaire.

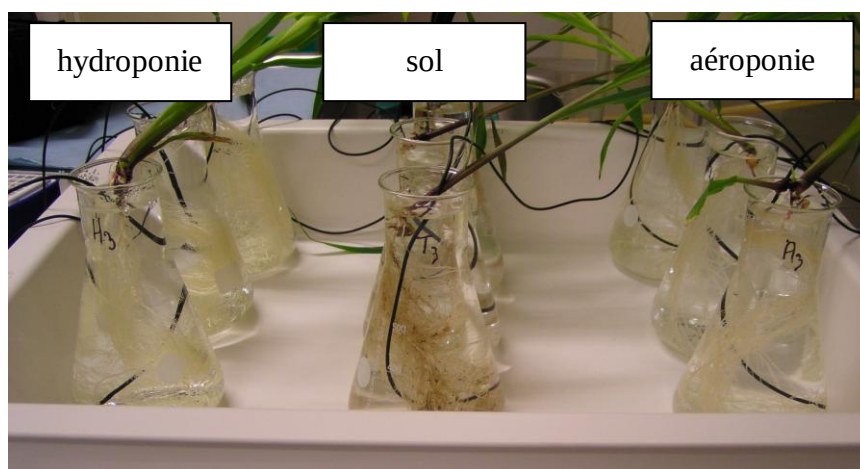


Figure 3-13. Exposition des plantes au Cd, dans des erlenmeyers de 650 ml de solution contenant 0,5 ou 1 μM CdCl_2 , 0,5 ml CaCl_2 et 2 mM MES (pH = 5,7), après 12 jours de culture en hydroponie, en sol ou en aéroponie.

I.3.2. Fractionnement du Cd

Au terme de la durée d'exposition, le Cd accumulé dans les racines est estimé dans les compartiments apoplasmique et symplasmique. Pour ce, les racines sont rincées dans de l'eau distillée pendant une dizaine de secondes, et délicatement égouttées sur du papier absorbant. Deux méthodes physico-chimiques de fractionnement sont utilisées pour parvenir à ce

fractionnement : des désorptions associées à un traitement au méthanol-chloroforme (Partie 2 chapitre 1), et une cinétique de désorption interrompue par une étape de congélation/décongélation (Figure 2-13).

Le Cd est quantifié comme expliqué dans la partie 1.

II. Résultats

II.1. Cinétiques de prélèvement et compartimentation du Cd racinaire

Les quantités de Cd dans les parties aériennes ne dépassent pas la limite de détection. Le Cd prélevé de la solution d'absorption ne s'accumule donc que dans les systèmes racinaires, ce qui est d'ailleurs confirmé par un bilan de masse.

Les systèmes racinaires cultivés en hydroponie et en aéroponie pèsent $4,2 \pm 1,9$ g et $4,9 \pm 0,4$ g respectivement, tandis que les racines extraites du sol pèsent seulement $2,4 \pm 0,6$ g. Après 13 heures d'exposition au Cd, les racines cultivées en hydroponie épuisent 94 % du Cd initial ($0,5 \mu\text{M}$) tandis que les racines cultivées en aéroponie et en sol en absorbent seulement 65 et 37 %, respectivement. Cependant, ce sont les racines extraites du sol qui sont les premières à saturer, alors que les racines cultivées en hydroponie et en aéroponie continuent d'absorber le métal (Figure 3-14 a). Les racines issues de l'aéroponie absorbent 1,5 à 2 fois plus lentement que les racines issues de l'hydroponie, particulièrement pendant les premières heures d'exposition. Une forte proportion (67 %) du métal prélevé par les racines cultivées dans le sol se trouve adsorbée aux parois de façon réversible (Figure 3-14 b), alors que la fraction apoplasmique non échangée atteint à peine 5 % du Cd total prélevé. Ce n'est pas le cas pour les racines cultivées hors-sol, chez qui le Cd échangeable représente 8 % et le Cd non échangeable 40 % du total de Cd absorbé, soit approximativement 50% du Cd qui dans le compartiment symplasmique.

La deuxième cinétique (Figure 3-15 a), réalisée à partir d'une concentration initiale de $1 \mu\text{M}$ au lieu de $0,5 \mu\text{M}$ précédemment, est stoppée avant l'épuisement de la solution : les racines hydroponiques ont absorbé 44 % du Cd initial tandis que les racines aéroponiques en ont absorbé seulement 31 %. Le fractionnement (Figure 3-15 b) révèle que les racines cultivées en hydroponie absorbent plus ($p < 0,002$) de Cd par unité de masse sèche et de temps que les racines cultivées en aéroponie (Figure 3-15 c), et que cette efficacité d'absorption se manifeste à la fois dans les compartiments symplasmique ($p = 0,0007$) et apoplasmique ($p = 0,008$) (Figure 3-15 c). En outre, la proportion du Cd intracellulaire par rapport au Cd total

prélevé, est significativement plus élevée ($p < 0,01$) dans les racines hydroponiques (58 %) que dans les racines aéroponiques (54 %) (Figure 3-15 c).

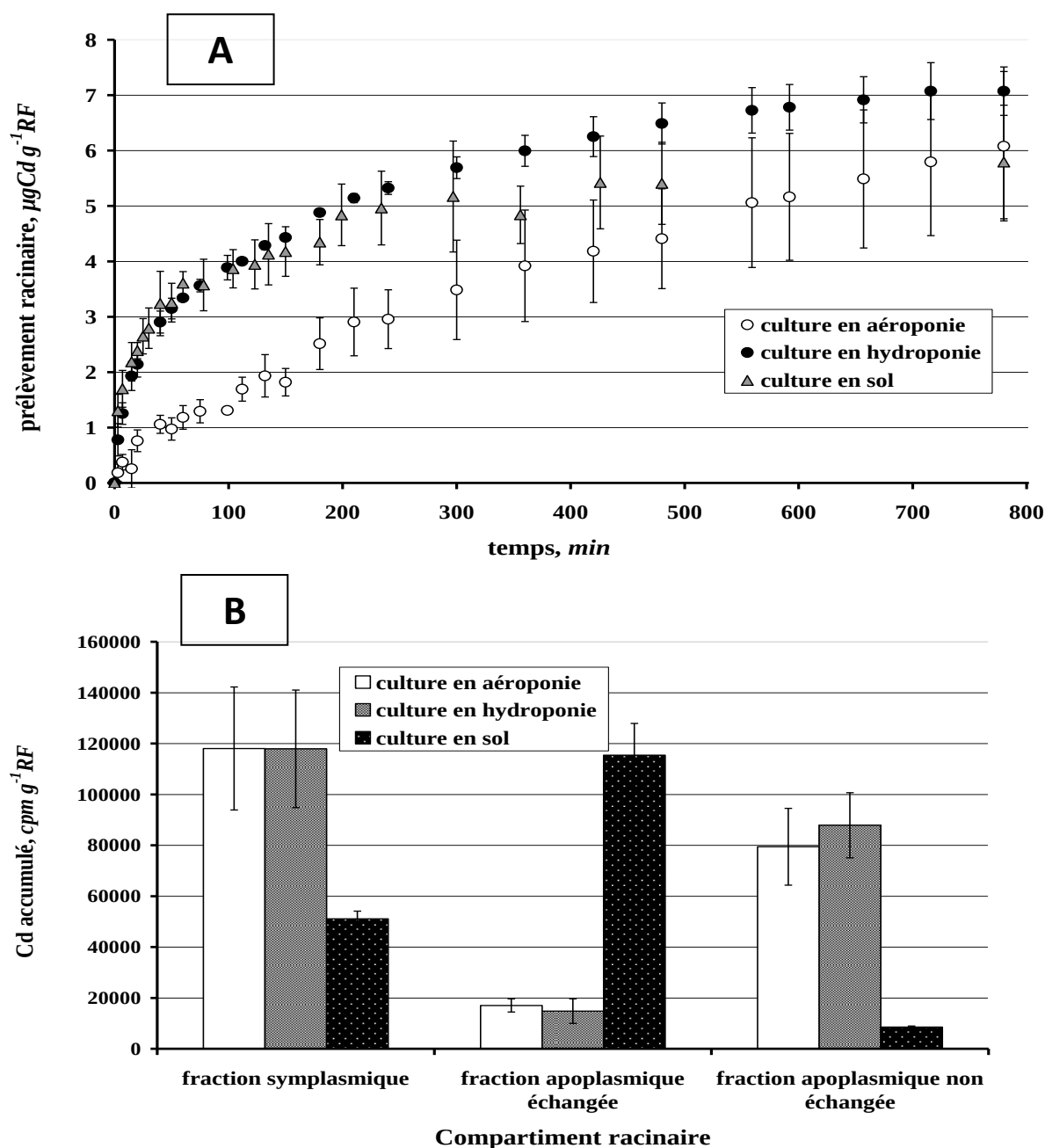
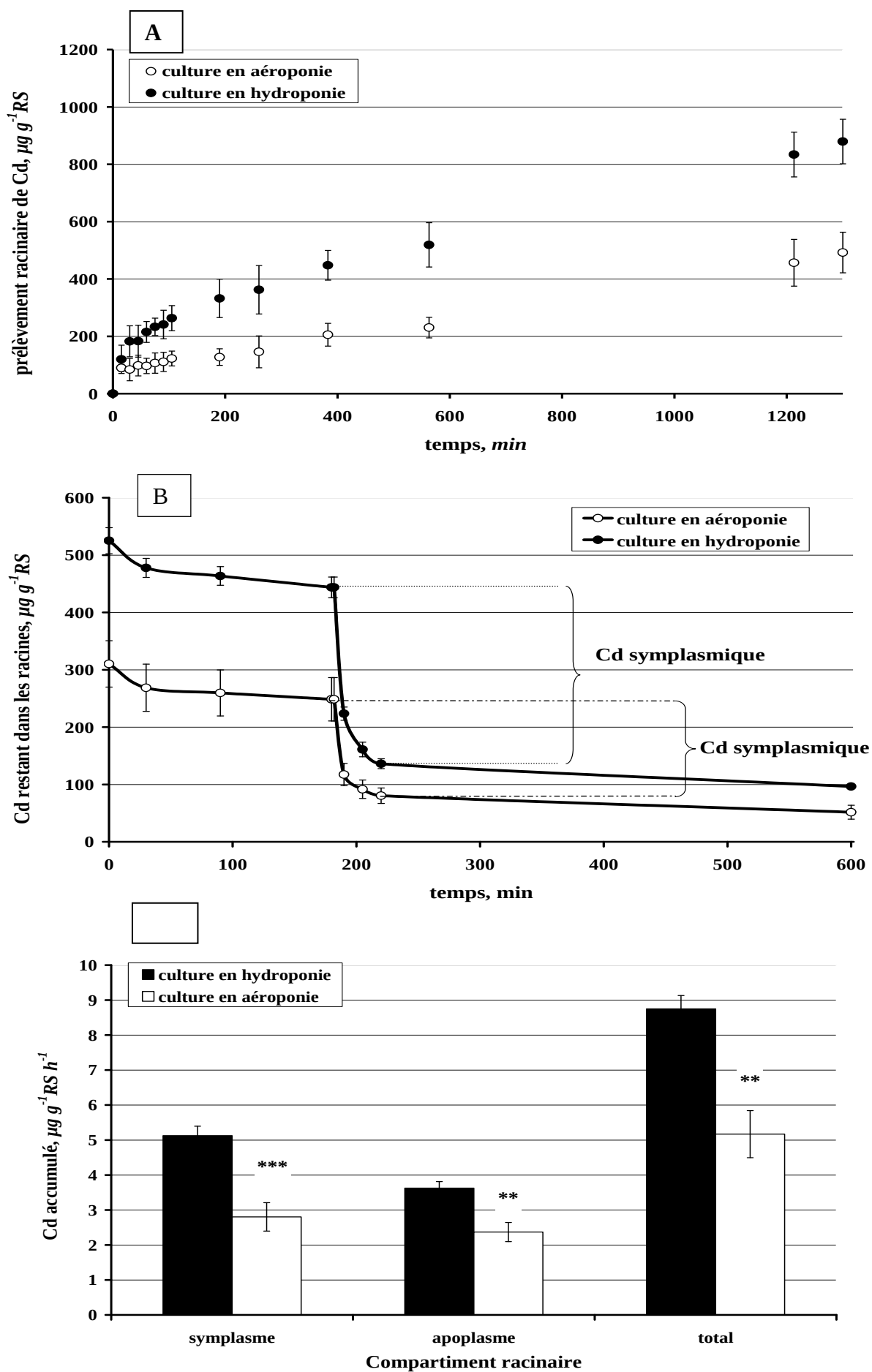


Figure 3-14. Cinétique d'accumulation du Cd (A) dans des systèmes racinaires issus de cultures aéroponique, hydroponique et en sol, dans 650 ml de solution contenant 0,5 μM CdCl_2 , 0,5 mM CaCl_2 et 2 mM MES (pH = 5,7). Compartimentation du Cd (B) dans ces racines à l'issue des 13 heures d'exposition au métal ; le Cd est fractionné par la méthode utilisant le méthanol-chloroforme (Partie 2 Chapitre 1).



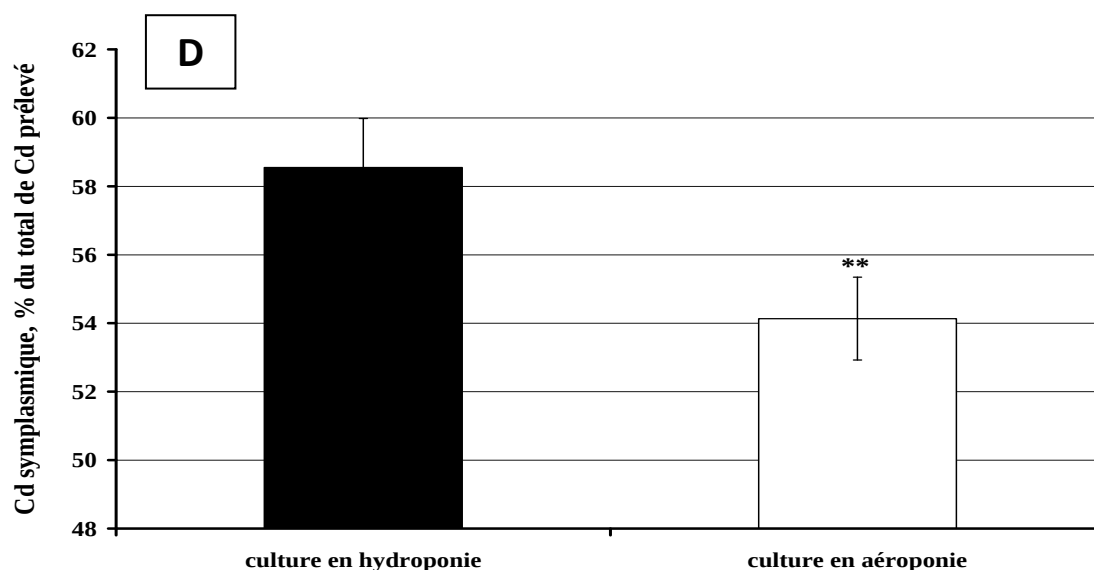


Figure 3-15. Cinétique d'accumulation du Cd (A) dans des systèmes racinaires issus de cultures aeroponique et hydroponique, dans 650 ml de solution contenant initialement 1 μM CdCl_2 , 0,5 mM CaCl_2 et 2 mM MES (pH = 5,7). Cd restant dans les racines (B) au cours du protocole de fractionnement utilisant l'azote liquide, suite aux 21 heures d'exposition au métal. Compartimentation du Cd racinaire d'après le fractionnement réalisé (C). Part de la fraction symplasmique dans la quantité totale de Cd accumulée dans les racines (D).

II.2. Observations morphologiques et anatomiques

II.2.1. Morphologie racinaire

Les racines cultivées en hydroponie sont quasiment dépourvues de poils absorbants, contrairement aux racines cultivées en aeroponie ou bien en sol chez lesquelles les poils absorbants prolifèrent sur toute leur longueur (Figure 3-16).

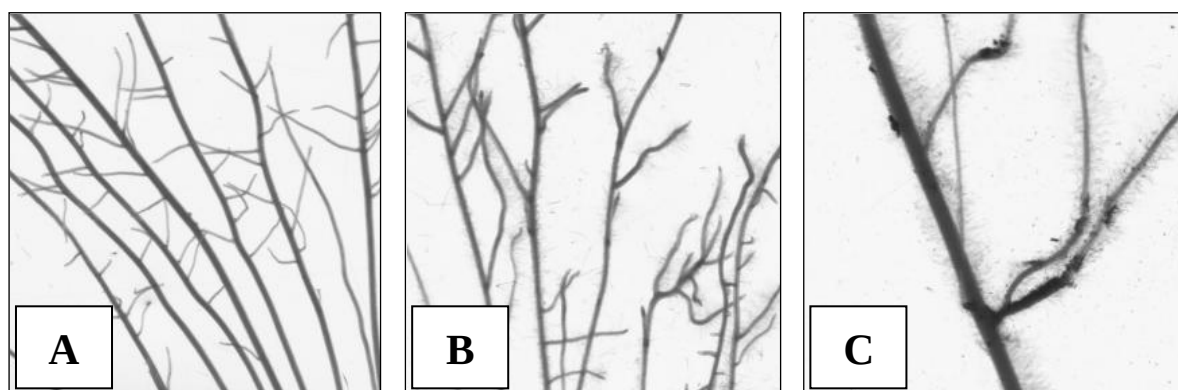


Figure 3-16. Racines de maïs cultivées en hydroponie (A), aeroponie (B) et sol (C)

D'après l'analyse de l'architecture racinaire par WinRhizo, le nombre d'apex par unité de masse ou de surface racinaire n'est pas significativement différent entre les trois milieux de culture.

II.2.2. Anatomie racinaire

Quel que soit le type de culture, les parois endodermes s'épaississent à mesure que l'on s'éloigne de l'apex. En témoignent la Figure 3-17 et la Figure 3-18 qui montre l'autofluorescence des bandes de Caspary endodermes et exodermes d'une racine séminale issue de culture aéroponique. Les mêmes observations sont réalisées sur les racines d'ordre secondaire (Figure 3-19).

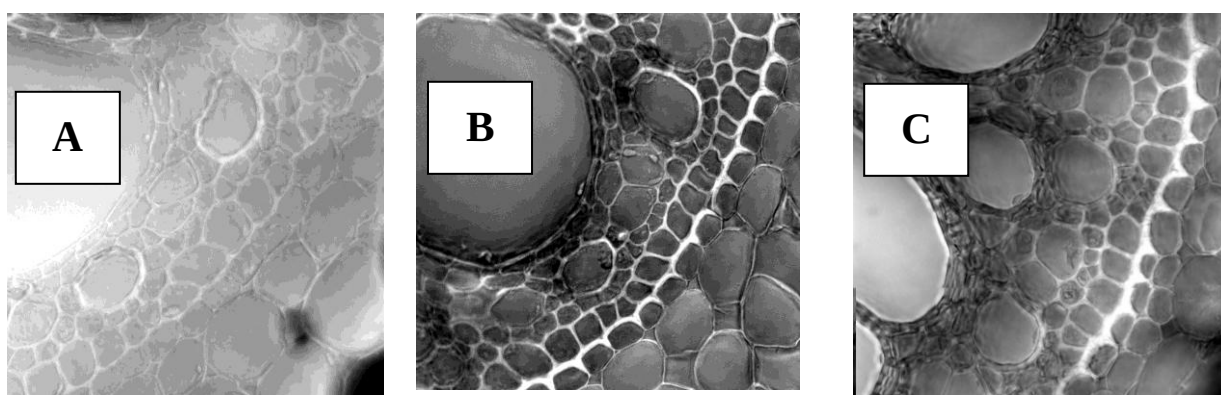


Figure 3-17. Coupes transversales de racine séminale issue d'une culture aéroponique et d'une longueur totale de 50 cm ; coupes réalisées à 5 cm (A), 20 cm (B) et 30 cm (C) de l'apex racinaire. Observation de l'endoderme à l'objectif 100 à immersion en lumière blanche.

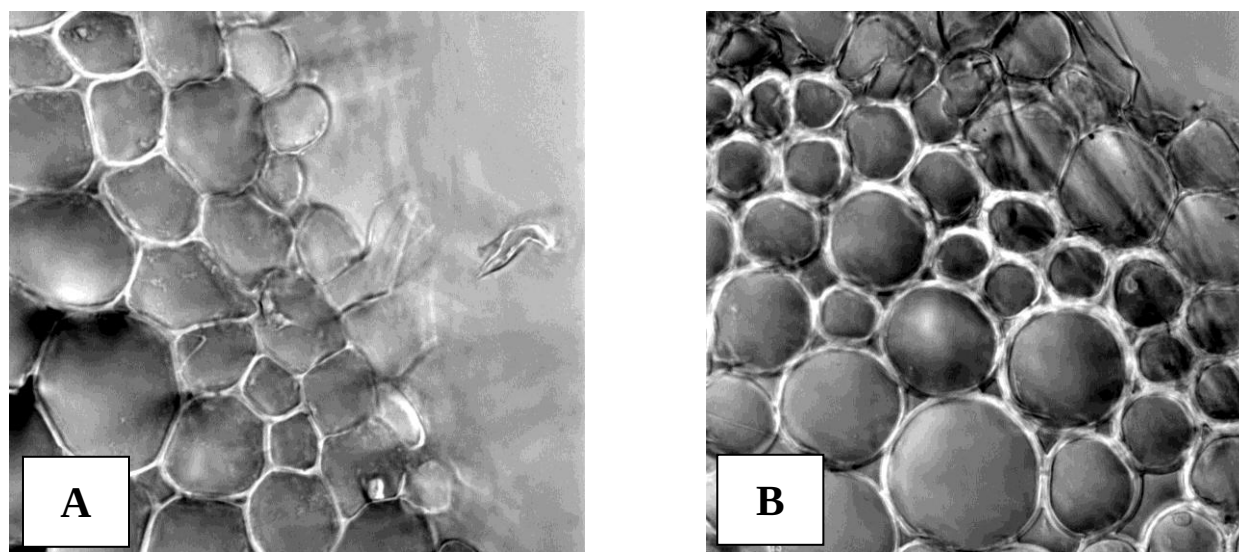


Figure 3-18. Coupes transversales de racine séminale issue d'une culture aéroponique, et d'une longueur totale de 55 cm ; coupes réalisées à 5 cm (A) et 50 cm (B) de l'apex. Observation de l'exoderme à l'objectif 100 à immersion en lumière blanche.

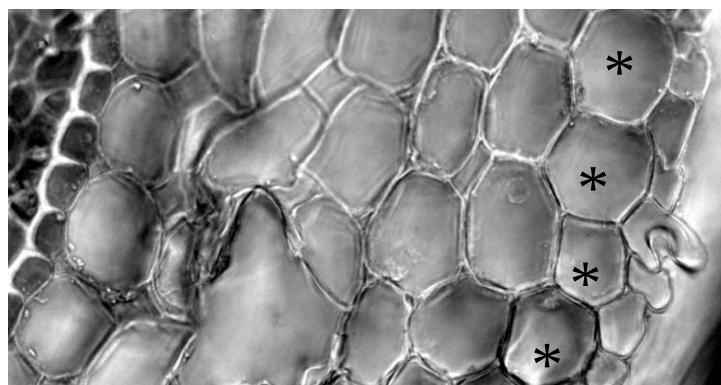


Figure 3-19. Coupe transversale de racine secondaire issue d'une culture aéroponique. Observation à l'objectif 100 à immersion en lumière blanche. Les cellules de l'hypoderme sont signalées par des astérisques.

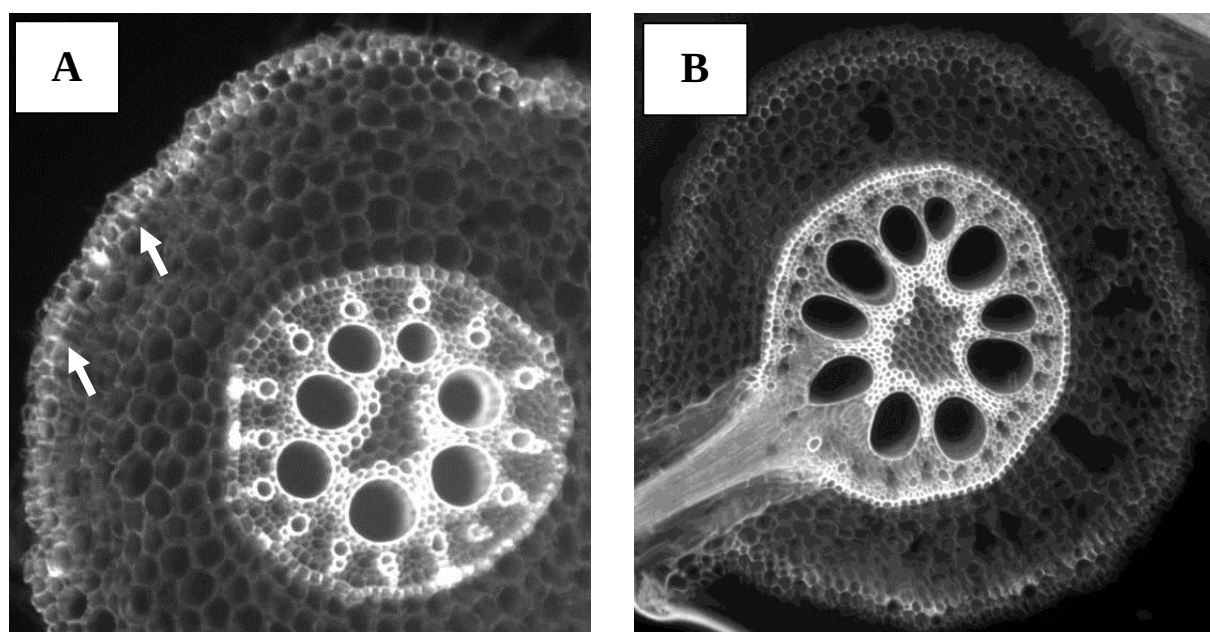


Figure 3-20. Coupes transversales de racines séminales cultivées en sol (A) et en hydroponie (B), d'une longueur totale de 30 cm et de 40 cm respectivement. Les coupes sont réalisées à des distances respectives de 10 cm et 30 cm. Les bandes de Caspary fluorescent sous la lumière UV et sont signalées par les flèches.

En coupe transversale, la coloration des bandes de Caspary (par la berbérine hémisulphate) se caractérise par une fluorescence des parois radiales au niveau de l'endoderme et de l'exoderme (Figure 3-20). Quant aux lamelles de subérine, elles forment un anneau de fluorescence autour des cellules endodermiales et/ou exodermiales après coloration au jaune Fluorol (Figure 3-21).

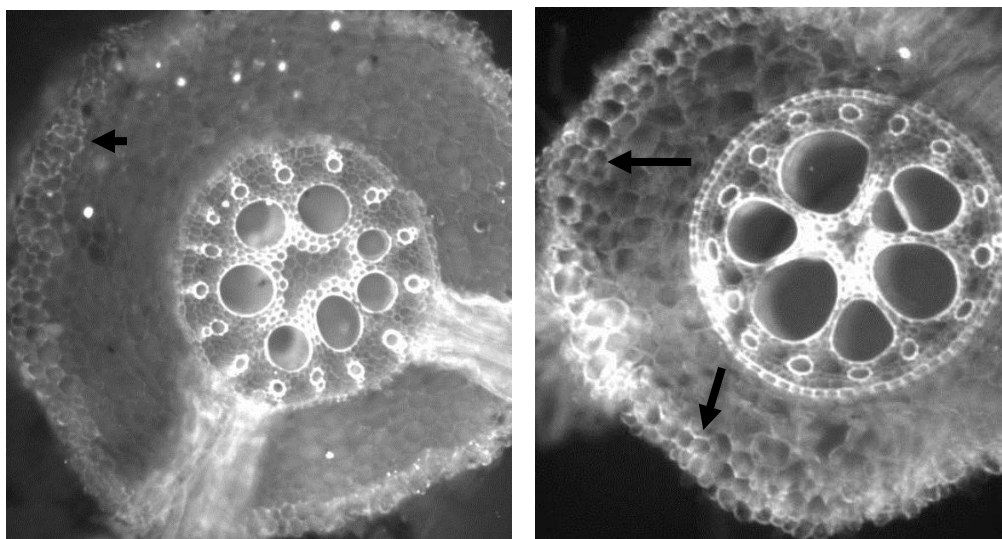


Figure 3-21. Coupes transversales de racines séminales cultivées en sol (à gauche) et en aéroponie (à droite), d'une longueur totale de 30 cm et 40 cm respectivement. Les coupes sont réalisées à des distances respectives de 10 cm et 25 cm de l'apex. Les lamelles de subérine fluorescent sous les UV et sont signalées par des flèches.

Les racines cultivées en sol et en aéroponie présentent un endoderme et un exoderme matures sur plus de 90 % de la longueur racinaire. Dans les racines cultivées en hydroponie, 50 à 100 % de la longueur de la racine séminale ne présentent même pas de bandes de Caspary, dans l'endoderme comme dans l'exoderme (Figure 3-20).

III. Discussion

III.1. Poils absorbants et prélèvement racinaire de Cd

De nombreux chercheurs ont remarqué que la culture en aéroponie assure aux plantes une meilleure croissance et un meilleur développement des poils absorbants. Aujourd'hui, on pense que la spécialisation des cellules épidermiques en poils absorbants est une réaction à la pression partielle en O₂ dans l'environnement (Zobel *et al.*, 1976 dans (Kratsch *et al.*, 2006) ou encore à la privation d'eau (Durbin, 1971, dans (da Silva *et al.*, 2003). En effet, les racines aéroponiques sont suspendues dans de l'air humide tandis que les racines en hydroponie sont totalement immergées dans la solution aqueuse. L'absence ou quasi-absence de poils absorbants en hydroponie a été étudiée sur des plantules de sorgho (Yang *et al.*, 2004). D'après cette étude, c'est le mouvement de l'eau qui inhiberait le développement des poils

absorbants en réduisant la concentration locale d'éthylène à la surface racinaire. Etant donné que le Cd s'adsorberait aux poils absorbants des racines (Nedelkoska et Doran, 2000; Bovet *et al.*, 2006), il serait logique de supposer que les racines issues de l'aéroponie et du sol épuisent la solution cadmiée plus efficacement que celles issues de l'hydroponie. Pourtant, nos expérimentations vont dans un sens opposé, avec une absorption plus efficace du métal par les racines issues de l'hydroponie. Par conséquent, si les poils adsorbants sont effectivement un haut lieu d'adsorption du métal, celle-ci est très largement compensée par d'autres voies d'adsorption ou d'absorption dans les racines cultivées en hydroponie.

III.2. L'architecture, les apex racinaires et l'absorption de Cd

La vitesse d'absorption des cations par les cellules racinaires est influencée par la distance qui sépare ces cellules de l'apex racinaire. En effet, les cations seraient préférentiellement absorbés dans les zones jeunes des racines, présentant des barrières apoplasmiques immatures. C'est ce qui a été montré avec le Ca et les racines de marronnier (Harrison-Murray et Clarkson, 1973), mais aussi avec le Cd et les racines de blé et de *Noccaea caerulea* (Pineros *et al.*, 1998; Boominathan et Doran, 2003). En outre, il a également été montré que la présence de patches de métaux dans le sol provoque une ramification considérable des racines de *Noccaea caerulea*, suggérant que les apex sont précisément le siège de l'absorption racinaire des métaux. Toutes ces études suggèrent que la proportion de surface racinaire dépourvue de bandes de Caspary par rapport à la surface racinaire totale est un facteur influençant la vitesse d'absorption du métal. Or notre analyse architecturale montre clairement que les racines cultivées en hydroponie ne sont pas plus ramifiées que celles cultivées en aéroponie ou en sol. Par conséquent, la plus grande surface accessible des racines hydroponiques n'est pas due à une plus grande densité d'apex. D'où l'hypothèse d'une maturation plus tardive des barrières apoplasmiques, c'est-à-dire plus éloignée de l'extrémité racinaire. C'est ce qui nous a été confirmé par nos observations anatomiques : les proportions de racines séminales dépourvues de bandes de Caspary ou de lamelles de subérine sont nettement plus importantes en hydroponie qu'en aéroponie et en sol.

III.3. Fractionnement du Cd et structure anatomique des racines

En ce qui concerne les racines cultivées en sol, la fraction apoplasmique particulièrement élevée est certainement due aux fines particules de sol fortement accrochées aux poils absorbants et que nous n'avons pas réussi à éliminer des racines. Cette fraction serait entrée

en compétition avec l'adsorption du métal sur les parois des cellules racinaires, d'où la très faible fraction de Cd apoplasmique non désorbé (seulement 5 %, comparé à 40 et 37 % pour les racines cultivées en hydroponie et en aéroponie respectivement).

Toutes nos cinétiques d'épuisement mettent en évidence la plus grande vitesse d'absorption des racines hydroponiques par rapport aux racines aéroponiques. D'ailleurs, les quantités de Cd accumulées au moment du fractionnement sont significativement plus importantes dans les racines issues de l'hydroponie que dans celles issues de l'aéroponie, tant au niveau apoplasmique qu'au niveau symplasmique. Certes, ce résultat n'est pas vérifié lors du fractionnement suivant la première cinétique, mais cela s'explique par l'épuisement prématuré de la solution par les racines hydroponiques, entraînant une diminution de leur prélèvement de Cd tandis que les racines aéroponiques continuent de prélever de fortes quantités de métal. L'épuisement plus rapide du Cd par les racines issues de l'hydroponie que par celles issues de l'aéroponie concorde avec de nombreux travaux montrant que la conductivité hydraulique et osmotique des racines de maïs cultivées en aéroponie est réduite de 50 à 75 % par rapport aux racines cultivées en hydroponie (Zimmermann et Steudle, 1998; Freundl *et al.*, 2000; Zimmermann *et al.*, 2000; Hose *et al.*, 2001). D'autre part, l'absorption de sorbitol par des segments racinaires de maïs excisés (les 100 mm apicaux) provenant de l'aéroponie est quatre fois plus lente que chez des racines cultivées en hydroponie (Hose, 2000). D'après ces auteurs, cette différence de prélèvement est due à un volume (ou une surface) apoplasmique accessible plus faible en aéroponie qu'en hydroponie. Ce volume correspond à l'espace auquel le métal de la solution peut accéder librement, sans que sa diffusion passive ne rencontre d'obstacle majeur. Selon la littérature, ce volume apoplasmique accessible est sensiblement réduit par la maturation de l'hypoderme en exoderme en aéroponie mais pas en hydroponie. En effet, en présence d'un exoderme mature, la surface apoplasmique disponible pour le prélèvement de Cd est considérablement réduite, puisqu'elle est alors restreinte à l'épiderme (Kamula *et al.*, 1994) : lorsque l'exoderme est subérifié, le flux apoplasmique de l'épiderme vers le cortex est ralenti par les propriétés hydrophobes de la subérine comme c'est le cas dans l'endoderme. Il a d'ailleurs été démontré, par autoradiographie, que l'exoderme bloque la voie apoplasmique du Rb^+ (Gierth *et al.*, 1999). Enfin, la composition qualitative de la subérine ne variant pas d'un type de culture à l'autre, nos résultats suggèrent bien que la réduction de l'absorption du Cd n'est pas due à une subérine plus imperméable, mais à une proportion plus élevée de surface racinaire mature.

Quelle que soit la culture adoptée, la fraction apoplasmique représente une part importante du Cd accumulé par les racines, puisqu'elle avoisine les 50 % du Cd total prélevé. C'est un résultat qui confirme ceux du chapitre 1 de la Partie 2, malgré la durée du prélèvement et l'épuisement de la solution au cours des cinétiques de prélèvement (nous avons démontré en partie 2 que la fraction apoplasmique diminue à mesure que la concentration en solution diminue). Nos travaux ne contredisent donc pas la littérature qui fait état du transport préférentiel du Cd dans la voie apoplasmique plutôt que dans la voie symplasmique (Seregin et Kozhevnikova, 2008). En effet, la capacité des parois à adsorber le Cd protège les racines de ses effets délétères en réduisant son entrée dans le cytosol (voir citations dans Coccozza *et al.*, 2008).

Nous venons de voir que la maturation des cellules exodermales freine sensiblement l'entrée du Cd dans l'espace apoplasmique, en réduisant le volume apoplasmique accessible et par là même la surface membranaire accessible et donc l'accumulation du métal dans les deux compartiments racinaires. De plus, la présence de cet exoderme mature influence également la distribution du Cd dans ces deux compartiments, puisque la part de Cd symplasmique dans les racines hydroponiques (58 %) est supérieure ($p < 0,05$) à celle des racines cultivées en aéroponie (54 %). Cependant, bien que statistiquement très significative, cette différence ne dépasse pas les 10 %, et confirme que les prélèvements symplasmique et apoplasmique sont bel et bien liés : la surface membranaire accessible est d'autant plus faible que le volume apoplasmique accessible est réduit.

III.4. Paramètres cinétiques et choix du mode de culture du matériel végétal

Aucune différence n'est détectée sur le plan architectural entre les racines cultivées en hydroponie, en sol ou bien en aéroponie. Sur le plan anatomique, les racines extraites du sol se rapprochent plus des celles issues de l'aéroponie que de celles issues de l'hydroponie. C'était d'ailleurs supposé par un certain nombre de chercheurs, puisqu'à la différence du milieu hydroponique, le sol contient de nombreux espaces d'air très humide (Schreiber *et al.*, 1999). Parallèlement, la maturation tardive de l'exoderme en hydroponie surestime sensiblement le prélèvement de Cd par des racines cultivées en aéroponie. En effet, au bout d'une heure de prélèvement (durée d'absorption des chapitres 1 et 2 de la Partie 2), les racines issues de l'hydroponie absorbent 2 à 3 fois plus de Cd par unité de masse racinaire, que les racines issues de l'aéroponie. D'après ces résultats, les paramètres cinétiques mesurés à partir

de racines cultivées en hydroponie risquent de surestimer significativement les propriétés de prélèvement des racines cultivées en sol, notamment avec un I_{max} doublé voire triplé.

III.5. Y a-t-il des conséquences sur la translocation vers les parties aériennes ?

Toutes les cellules de l'endoderme développent des bandes de Caspary de façon synchrone, immédiatement après l'élongation cellulaire, et simultanément à la maturation du protoxylème, voire un peu avant (Esau, 1965 ; Peterson and Lefcourt, 1990, dans White, 2001). Ainsi, une étude autoradiographique a montré que le prélèvement (et la translocation) du fer par les racines de blé est nul dans les 35 mm les plus proches de l'apex, bien que ce soit précisément l'apex qui contienne les plus fortes concentrations en fer (Weavind et Hodgson, 1971). De même, ce n'est qu'à 20 mm de l'apex que le Ca^{2+} est transporté dans la stèle des racines d'orge (Robards *et al.*, 1973), et aucun mouvement de Ca^{2+} n'a été détecté à travers le parenchyme des racines d'oignon à moins de 15 mm de l'apex, distance correspondant précisément à l'apparition d'un endoderme mature et d'un proto-métaxylème fonctionnel (Robards *et al.*, 1973; Cholewa et Peterson, 2004). Dans la zone apicale dépourvue de bandes de Caspary, l'apoplasme tiendrait son imperméabilité de la largeur des canaux intermicrofibrillaires, encore trop étroits pour assurer le mouvement des cations (Enstone et Peterson, 1992). L'accumulation apparente du cation dans les apex est souvent interprétée comme une absorption préférentielle au niveau de l'apex (Harris et Taylor, 2004), alors qu'il ne s'agirait que d'une simple accumulation sans mouvement possible vers la stèle. D'ailleurs, ce sont précisément les cellules apicales qui présentent la plus forte CECR (Mane *et al.*, 1970) en raison de leur jeunesse, ce qui explique fort bien l'accumulation du Cd dans les apex. D'après l'ensemble de ces arguments, un transfert totalement apoplasmique de la solution du sol vers les vaisseaux matures de la stèle est fort peu probable. En effet, les bandes de Caspary, composées de lignine et de subérine, sont attachées aux membranes plasmiques et redirigent ainsi les cations vers un transport symplasmique (Hose *et al.*, 2001). Pourtant, il a été observé par analyse EDX que le Na^+ de la solution parvenait rapidement aux vaisseaux matures et vivants du xylème, avant même d'avoir été détecté dans les vacuoles du cortex (Frensch *et al.*, 1992). D'autre part, Ranathunge *et al.* (2005) ont montré que les barrières apoplasmiques ne sont pas entièrement imperméables aux cations. S'il existe une voie apoplasmique pure de la solution externe vers des vaisseaux fonctionnels de la stèle, elle est certainement freinée par le caractère hydrophobe des bandes de Caspary, et sûrement réduite à néant en présence des lamelles de subérine.

D'après la littérature citée ci-dessus, la quasi-totalité du métal transloqué passerait nécessairement par la voie symplasmique avant d'atteindre les cellules lignifiées et subérifiées de l'endoderme. En l'absence de barrière exodermique mature, le métal pourrait parcourir une voie apoplasmique plus ou moins longue et intégrer la voie symplasmique au niveau de n'importe quelle couche cellulaire du cortex avant de traverser l'endoderme. Dans ce cas, c'est l'ensemble des parois du tissu cortical qui joue un rôle d'accumulation du métal. En revanche, en présence d'un exoderme mature, le métal aurait plutôt tendance à s'accumuler dans les cellules épidermiques et exodermiques, et à entrer très tôt dans la voie symplasmique, au sein des cellules de l'épiderme ou de l'exoderme encore dépourvu de lamelles de subérine.

Dans les racines cultivées en hydroponie, où les bandes de Caspary se forment à des distances relativement éloignées de l'apex, le métal diffuse librement dans l'apoplasme, y compris dans les parois primaires de l'endoderme encore dépourvues de lignine et de subérine. Cependant, d'après ce que la littérature rapporte, le Cd prélevé dans cette zone (zone d'élongation) ne pourra pas être transloqué vers les parties aériennes faute de xylème fonctionnel ; il restera donc accumulé dans l'apex.

Je ne comprends pas bien où va la discussion dans le III-5 en quoi elle explique tes résultats ou est en contradiction avec eux. Il me semble nécessaire de clarifier, de résumé à la fin...

IV. Conclusion

Les paramètres cinétiques mesurés sur des racines cultivées en hydroponie risquent de surestimer les capacités de prélèvement des racines cultivées en sol en raison de la maturation tardive des barrières apoplasmiques. Il faudrait les mesurer sur des racines cultivées en aéroponie et les comparer avec ceux du chapitre 2 de la Partie 2.

L'aéroponie pourrait remplacer l'hydroponie pour l'étude des caractéristiques d'absorption des éléments par les plantes : plus proche des conditions de sol, elle permet d'obtenir des racines plus représentatives de la culture en sol.

Il serait intéressant de réaliser des cultures à concentration constante en Cd, en hydroponie et en aéroponie, pour étudier non plus le rôle des barrières apoplasmiques dans l'absorption racinaire, mais leur rôle dans le transport du métal vers les vaisseaux de la stèle pour sa translocation vers les parties aériennes.

Conclusion générale

Rappelons nos hypothèses et objectifs de départ.

Concernant les deux plantes, nous soupçonnions une description erronée de la fonction d'absorption. Or pour parvenir à une meilleure simulation du prélèvement du Cd, il est indispensable de déterminer de façon rigoureuse les paramètres cinétiques de la fonction d'absorption, car la valeur du prélèvement simulé en dépend fortement (Perriguet, 2006). C'est pourquoi nous avons décrit les cinétiques d'influx net racinaire de Cd chez le maïs et le tabouret calaminaire, en distinguant l'absorption symplasmique de la sorption apoplasmique après 60 minutes d'exposition au métal à concentration constante. Le fractionnement a été réalisé par deux méthodes de séparation des compartiments apoplasmique et symplasmique, la première avec un mélange de méthanol-chloroforme dissolvant les membranes plasmiques, et la deuxième détruisant les cellules par une immersion des racines dans de l'azote liquide. D'une part, nous avons confirmé un résultat de la littérature, à savoir la pertinence de la fonction michaélienne pour décrire mathématiquement l'isotherme d'influx symplasmique. D'autre part, nous avons également mis en évidence, dans la même isotherme d'absorption symplasmique, une seconde composante, linéaire non négligeable face pour les concentrations externes supérieures à 1 μM . Ces deux fonctions prouvent pour la première fois dans le cas du Cd, l'implication de deux systèmes de transport différents, le premier étant caractérisé par une forte affinité pour le Cd (HATS), et le deuxième par une faible affinité pour le métal (LATS). Le transport à forte affinité correspond à un passage membranaire du Cd à travers des transporteurs tandis que le transport à faible affinité pourrait faire intervenir des transporteurs à moindre affinité pour le Cd ainsi que des canaux à cations. L'étude sur les compétitions ioniques a en outre confirmé cette interprétation puisque le HATS s'avère peu sensible aux cations divalents susceptibles d'inhiber le prélèvement du Cd, alors que le LATS est significativement affecté par la présence de ces ions en solution. En effet, le prélèvement racinaire du Cd n'est pas réduit aux basses concentrations où prédomine le HATS, alors qu'il l'est en présence de certains cations divalents (notamment le Pb...) dans la gamme de concentrations où prédomine le LATS.

Le prélèvement simulé par le modèle RUSE à partir des paramètres cinétiques de l'absorption membranaire (influx maximum I_{max} , affinité K_m du HATS et pente a du LATS) surestime d'un

facteur 2 le prélèvement mesuré chez le maïs, tandis qu'il sous-estime d'un facteur 3 le prélèvement mesuré chez le tabouret calaminaire.

La fraction racinaire apoplasmique de Cd a pu être quantifiée à l'issue des 60 minutes d'exposition. Nous avons essayé d'estimer la quantité totale de Cd dans le pool apoplasmique à l'issue de la culture ; elle ne représente pas une part importante du total de Cd prélevé. Pourtant, le rôle des parois racinaires dans le prélèvement racinaire est primordial car il s'agit du milieu environnant le plus proche des membranes plasmiques. C'est pourquoi il serait plus juste de formaliser différemment la composante apoplasmique. Les parois cellulaires des racines ne devraient pas être seulement considérées comme un compartiment d'accumulation du métal, mais avant tout comme un compartiment dont la CEC contrôle au moins en partie la concentration du métal au voisinage des membranes plasmiques. Il faudrait dans un premier temps connaître les concentrations dans l'apoplasme à l'équilibre en fonction des concentrations externes, et pouvoir estimer les concentrations de Cd que détectent les protéines de transport membranaire. Les parois accumuleraient le Cd jusqu'à ce que l'équilibre physico-chimique s'installe entre la solution du sol et le matériel apoplasmique. Cet équilibre, ainsi que les éventuelles molécules exsudées par les racines, entraîneraient, dans le voisinage des membranes racinaires, une concentration de Cd plus ou moins élevée que celle dans la solution du sol, selon la plante considérée.

L'affinité de la surface racinaire et des membranes plasmiques pour le Cd s'avère similaire pour les trois plantes, suggérant que la nature des sites d'adsorption et des protéines de transport membranaire sont les mêmes chez tous les végétaux supérieurs, et que l'hyperaccumulation résulterait davantage d'une plus forte densité de ces sites et de ces protéines de transport membranaires. Aussi, l'influx maximal reste dans le même ordre de grandeur chez les trois plantes, suggérant que l'hyperaccumulation est certainement très liée à la translocation, comme le confirme des résultats d'exposition chronique.

Les nouveaux paramètres cinétiques obtenus au cours de cette thèse n'ont pas significativement amélioré le modèle. Concernant le maïs en particulier, qui présente un exoderme, nous suspectons un biais significatif de la culture hydroponique sur les paramètres cinétiques d'absorption racinaire. Nous avons vérifié en effet qu'en comparaison avec des racines cultivées en sol ou en aéroponie, l'hydroponie retarde la formation des barrières apoplasmiques, entraînant notamment une plus forte proportion racinaire dépourvue d'exoderme mature. Il en résulte en hydroponie une surestimation de la surface apoplasmique et membranaire accessible pour le métal, et par conséquent une surestimation des paramètres

des cinétiques d'absorption symplasmique et apoplasmique. Nous avons donc conclu qu'il est plus judicieux de travailler sur des plantes cultivées en aéroponie, de manière à obtenir des plantes cultivables plus longtemps hors-sol, et dont les caractéristiques structurales sont plus proches de celles que l'on trouve en sol. Le tabouret calaminaire n'est pas concerné par cette question puisqu'il ne présente pas d'exoderme. Cependant, les cultures de tabouret calaminaire en aéroponie ont été un succès comme c'était le cas pour le maïs, avec une croissance plus rapide et plus saine grâce non seulement à l'excellente oxygénation de leurs systèmes racinaires, mais également à l'absence de stress mécanique dû au bullage de la solution en hydroponie.

D'autre part, les paramètres cinétiques étant mesurés sur des plantes n'ayant pas connu de Cd au cours de la culture, nous avons cherché à savoir si des mécanismes de régulation pouvaient amener à réduire ou au contraire à stimuler l'adsorption du métal sur les parois et son absorption à travers les membranes. Nos résultats suggèrent l'existence d'un seuil de teneur interne en Cd, au-delà duquel ont lieu des mécanismes de régulation du prélèvement racinaire du Cd. Ces mécanismes résultent dans une augmentation de l'adsorption apoplasmique et une diminution de l'entrée du métal dans le milieu intracellulaire.

Cependant, nous avons montré que cette régulation est négligeable pour des sols modérément contaminés.

Il est indispensable de s'intéresser aux concentrations de Cd non plus dans la solution du sol, mais précisément dans le voisinage très proche des racines ; en effet, les processus rhizosphériques créent certainement des conditions d'exposition du Cd aux membranes qui nous sont encore inconnues.

Aussi, les mécanismes de régulation du prélèvement racinaire de Cd par le Cd endogène méritent plus d'attention. Des cultures sur un long terme sont nécessaires pour comprendre l'évolution du prélèvement de métal en fonction du statut interne de la plante en Cd. A cette occasion, il faudrait commencer à travailler à l'échelle de la plante entière, pour essayer de décrire, de formaliser la translocation du métal des racines vers les feuilles en fonction de facteurs liés à la plante, au sol et au climat.

Annexe

Cette annexe correspond à la validation de la deuxième méthode de fractionnement du Cd racinaire (Partie 2 chapitre 2).

Etant donné que nous faisons durer la désorption plusieurs heures avant de détruire les cellules, un efflux de Cd symplasmique vers la solution de désorption, de même qu'une réabsorption membranaire du Cd radioactif désorbé des parois, sont envisageables. Les deux expérimentations présentées ci-dessous nous permettent de traiter ces deux hypothèses.

1) Y a-t-il efflux membranaire pendant la désorption, malgré la concentration de la solution de désorption en Ca et en Cd ?

L'expérimentation porte sur six plantes. Trois d'entre elles sont immergées pendant 2 minutes dans l'azote liquide, puis décongelées et agitées dans plusieurs bains d'eau distillée. En revanche, les trois autres sont laissées intactes. Les deux lots de systèmes racinaires sont ensuite exposés au Cd pendant une heure, dans les mêmes conditions expérimentales que celles décrites dans le chapitre 1 de la Partie 2. Les systèmes racinaires sont ensuite transférés dans une dizaine de bains désorbants successifs. Les cinétiques de désorption sont comparées entre les deux lots de plantes, *via* des prélèvements de 20 ml dans chaque bain de désorption. Les deux lots de racines présentent des cinétiques de désorption d'allures identiques (Figure 1), fort bien ajustées par le modèle du pseudo-second ordre. q_e , qui représente la quantité de métal désorbée à l'équilibre pour une efficacité de désorption de 100 % (Singh *et al.*, 2008), nous donne une estimation du Cd échangeable. Il est quatre fois plus élevé chez les racines détruites (Tableau A-1), certainement en raison de leur plus grande surface d'adsorption par unité de masse racinaire. Néanmoins, il s'avère que 85 % de ce Cd désorbable est libéré en 30 minutes de désorption, et ce indépendamment du traitement de congélation/décongélation des racines. Cette similitude de comportement des racines avec et sans symplasme vis-à-vis de la désorption du Cd, prouve que les racines intactes ne libèrent que du métal apoplasmique au cours de la désorption, et qu'il n'y a pas d'efflux membranaire significatif. Quant à la différence de constante de vitesse de désorption (k_2), trois fois plus élevée dans le cas des racines intactes (Tableau A-1), elle est probablement due à la moindre quantité de métal adsorbée (quatre fois moins). En effet, la surface apoplasmique exposée au Cd par unité de masse racinaire est très certainement bien plus élevée après destruction des cellules par l'azote liquide.

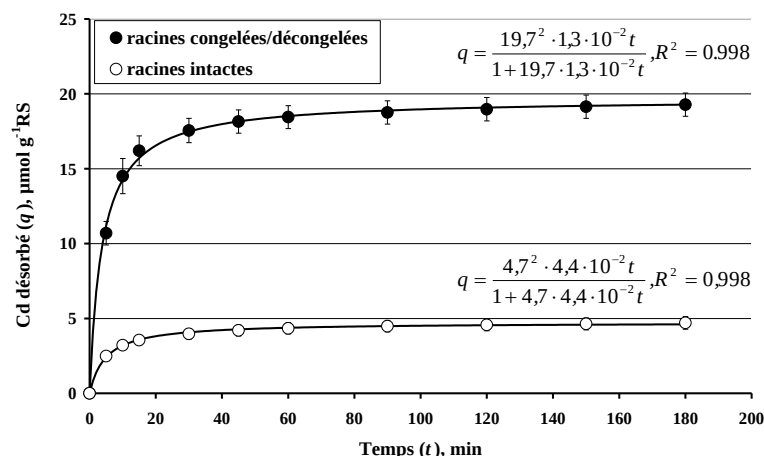


Figure A-1. Quantité de Cd désorbée des racines de Zm, après une heure d'absorption dans une solution contenant $50 \mu\text{mol L}^{-1} \text{CdCl}_2$.

Tableau A-1. Paramètres cinétiques du modèle du pseudo-second ordre, ajusté sur les courbes de désorption de la Figure 1

	racines congelées / décongelées	racines intactes
q_e ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{RS}$)	19,7	4,7
k_2 ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{RS min}^{-1}$)	$1,3 \cdot 10^{-2}$	$4,4 \cdot 10^{-2}$
R^2	0,998	0,998

2) Y a-t-il réabsorption du Cd radioactif désorbé des parois, malgré la température glacée du bain-marie ?

Après une heure d'absorption en présence de $0,1 \mu\text{mol L}^{-1} \text{CdCl}_2$ non radioactif, les systèmes racinaires sont séparés des parties aériennes, rincés brièvement dans de l'eau distillée et immergés dans quatre bains successifs de solution désorbante glacée, marquée au ^{109}Cd et ne contenant que du Ca 5 mmol L^{-1} (pas de Cd). Puis les systèmes racinaires subissent

l'ensemble du protocole de fractionnement (partie 2 chapitre 2), et le Cd de chacun de ces bains de désorption est dosé *via* des aliquotes de 20 ml.

La température des bains désorbants, maintenue entre 0 et 2°C, réduit très sensiblement les interactions avec les groupes réactifs de l'apoplasme, et empêche le fonctionnement des enzymes, dont les transporteurs membranaires font partie. Mais elle ne stoppe pas totalement l'absorption ; ainsi par exemple, les canaux calciques continueraient de fonctionner même à 1°C. Or le Cd est précisément susceptible d'emprunter cette voie membranaire.

Dans cette expérimentation, le ^{109}Cd introduit dans les premiers bains désorbants précédant le protocole de fractionnement, permet de simuler la présence de ^{109}Cd désorbé des parois après une absorption en solution marquée. D'après le fractionnement réalisé, sur la totalité du Cd radioactif introduit dans les bains désorbants précédant le protocole de fractionnement, seulement 2 % se retrouvent dans le matériel racinaire (parois comprises), et seuls 4 % de ces 2 % sont détectés dans le milieu intracellulaire. Par conséquent, la réabsorption du Cd radioactif échangé lors de la désorption de 3 h est négligeable. Par conséquent, moins de 1% du ^{109}Cd originaire de la solution désorbante est susceptible d'être absorbé dans le symplasme au cours de trois heures de désorption. En outre, cette réabsorption pourrait même être encore plus négligeable que cela, puisque la solution désorbante utilisée pour dessiner les isothermes de prélèvement contiennent 2 mM de Cd stable et non seulement les 5 mM de Ca comme c'est le cas dans cette expérimentation de validation.

3) Conclusion sur la validité du protocole

Cette deuxième méthode de fractionnement permet de distinguer et de quantifier précisément prélèvements de Cd par les deux compartiments racinaires. En effet, les deux expérimentations tests permettent de valider le protocole : d'une part, le fractionnement n'est pas significativement biaisé par un éventuel efflux symplasmique (Figure A-2 2) au cours de la désorption apoplasmique, et d'autre part, le ^{109}Cd désorbé des parois racinaires ne peut pas être prélevé à nouveau et traverser les membranes plasmiques durant la cinétique de désorption (Figure A-2 2).

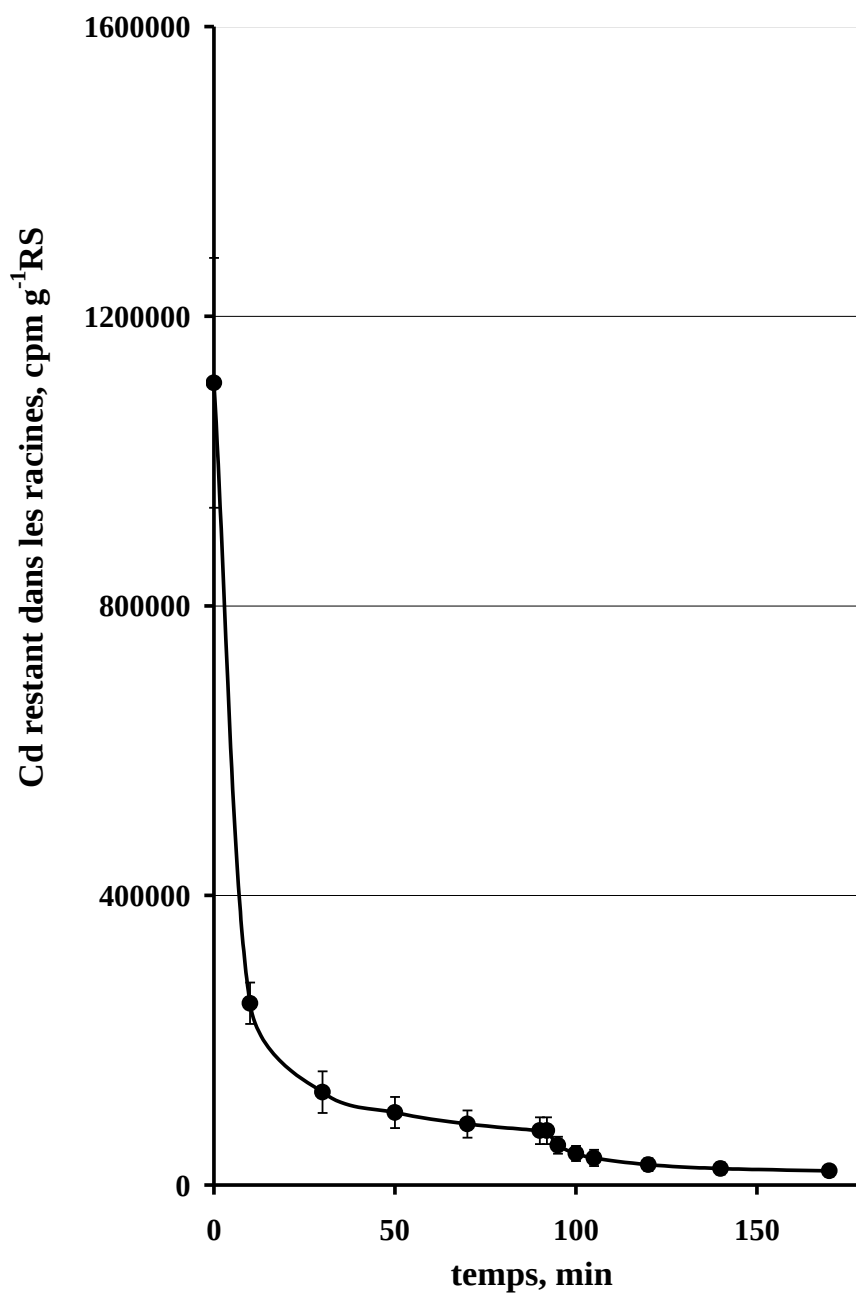


Figure A-2. Cd restant dans les racines pendant le processus de fractionnement, après une heure d'absorption dans une solution non marquée puis 3 h de désorption à 2°C dans une solution également marquée.

Références bibliographiques

- ALLOWAY, B.J. (1995). Heavy metals in soils. Blackie Academic & Professional, Glasgow, U. K.
- ARAVIND, P. et PRASAD, M.N.V. (2005). Cadmium-induced toxicity reversal by zinc in *Ceratophyllum demersum* L. (a free floating aquatic macrophyte) together with exogenous supplements of amino- and organic acids. *Chemosphere*, **61**, p 1720-1733.
- BAKER, A.J.M. (1981). Accumulators and excluders -strategies in the response of plants to heavy metals, vol. 3, pp. 643 - 654. Taylor & Francis.
- BARBER, S.A. et CUSHMAN, J.H. (1981). Nitrogen uptake model for agronomic crops. In Modeling waste water renovation-land treatment (ed. Iskandar, J. K.), J. Wiley Inter-Science, New York. pp. 382-409.
- BASIC, N. et BESNARD, G. (2006). Gene polymorphisms for elucidating the genetic structure of the heavy-metal hyperaccumulating trait in *Thlaspi caerulescens* and their cross-genera amplification in Brassicaceae. *Journal of Plant Research*, **119**, p 479-487.
- BASIC, N., KELLER, C., FONTANILLAS, P., VITTOZ, P., BESNARD, G. et GALLAND, N. (2006). Cadmium hyperaccumulation and reproductive traits in natural *Thlaspi caerulescens* populations. *Plant Biology*, p 64-72.
- BELIMOV, A.A., HONTZEAS, N., SAFRONOVA, V.I., DEMCHINSKAYA, S.V., PILUZZA, G., BULLITTA, S. et GLICK, B.R. (2005). Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology and Biochemistry*, **37**, p 241-250.
- BENAVIDES, M.P., GALLEGO, S.M. et TOMARO, M.L. (2005). Cadmium toxicity in plants, vol. 17, pp. 21-34. scielo.
- BERT, V., MACNAIR, M.R., DE LAGUERIE, P., SAUMITOU-LAPRADE, P. et PETIT, D. (2000). Zinc tolerance and accumulation in metallicolous and nonmetallicolous populations of *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *New Phytologist*, **146**, p 225-233.
- BERT, V., BONNIN, I., SAUMITOU-LAPRADE, P., DE LAGUERIE, P. et PETIT, D. (2002). Do *Arabidopsis halleri* from nonmetallicolous populations accumulate zinc and cadmium more effectively than those from metallicolous populations? *New Phytologist*, **155**, p 47-57.
- BLAUDEZ, D., BOTTON, B. et CHALOT, M. (2000). Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Microbiology*, **146**, p 1109-1117.
- 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**, p 131-146.

- BOVET, L., KAMMER, P.M., MEYLAN-BETTEX, M., GUADAGNUOLO, R. et MATERA, V. (2006). Cadmium accumulation capacities of *Arabis alpina* under environmental conditions. *Environmental and Experimental Botany*, **57**, p 80-88.
- BROOKS, R. (1998). Plants that hyperaccumulate heavy metals. Wallingford: CAB International., pp. 384.
- BROOKS, R.R., LEE, J., REEVES, R.D. et JAFFRE, T. (1977). Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. *Journal of Geochemical Exploration*, **7**, p 49-57.
- BRUNDRETT, M., KENDRICK, B. et PETERSON, C. (1991). Efficient lipid staining in plant material with Sudan red 7B or Fluorol yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic and Histochemistry* **66**, p 111-116.
- Règlement (CE) N°466/2001 de la Commission du 8 mars 2001 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires. L77/1-L77/12
- CALLAHAN, D., BAKER, A., KOLEV, S. et WEDD, A. (2006). Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **11**, p 2-12.
- CARPITA, N., SABULARSE, D., MONTEZINOS, D. et DELMER, D.P. (1979). Determination of the Pore Size of Cell Walls of Living Plant Cells. *Science*, **205**, p 1144-1147.
- CATALDO, D.A., GARLAND, T.R. et WILDUNG, R.E. (1983). Cadmium uptake kinetics in intact soybean plants. *Plant Physiology*, **73**, p 844-848.
- CHAN, D.Y. et HALE, B.A. (2004). Differential accumulation of Cd in durum wheat cultivars: uptake and retranslocation as sources of variation. *Journal of Experimental Botany*, **55**, p 2571-2579.
- CHANEY, R.L. et HORNICK, S.B. (1978). Accumulation and Effects of Cadmium on Crops. *Proc.1st Intl. Cadmium Conf., San Francisco. Metals Bull. Ltd., London, England*. Colloque. éd. 125
- 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. (2000). Improving metal hyperaccumulator wild plants to develop commercial phytoextraction systems: Approaches and progress. In *Phytoremediation of contaminated soil and water* (ed. Terry et Bañuelos), CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 131-160.
- CHEN, W., LI, L., CHANG, A.C., WU, L., KWON, S.-I. et BOTTOMS, R. (2008). Modeling uptake kinetics of cadmium by field-grown lettuce. *Environmental Pollution*, **152**, p 147-152.
- CHOLEWA, E. (2000). Calcium transport and delivery to the xylem in onion (*Allium cepa* L.) roots. In *PhD thesis.*, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada.
- CHOLEWA, E. et PETERSON, C.A. (2004). Evidence for symplastic involvement in the radial movement of calcium in onion roots. *Plant Physiology*, **134**, p 1793-1802.

- CLARKSON, D. et LÜTTGE, U. (1989). Mineral nutrition: divalent cations, transport and compartmentation. *Progress in Botany*, **51**, p 93-112.
- COCOZZA, C., MINNOCCI, A., TOGNETTI, R., IORI, V., ZACCHINI, M. et SCARASCIA MUGNOZZA, G. (2008). Distribution and concentration of cadmium in root tissue of *Populus alba* determined by scanning electron microscopy and energy-dispersive x-ray microanalysis, vol. 1, pp. 96-103.
- COHEN, C.K., FOX, T.C., GARVIN, D.F. et KOCHIAN, L.V. (1998). The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiology*, **116**, p 1063-1072.
- COSTA, G. et MOREL, J.L. (1993). Cadmium uptake by *Lupinus albus* (L.): Cadmium excretion, a possible mechanism of cadmium tolerance. *Journal of Plant Nutrition*, **16**, p 1921-1929.
- CUI, Y., ZHANG, X. et ZHU, Y. (2008). Does copper reduce cadmium uptake by different rice genotypes? *Journal of Environmental Sciences*, **20**, p 332-338.
- DA SILVA, S., DE CASTRO, E.M. et SOEARES, A.M. (2003). Effects of different water regimes on the anatomical characteristics of roots of grasses promising for revegetation of areas surrounding hydroelectric reservoirs *Ciência e Agrotecnologia* **27**, p 393-397.
- DELRASO, N.J., FOY, B.D., GEARHART, J.M. et FRAZIER, J.M. (2003). Cadmium Uptake Kinetics in Rat Hepatocytes: Correction for Albumin Binding. *Toxicological Sciences*, **72**, p 19-30.
- DENG, D.M., SHU, W.S., ZHANG, J., ZOU, H.L., LIN, Z., YE, Z.H. et WONG, M.H. (2007). Zinc and cadmium accumulation and tolerance in populations of *Sedum alfredii*. *Environmental Pollution*, **147**, p 381-386.
- DiTOMASO, J.M., HART, J.J. et KOCHIAN, L.V. (1992). Transport Kinetics and Metabolism of Exogenously Applied Putrescine in Roots of Intact Maize Seedlings. *Plant Physiology*, **98**, p 611-620.
- DUNBAR, K.R., McLAUGHLIN, M.J. et REID, R.J. (2003). The uptake and partitioning of cadmium in two cultivars of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Experimental Botany*, **54**, p 349-354.
- ENDO, T. (2002). Transport of cadmium across the apical membrane of epithelial cell lines. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **131**, p 223-229.
- ENSTONE, D., PETERSON, C. et MA, F. (2003). Root Endodermis and Exodermis: Structure, Function, and Responses to the Environment. *Journal of Plant Growth Regulation*, **21**, p 335-351.
- ENSTONE, D.E. et PETERSON, C.A. (1992). The apoplastic permeability of root apices. *Canadian Journal of Botany*, **70**, p 1502-1512.

- FLORIJN, P.J. et VAN BEUSICHEM, M.L. (1993). Uptake and distribution of cadmium in maize inbred lines. *Plant and Soil*, **150**, p 25-32.
- FOULKES, E.C. (2000). Transport of toxic heavy metals across cell membranes. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, **223**, p 234-240.
- FRENSCH, J., STELZER, R. et STEUDLE, E. (1992). NaCl Uptake in Roots of *Zea mays* Seedlings: Comparison of Root Pressure Probe and EDX Data. *Annals of Botany*, **70**, p 543-550.
- FREUNDL, E., STEUDLE, E. et HARTUNG, W. (2000). Apoplastic transport of abscisic acid through roots of maize: effect of the exodermis. *Planta*, **210**, p 222-231.
- GIERTH, M., STELZER, R. et LEHMANN, H. (1999). An analytical microscopical study on the role of the exodermis in apoplastic Rb⁺(K⁺) transport in barley roots. *Plant and Soil*, **207**, p 209-218.
- GRILL, E., WINNACKER, E.L. et ZENK, M.H. (1987). Phytochelatins, a class of heavy metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, p 439-443.
- HACISALIHOGU, G., HART, J.J. et KOCHIAN, L.V. (2001). High- and low-affinity zinc transport systems and their possible role in zinc efficiency in bread wheat. *Plant Physiology*, **125**, p 456-463.
- HAN, F., SHAN, X., ZHANG, S., WEN, B. et OWENS, G. (2006). Enhanced cadmium accumulation in maize roots - the impact of organic acids. *Plant and Soil*, **289**, p 355-368.
- HARRIS, N. et TAYLOR, G. (2004). Cadmium uptake and translocation in seedlings of near isogenic lines of durum wheat that differ in grain cadmium accumulation. *BMC Plant Biology*, **4**, p 4.
- HARRISON-MURRAY, R.S. et CLARKSON, D.T. (1973). Relationship between structural development and the absorption of ions system of *Cucurbita pepo*. *Planta*, **114**, p 1-16.
- HART, J.J., NORVELL, W.A., WELCH, R.M., SULLIVAN, L.A. et KOCHIAN, L.V. (1998). Characterization of Zinc Uptake, Binding, and Translocation in Intact Seedlings of Bread and Durum Wheat Cultivars. *Plant Physiology*, **118**, p 219-226.
- HE, Z., LI, J., ZHANG, H. et MA, M. (2005). Different effects of calcium and lanthanum on the expression of phytochelatin synthase gene and cadmium absorption in *Lactuca sativa*. *Plant Science*, **168**, p 309-318.
- HINKLE, P.M., KINSELLA, P.A. et OSTERHOUDT, K.C. (1987). Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels. *Journal of Biological Chemistry*, **262**, p 16333-16337.
- HO, Y.S. (1995). Adsorption of Heavy Metals from Waste Streams by Peat. In *Thèse de doctorat*, University of Birmingham, Birmingham, U.K..

- HO, Y.S. et MCKAY, G. (2000). The kinetics of sorption of divalent metal ions onto sphagnum moss peat. *Water Research*, **34**, p 735-742.
- HOMMA, Y. et HIRATA, H. (1984). Kinetics of cadmium and zinc absorption by rice seedling roots. *Soil Science and Plant Nutrition*, **30**, p 527-532.
- HOOGLAND, J.C., FEDDES, R.A. et BELMANS, C. (1981). Root water uptake model depending on soil water pressure head and maximum extraction rate. *Acta Horticulture*, 119, 123-136.
- HOPKINS, W. (2003). Physiologie végétale. Ed. DE BOECK UNIVERSITE
- HOSE, E. (2000). Untersuchungen zum radialen Abscisinsäure- und Wassertransport in Wurzeln von *Helianthus annuus* L. und *Zea mays* L. In *Thèse de doctorat*, Würzburg.
- HOSE, E., CLARKSON, D.T., STEUDLE, E., SCHREIBER, L. et HARTUNG, W. (2001). The exodermis: a variable apoplastic barrier. *Journal of Experimental Botany*, **52**, p 2245-2264.
- INABA, T., KOBAYASHI, E., SUWAZONO, Y., UETANI, M., OISHI, M., NAKAGAWA, H. et NOGAWA, K. (2005). Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai-itai disease *Toxicology Letters* () **159**, p 192-201.
- KAMULA, S.A., PETERSON, C.A. et MAYFIELD, C.I. (1994). The plasmalemma surface area exposed to the soil solution is markedly reduced by maturation of the exodermis and death of the epidermis in onion roots. *Plant, cell and Environment*, **17**, p 1183-1193.
- KASCHL, A., ROMHELD, V. et CHEN, Y. (2002). Cadmium Binding by Fractions of Dissolved Organic Matter and Humic Substances from Municipal Solid Waste Compost. *Journal of Environmental Quality*, **31**, p 1885-1892.
- KRATSCH, H.A., GRAVES, W.R. et GLADON, R.J. (2006). Aeroponic system for control of root-zone atmosphere. *Environmental and Experimental Botany*, **55**, p 70-76.
- LARSSON, E.H., ASP, H. et BORNMAN, J.F. (2002). Influence of prior Cd²⁺ exposure on the uptake of Cd²⁺ and other elements in the phytochelatin-deficient mutant, *cad1-3*, of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, **53**, p 447-453.
- LASAT, M.M., BAKER, A.J.M. et KOCHIAN, L.V. (1996). Physiological characterisation of root Zn²⁺ absorption and translocation to shoots in Zn hyperaccumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*. *Plant Physiology*, **112**, p 1715-1722.
- LASAT, M.M. (2000). Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. *Journal of Hazardous Substance Research*, **2**, p 5/1-5/25.
- LECOEUR, S., HUYNH-DELERME, C., BLAIS, A., DUCHÉ, A., TOMÉ, D. et KOLF-CLAUW, M. (2002). Implication of distinct proteins in cadmium uptake and transport by intestinal cells HT-29. *Cell Biology and Toxicology*, **18**, p 409-423.

- LINDBERG, S., LANDBERG, T. et GREGER, M. (2004). A new method to detect cadmium uptake in protoplasts. *Planta*, **219**, p 526-532.
- LINDBERG, S., LANDBERG, T. et GREGER, M. (2007). Cadmium uptake and interaction with phytochelatins in wheat protoplasts. *Plant Physiology and Biochemistry*, **45**, p 47-53.
- LIU, C.P., SHEN, Z.G. et LI, X.D. (2007). Accumulation and detoxification of cadmium in *Brassica pekinensis* and *B. chinensis*. *Biologia Plantarum*, **V51**, p 116-120.
- LOMBI, E., ZHAO, F.J., DUNHAM, A.R. et MCGRATH, S.P. (2001). Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils: Natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. *Journal of Environmental Quality*, **30**, p 1919-1926.
- LOMBI, E., TEARALL, K.L., HOWARTH, J.R., ZHAO, F.-J., HAWKESFORD, M.J. et MCGRATH, S.P. (2002). Influence of iron status on cadmium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology*, **128**, p 1359-1367.
- LOZANO-RODRIGUEZ, E., HERNANDEZ, L.E., BONAY, P. et CARPENA-RUIZ, R.O. (1997). Distribution of cadmium in shoot and root tissues of maize and pea plants : physiological disturbances
Journal of experimental botany, **48**, p 123-128.
- LU, L.-L., TIAN, S.-K., YANG, X.-E., WANG, X.-C., BROWN, P., LI, T.-Q. et HE, Z.-L. (2008). Enhanced root-to-shoot translocation of cadmium in the hyperaccumulating ecotype of *Sedum alfredii*. *Journal of Experimental Botany*, **59**, p 3203-3213.
- LUX, A., LUXOVA, M., ABE, J. et MORITA, S. (2004). Root cortex: structural and functional variability and responses to environmental stress. *Root Research*, **13**, p 117-131.
- LUX, A., MORITA, S., ABE, J. et ITO, K. (2005). An Improved Method for Clearing and Staining Free-hand Sections and Whole-mount Samples. *Annals of Botany*, **96**, p 989-996.
- MANE, V.B., SAVANT, N.K. et SHINGTE, A.K. (1970). Relationship between cation exchange capacity of roots and mineral composition of plant tops influences by age. *Plant and Soil*, **33**, p 113-119.
- MARSCHNER, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants, second édition. Academic Press, London, UK, pp. 889.
- MCGRATH, S.P., ZHAO, F.J. et LOMBI, E. (2001). Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soils. *Plant and soil*, **232**, p 207-214.
- MCGRATH, S.P., ZHAO, F.J. et LOMBI, E. (2002). Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. *Advances in Agronomy*, **75**, p 1-56.
- MCGRATH, S.P., LOMBI, E., GRAY, C.W., CAILLE, N., DUNHAM, S.J. et ZHAO, F.J. (2006). Field evaluation of Cd and Zn phytoextraction potential by the hyperaccumulators *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri*. *Environmental Pollution*, **141**, p 115-125.

- MCLAUGHLIN, M.J. et SINGH, B.R. (1999). Cadmium in Soils and Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 271.
- MENCH, M., MOREL, J.L. et GUCKERT, A. (1985). Liaison du cadmium avec la fraction macromoléculaire soluble des exsudats racinaires de maïs (*Zea mays* L.). *Compte-rendus de l'Académie des Sciences*, **t. 301, Série III**, p 379-382.
- MENCH, M. et MARTIN, E. (1991). Mobilization of cadmium and other metals from two soils by root exudates of *Zea mays* L., *Nicotiana tabacum* L. and *Nicotiana rustica* L. *Plant and Soil*, **132**, p 187-196.
- MEUWLY, P., THIBAUT, P., SCHWAN, A. et RAUSER, W. (1995). Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize. *Plant journal*, **7**, p 391-400.
- 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**, p 29-34.
- MULLINS, G.L. et SOMMERS, L.E. (1986). Cadmium and zinc influx characteristics by intact corn (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant and Soil*, **96**, p 153-164.
- NAGAHASHI, G., THOMPSON, W. et LEONARD, R. (1974). The Casparian strip as a barrier to the movement of lanthanum in corn roots. *Science*, **183**, p 670_671.
- NEDELKOSKA, T.V. et DORAN, P.M. (2000). Hyperaccumulation of cadmium by hairy roots of *Thlaspi caerulescens*. *Biotechnology and Bioengineering*, **67**, p 607-615.
- NRIAGU, J.O. et PACYNA, J.M. (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333, **6169**, p 134-139.
- NYE, P.H. et MARRIOTT, F.H.C. (1969). A theoretical study of the distribution of substances around roots resulting from simultaneous diffusion and mass flow. *Plant and soil*, **30**, p 459-473.
- PEREZ, M. (2007). Environnement : les eaux polluées par les médicaments. Le Figaro. 26 juillet 2007
- PEREZ, N., SANCHEZ, M., RINCON, G. et DELGADO, L. (2007). Study of the behavior of metal adsorption in acid solutions on lignin using a comparison of different adsorption isotherms. *Latin american applied research*, **37**, p 157-162.
- PERFUS-BARBECH, L., LEONHARDT, N., VAVASSEUR, A. et FORESTIER, C. (2002). Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *The Plant Journal*, **32**, p 539-548.
- PERRIGUEY, J., STERCKEMAN, T. et MOREL, J.L. (2005). Does Cd absorption kinetics by maize exhibit a saturable component? *8th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements (ICOBTE)*. Colloque Adelaide, Australia. éd.

- PERRIGUEY, J. (2006). Modélisation du prélèvement de cadmium par le maïs (*Zea mays* L.) et le tabouret calaminaire (*Thlaspi caerulescens* J & C Presl.). Thèse, Institut National Polytechnique de Lorraine, pp. 224.
- PETERSON, R.L. et FARQUHAR, M.L. (1996). Root hairs: specialized tubular cells extending root surfaces. . *The Botanical Review*, **62**, p 1-40.
- PINEROS, M.A., SHAFF, J.E. et KOCHIAN, L.V. (1998). Development, characterization, and application of a cadmium-selective microelectrode for the measurement of cadmium fluxes in roots of *Thlaspi* species and wheat. *Plant Physiology*, **116**, p 1393-1401.
- RANATHUNGE, K., STEUDLE, E. et LAFITTE, R. (2005). A new precipitation technique provides evidence for the permeability of Casparian bands to ions in young roots of corn (*Zea mays* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *Plant, Cell and Environment*, **28**, p 1450-1462.
- RAUSER, W.E. (1995). Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiology*, **109**, p 1141-1149.
- REDJALA, T. (2005). Mesure des paramètres cinétiques de l'absorption racinaire du cadmium par trois populations de *Thlaspi caerulescens*. Rapport de DEA, Institut National Polytechnique de Lorraine, pp. 32.
- 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**, p 145-172.
- REID, R. et LIU, J. (2004). Measurement of trace metal influx in plants: a case study with Co. *Functional Plant Biology*, **31**, p 941-947.
- ROBARDS, A.W., JACKSON, S.M., CLARKSON, D.T. et SANDERSON, J. (1973). The structure of barley roots in relation to the transport of ions into the stele. *Protoplasma*, **77**, p 291-311.
- SALT, D.E. et WAGNER, G.J. (1993). Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiport activity. *The Journal of Biological Chemistry*, **268**, p 12297-12302.
- SATTELMACHER, B. (2001). The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytologist*, **149**, p 167-192.
- SCHMITT-SIRGUEY, C. (2004). Dynamique du Cd disponible du sol sous l'influence de l'hyperaccumulateur *Thlaspi caerulescens*. Doctorat Thèse, Institut National Polytechnique de Lorraine, pp. 137.
- SCHREIBER, L., HARTMANN, K., SKRABS, M. et ZEIER, J. (1999). Review article. Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *Journal of Experimental Botany*, **50**, p 1267-1280.
- SCHREIBER, L., FRANKE, R., HARTMANN, K.-D., RANATHUNGE, K. et STEUDLE, E. (2005). The chemical composition of suberin in apoplastic barriers affects radial hydraulic

conductivity differently in the roots of rice (*Oryza sativa* L. cv. IR64) and corn (*Zea mays* L. cv. Helix). *Journal of Experimental Botany*, **56**, p 1427-1436.

SCHUTZENDUBEL, A. et POLLE, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, **53**, p 1351-1365.

SCHWARTZ, C. (1997). Phytoextraction des métaux des sols pollués par la plante hyperaccumulatrice *Thlaspi caerulescens*. Thèse, Institut National Polytechnique de Lorraine, pp. 175.

SCHWARTZ, C., MOREL, J.L., SAUMIER, S., WHITING, S.N. et BAKER, A.J.M. (1999). Root development of the Zinc-hyperaccumulator plant *Thlaspi caerulescens* as affected by metal origin, content and localization in soil. *Plant and Soil*, **208**, p 103-115.

SEREGIN, I. et KOZHEVNIKOVA, A. (2008). Roles of root and shoot tissues in transport and accumulation of cadmium, lead, nickel, and strontium. *Russian Journal of Plant Physiology*, **55**, p 1-22.

SINGH, A., KUMAR, D. et GAUR, J.P. (2008). Removal of Cu(II) and Pb(II) by *Pithophora oedogonia*: Sorption, desorption and repeated use of the biomass. *Journal of Hazardous Materials*, **152**, p 1011-1019.

STRUGGER, S. et PEVELING, E. (1961). Die electronenmikroskopische Analyse der extrafaszikularen Komponente der Transpirationsstromes mit Hilfe von Edelmetallsuspensoiden adäquater Dispersität. *Ber Dtsch Bot Ges*, **74**, p 300-304.

TINKER, P.B. et NYE, P.H. (2000). Solute movement in the rhizosphere. Oxford University Press, Oxford, pp. 444.

VAN DER LEE, J. (1998). Thermodynamic and mathematical concepts of CHESS. Technical Report, Ecole des Mines de Paris. Fontainebleau, pp. 99.

VASSILEV, A., VANGRONSVELD, J. et YORDANOV, I. (2002). Cadmium phytoextraction: present state, biological backgrounds and research needs. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, **28**, p 68-95.

VOGEL-MIKUS, K., DROBNE, D. et REGVAR, M. (2005). Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonisation of pennycress *Thlaspi praecox* Wulf. (Brassicaceae) from the vicinity of a lead mine and smelter in Slovenia. *Environmental Pollution*, **133**, p 233-242.

VOGELI-LANGE, R. et WAGNER, G.J. (1990). Subcellular Localization of Cadmium and Cadmium-Binding Peptides in Tobacco Leaves : Implication of a Transport Function for Cadmium-Binding Peptides. *Plant Physiology*, **92**, p 1086-1093.

WAGNER, G. et KROTZ, P. (1989). Perspectives on Cd and Zn accumulation, accommodation and tolerance in plant cells: the role of Cd-binding peptide versus other mechanisms. In *Metal Ion Homeostasis: Molecular Biology and Chemistry*. (ed. Hamer, D. et Winge, D.), Alan R. Liss, New York. pp. 325-336.

- WANG, A., ANGLE, J., CHANEY, R., DELORME, T. et REEVES, R. (2006). Soil pH Effects on Uptake of Cd and Zn by *Thlaspi caerulescens*. *Plant and soil*, **281**, p 325-337.
- WEAVIND, T. et HODGSON, J. (1971). Iron absorption by wheat roots as a function of distance from the root tip. *Plant and Soil*, **34**, p 697-705.
- WELCH, R.M. (1995). Micronutrient nutrition of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **14**, p 49-82.
- WELCH, R.M. et NORVELL, W.A. (1999). Mechanisms of cadmium uptake, translocation and deposition in plants. In Cadmium in soils and plants (ed. McLaughlin, M. J. et Singh, B. R.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 125-150.
- WHITE, P.J. (2001). The pathways of calcium movement to the xylem. *Journal of Experimental Botany*, **358**, p 892-899.
- WOJCIK, M., VANGRONSVELD, J., D'HAEN, J. et TUKIENDORF, A. (2005). Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens*: II. Localization of cadmium in *Thlaspi caerulescens*. *Environmental and Experimental Botany*, **53**, p 163-171.
- YANAI, J., ZHAO, F.-J., MCGRATH, S.P. et KOSAKI, T. (2006). Effect of soil characteristics on Cd uptake by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Environmental Pollution*, **139**, p 167-175.
- YANG, X., OWENS, T.G., SCHEFFLER, B.E. et WESTON, L.A. (2004). Manipulation of Root Hair Development and Sorgoleone Production in Sorghum Seedlings. *Journal of Chemical Ecology*, **30**, p 199-213.
- ZHAO, F.-J., HAMON, R.E., LOMBI, E., MCLAUGHLIN, M.J. et MCGRATH, S.P. (2002). Characteristics of cadmium uptake in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany*, **53**, p 535-543.
- ZIMMERMANN, H.M. et STEUDLE, E. (1998). Apoplastic transport across young maize roots: effect of the exodermis. *Planta*, **206**, p 7-19.
- ZIMMERMANN, H.M., HARTMANN, K., SCHREIBER, L. et STEUDLE, E. (2000). Chemical composition of apoplastic transport barriers in relation to radial hydraulic conductivity of corn roots (*Zea mays* L.). *Planta*, **210**, p 302-311.

Liste des figures

Partie 1

Figure 1-1. Conceptualisation de la réponse des plantes poussant dans des concentrations croissantes en métal (Baker, 1981).....8

Figure 1-2. Coupe transversale de racine principale de maïs cultivé en hydroponie 11

Figure 1-3. Illustration du premier stade de maturation de l'endoderme, avec l'apparition de cadres ou « bandes » de Caspary dans les parois radiales des cellules endodermes (<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectf03am/casparian.htm>) 12

Figure 1-4. Schématisation des voies apoplasmique et symplasmique pouvant assurer le transport d'un cation de la solution du sol jusqu'aux vaisseaux de la stèle (Taiz et Zeiger., 2010).....15

Figure 1-5. Illustration des transports membranaires passif et actif (<http://alenaimp.blogspot.fr/2012/03/diffusion-active-transport-and-osmosis.html>) 20

Figure 1-6. Illustration des trois types de transport membranaire actif : uniport, symport et antiport.....20

Figure 1-7. Illustration de l'isotherme d'absorption michaëlienne 25

Figure 1-8. Isotherme d'absorption illustrant les deux types de cinétique d'absorption membranaire des cations. La cinétique linéaire traduit généralement un mécanisme de diffusion simple, tandis que la cinétique michaëlienne met en évidence l'implication de transporteurs.....25

Figure 1-9. Isotherme d'absorption racinaire du Cd, après 1 heure d'exposition au métal et 15 minutes de désorption (Lu *et al.*, 2008). L'isotherme est arbitrairement interprétée comme la somme d'une composante linéaire apoplasmique et d'une composante michaëlienne symplasmique.....26

Partie 2

Figure 2-1. Schématisation du protocole de fractionnement du Cd racinaire pour l'obtention des isothermes d'absorption symplasmique et apoplasmique.....39

Figure 2-2. Distribution du Cd dans les compartiments racinaires, après une heure l'absorption dans $0,25 \mu\text{mol L}^{-1}$, $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ et $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ 40

Figure 2-3. Isothermes d'adsorption apoplasmique, après 1 heure d'adsorption à concentration constante (n=6 pour Nc-H et Nc-L ; n=4 pour Zm).	41
Figure 2-4. Isotherme d'absorption du Cd apoplasmique resté sorbé sur les parois à la fin du fractionnement.....	43
Figure 2-5. Pourcentage de Cd apoplasmique non échangé par rapport au Cd apoplasmique total.....	43
Figure 2-6. Isothermes d'absorption du Cd dans le symplasme racinaire (n = 4 pour Zm ; n = 6 pour Nc-H et Nc-L, après une heure d'exposition dans 650 ml de solution contenant 0,5 mM CaCl ₂ , 2 mM MES et une concentration de CdCl ₂ variant de 0,05 à 50 µM.....	45
Figure 2-7. Décomposition de l'isotherme d'absorption symplasmique de Zm, Nc-H et Nc-L en composantes saturante et linéaire.	46
Figure 2-8. Isotherme de prélèvement racinaire total de Cd.....	47
Figure 2-9. Cinétique de désorption du Cd des racines de maïs après une heure d'absorption dans 0,5 µmol.L ⁻¹ de CdCl ₂ , et 5 jours de traitement ; en blanc, 3 jours dans le MC puis 2 jours dans l'eau à T ambiante ; en bleu, 5 jours dans l'eau à 4°C (n = 3).	51
Figure 2-10. (A) Cinétique de désorption du Cd des racines de Zm, après une heure d'absorption dans 0,75 µmol.L ⁻¹ de CdCl ₂ (n = 3). (B) Cinétique de désorption du Cd des racines de Nc-H après une heure d'absorption dans 0,05 µmol.L ⁻¹ de CdCl ₂ (n = 3). (C) Cinétique de désorption du Cd des racines de Nc-L après une heure d'absorption dans des solutions de CdCl ₂ (n=3)	55
Figure 2-11. Cd restant dans les racines de maïs (A) et de tabouret calaminaire (B) au cours du protocole de fractionnement, après une heure d'exposition à 650 ml de solution contenant 0,5 mM CaCl ₂ , 2 mM MES et une concentration de CdCl ₂ variant de 0,05 à 50 µM. Les racines subissent une série de bains de désorptions successifs, interrompue par une étape de congélation/décongélation, à t = 90 min pour le maïs, et t = 180 min pour le tabouret calaminaire. Les symboles représentent les valeurs moyennes de quatre et cinq répétitions pour le maïs et le tabouret calaminaire respectivement.....	59
Figure 2-12. Cd restant dans le système racinaire d'un plant de maïs au cours du protocole de fractionnement, après une heure d'absorption dans 650 ml de solution contenant 0,5 mM CaCl ₂ , 2 mM MES et 5 mM CdCl ₂ . Le système racinaire subit une série de désorptions successives, interrompue par une étape de congélation de 2 min (t ₉₀ à t ₉₂)......	61
Figure 2-13. (a) Cd restant dans le système racinaire d'un plant de maïs au cours du protocole de fractionnement, après une heure d'absorption dans 650 ml de solution contenant 0,5 mM CaCl ₂ , 2 mM MES et 5 mM CdCl ₂ ; le système racinaire subit une série de désorptions	

successives interrompue par une étape de congélation de 2 minutes. (b) Obtention des symboles blancs : Q_{ex130} provient de l'extrapolation des points précédant la congélation, et les points suivants sont issus d'une translation de la hauteur $Q_{ex90}-Q_{130}$ 61

Figure 2-14. (A) Cd restant dans le système racinaire après suppression de la phase 2 (voir figure précédente) ; (B) Cd désorbé des racines, après suppression de la phase 2.....62

Figure 2-15. Distribution du Cd dans les compartiments racinaires apoplasmique et symplasmique de Zm (a) et Nc-H (b), en fonction de la concentration en solution. 64

Figure 2-16. Isotherme d'adsorption du Cd sur les parois racinaires de Zm et de Nc-H, après une heure d'exposition à du Cd à concentrations constantes.....65

Figure 2-17. Représentation logarithmique de l'isotherme d'absorption symplasmique du Cd par le maïs, après une heure d'exposition à 650 ml de solution contenant 0,5 mM CaCl_2 , 2 mM MES et une concentration de CdCl_2 variant de 0,05 à 50 μM (A). Décomposition de l'isotherme d'influx symplasmique du maïs en deux composantes michaéliennes (B). Décomposition de l'isotherme d'influx symplasmique du maïs en une composante michaélienne et une composante linéaire (C). 68

Figure 2-18. Représentation logarithmique de l'isotherme d'absorption symplasmique du Cd par le tabouret calaminaire, après une heure d'exposition dans 650 ml de solution contenant 0,5 mM CaCl_2 , 2 mM MES et une concentration de CdCl_2 variant de 0,05 à 50 μM (A). Décomposition de l'isotherme d'influx symplasmique du tabouret calaminaire en une composante michaélienne et une composante linéaire (B).....69

Figure 2-19. Isotherme d'absorption du tabouret calaminaire après 30 minutes de désorption, avec isolation de la composante symplasmique selon la méthode de la littérature (A) ; isothermes d'absorption symplasmique du tabouret calaminaire d'après la méthode de la littérature (symboles blancs) et la méthode mise au point dans ce chapitre (symboles noirs) (B).....75

Figure 2-20. Isotherme d'absorption du maïs après 30 minutes de désorption, avec isolation de la composante symplasmique selon la méthode de la littérature (A) ; isothermes d'absorption symplasmique du maïs d'après la méthode de la littérature (symboles blancs) et la méthode mise au point dans ce chapitre (symboles noirs) (B).....76

Figure 2-21. Relation entre les prélèvements de Cd simulés par le modèle RUSE et mesurés dans le cas du maïs ; les paramètres cinétiques sont issus des méthodes de fractionnement au méthanol-chloroforme (A) et à l'azote liquide (B). 80

Figure 2-22. Relation entre les prélèvements de Cd simulés par le modèle RUSE et mesurés dans les plantes de tabouret calaminaire ; les paramètres cinétiques sont issus des méthodes de fractionnement au méthanol-chloroforme (A) et à l'azote liquide (B).....81

Partie 3

Figure 3-1. Prélèvement du Cd par les racines en 60 minutes d'exposition à 1 μM CdCl_2 , en présence de concentrations croissantes de CaCl_2 . Les barres noires représentent le Cd échangé en 30 minutes, et les barres blanches le Cd restant dans les racines. 87

Figure 3-2. Prélèvement du Cd par les racines en 60 minutes d'exposition à 1 μM CdCl_2 , à trois pH différents. Les barres noires représentent le Cd échangé en 30 minutes, les barres blanches le Cd restant dans les racines. 88

Figure 3-3. Prélèvement du Cd dans l'apoplasme racinaire, selon les différents ions ajoutés en solution, en fonction du témoin. L'absorption dure une heure, dans 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd et en présence de 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de l'ion testé. $n = 4$ 90

Figure 3-4. Prélèvement du Cd dans le symplasme racinaire, selon les différents ions ajoutés en solution, en fonction du témoin. L'absorption dure une heure, dans 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd et en présence de 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de l'ion testé. $n = 4$ 90

Figure 3-5. Prélèvement du Cd dans l'apoplasme racinaire, selon les différents ions ajoutés en solution, en fonction du témoin. L'absorption dure une heure, dans 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd et en présence de 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de l'ion testé. $n = 4$ 91

Figure 3-6. Prélèvement du Cd dans le symplasme racinaire, selon les différents ions ajoutés en solution, en fonction du témoin. L'absorption dure une heure, dans 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd et en présence de 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de l'ion testé. $n = 4$ 91

Figure 3-7. Masses racinaires sèches à l'issue des cultures en absence ou en présence de Cd 96

Figure 3-8. Teneurs de Cd dans les parties aériennes (PA) et les parties racinaires (PR) du maïs (A) et du tabouret calaminaire (B), à l'issue de 20 jours et 8 semaines de culture respectivement. Le Cd a été intégré à la solution de culture à raison de 0,1 μM et 10 μM , au cours de la deuxième moitié de la culture. 97

Figure 3-9. Cd restant dans les racines de tabouret calaminaire au cours du protocole de fractionnement, après une heure de prélèvement dans 0,1 μM Cd ; la culture hydroponique était contaminée avec 0,1 μM de Cd pendant les quatre dernières semaines de culture. 98

Figure 3-10. Influx symplasmique de Cd après une heure d'exposition à 0,1 μM , 10 μM ou 50 μM CdCl_2 ; les plantes ont été cultivées dans des solutions hydroponiques, selon trois modalités : en absence de Cd, dans 0,1 μM Cd ou dans 10 μM Cd. Les barres représentent les valeurs moyennes de 4 et 5 répétitions pour le maïs (a) et le tabouret calaminaire (b) respectivement, et les barres d'erreur représentent deux écart-types. 100

Figure 3-11. Prélèvement apoplasmique de Cd au cours d'une heure d'exposition à 0,1 μM , 10 μM ou 50 μM de CdCl_2 ; les plantes ont été cultivées dans des solutions hydroponiques, selon trois modalités : en absence de Cd, dans 0,1 μM Cd ou dans 10 μM Cd. Les barres représentent les valeurs moyennes de 4 et 5 répétitions pour le maïs (a) et le tabouret calaminaire (b) respectivement, et les barres d'erreur représentent deux écart-types.	101
Figure 3-12. Culture de maïs en hydroponie (A), aéroponie (B) et sol (C).	108
Figure 3-13. Exposition des plantes au Cd, dans des erlenmeyers de 650 ml de solution contenant 0,5 ou 1 μM CdCl_2 , 0,5 ml CaCl_2 et 2 mM MES (pH = 5,7), après 12 jours de culture en hydroponie, en sol ou en aéroponie.	110
Figure 3-14. Cinétique d'accumulation du Cd (A) dans des systèmes racinaires issus de cultures aéroponique, hydroponique et en sol, dans 650 ml de solution contenant 0,5 μM CdCl_2 , 0,5 mM CaCl_2 et 2 mM MES (pH = 5,7). Compartimentation du Cd (B) dans ces racines à l'issue des 13 heures d'exposition au métal ; le Cd est fractionné par la méthode utilisant le méthanol-chloroforme (Partie 2 Chapitre 1).	112
Figure 3-15. Cinétique d'accumulation du Cd (A) dans des systèmes racinaires issus de cultures aéroponique et hydroponique, dans 650 ml de solution contenant initialement 1 μM CdCl_2 , 0,5 mM CaCl_2 et 2 mM MES (pH = 5,7). Cd restant dans les racines (B) au cours du protocole de fractionnement utilisant l'azote liquide, suite aux 21 heures d'exposition au métal. Compartimentation du Cd racinaire d'après le fractionnement réalisé (C). Part de la fraction symplasmique dans la quantité totale de Cd accumulée dans les racines (D).	114
Figure 3-16. Racines de maïs cultivées en hydroponie (A), aéroponie (B) et sol (C)	114
Figure 3-17. Coupes transversales de racine séminale issue d'une culture aéroponique et d'une longueur totale de 50 cm ; coupes réalisées à 5 cm (A), 20 cm (B) et 30 cm (C) de l'apex racinaire. Observation de l'endoderme à l'objectif 100 à immersion en lumière blanche.	115
Figure 3-18. Coupes transversales de racine séminale issue d'une culture aéroponique, et d'une longueur totale de 55 cm ; coupes réalisées à 5 cm (A) et 50 cm (B) de l'apex. Observation de l'exoderme à l'objectif 100 à immersion en lumière blanche.	115
Figure 3-19. Coupe transversale de racine secondaire issue d'une culture aéroponique. Observation à l'objectif 100 à immersion en lumière blanche. Les cellules de l'hypoderme sont signalées par des astérisques.	116
Figure 3-20. Coupes transversales de racines séminales cultivées en sol (A) et en hydroponie (B), d'une longueur totale de 30 cm et de 40 cm respectivement. Les coupes sont réalisées à des distances respectives de 10 cm et 30 cm. Les bandes de Caspary fluorescent sous la lumière UV et sont signalées par les flèches.	116

Figure 3-21. Coupes transversales de racines séminales cultivées en sol (à gauche) et en aéroponie (à droite), d'une longueur totale de 30 cm et 40 cm respectivement. Les coupes sont réalisées à des distances respectives de 10 cm et 25 cm de l'apex. Les lamelles de subérine fluorescent sous les UV et sont signalées par des flèches. 117

Annexe

Figure A-1. Quantité de Cd désorbée des racines de Zm, après une heure d'absorption dans une solution contenant $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ CdCl_2 127

Figure A-2. Cd restant dans les racines pendant le processus de fractionnement, après une heure d'absorption dans une solution non marquée puis 3 h de désorption à 2°C dans une solution également marquée.....129

Liste des tableaux

Partie 2

Tableau 2-1. Paramètres cinétiques de l'isotherme d'adsorption ; figurent à la fois les ajustements sur le Cd échangé et le Cd apoplasmique total.	41
Tableau 2-2. Paramètres cinétiques de l'isotherme d'influx ; pour Nc-H et Nc-L, figurent à la fois les ajustements Michaelis-Menten (MM) et Michaelis-Menten + linéaire (MM + linéaire)	47
Tableau 2-3. Paramètres cinétiques du modèle du pseudo-second ordre ajusté sur les cinétiques de désorption de la Figure 2-8.	52
Tableau 2-4. Paramètres cinétiques du modèle du pseudo-second ordre ajusté aux cinétiques de désorption pour Nc-L.	53
Tableau 2-5. Pourcentage de Cd apoplasmique dans la fraction considérée comme symplasmique, en estimant que 95 % du Cd échangeable (q_e) ont été désorbés avant le traitement au méthanol-chloroforme	54
Tableau 2-6. Paramètres de Freundlich associés aux isothermes d'adsorption apoplasmique de Zm et Nc-H.	66
Tableau 2-7. Pourcentage de Cd non échangeable par rapport au Cd apoplasmique total (moyennes +/- écart-type).	66
Tableau 2-8. Paramètres cinétiques du prélèvement symplasmique de Cd par les racines de Zm et de Nc-H.....	67
Tableau 2-9. Pourcentage de Cd apoplasmique se trouvant dans les systèmes racinaires après 30 minutes de désorption. Les plantes ont été exposées pendant une heure à 650 ml de solution contenant 0,5 mM CaCl_2 , 2 mM MES et 5 mM CdCl_2	74
Tableau 2-10. Comparaison entre les paramètres cinétiques d'absorption symplasmique mesurés par notre méthode (Partie 2 Chapitre 2) et par la méthode utilisée dans la littérature	74

Annexe

Tableau A-1. Paramètres cinétiques du modèle du pseudo-second ordre, ajusté sur les courbes de désorption de la Figure 1	127
--	-----

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

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Urs FELLER, Professeur, Université de Bern, Suisse

Monsieur Sébastien THOMINE, Chargé de Recherche, Institut des Sciences du Végétal, Gif-sur-Yvette

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

Madame REDJALA Tanegmart

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

**"Etude de l'influence de plusieurs facteurs sur l'absorption racinaire du cadmium, pour
mieux modéliser le transfert sol-plante des éléments en traces métalliques"**

en vue de l'obtention du titre de :

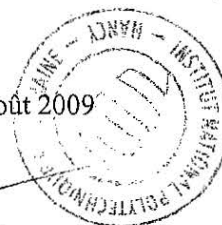
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « Sciences agronomiques »

Fait à Vandoeuvre, le 17 août 2009

Le Président de l'IN.P.L.,

F. LAURENT



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

Etude de l'absorption racinaire du Cd afin d'améliorer la modélisation de son transfert vers les plantes

Cette thèse s'applique à améliorer la compréhension de l'absorption du cadmium (Cd) par le maïs et le tabouret calaminaire, dans l'objectif de mieux modéliser son transfert vers les plantes comestibles ou hyperaccumulatrices. Le modèle utilisé étant sensible aux caractéristiques d'absorption racinaire, le premier objectif était de développer une méthode rigoureuse de mesure de ces paramètres. Deux protocoles ont été mis au point pour décrire précisément, en fonction de la concentration de Cd en solution, l'influx net de Cd dans les deux compartiments racinaires (parois et milieu intracellulaire). Les résultats ont mis en évidence, pour la première fois, l'existence d'un système de transport à faible affinité (LATS) qui agit en même temps que le système de transport à forte affinité pour le Cd (HATS). Les paramètres cinétiques mesurés à travers ces travaux n'ont cependant pas amélioré significativement le modèle : le prélèvement de Cd par le maïs est surestimé de 100%, et son prélèvement par le tabouret calaminaire est sous-estimé de 66% le prélèvement du métal par le tabouret calaminaire. Plusieurs facteurs ont alors été étudiés pour comprendre les raisons de ce décalage. Nous avons montré que les conditions dans lesquelles ont été mesurés les paramètres cinétiques présentaient des caractéristiques capables de modifier radicalement leurs valeurs : la composition ionique de la solution d'exposition au Cd, la concentration de Cd durant la croissance, et la structure racinaire engendrée par la culture en hydroponie. Cette thèse suggère de cultiver les plantes en aéroponie, et de mesurer les paramètres cinétiques dans une composition ionique représentative du voisinage des parois et des membranes racinaires en sol, composition qu'il reste encore à déterminer.

Mots clés : absorption racinaire ; adsorption racinaire ; cadmium ; systèmes de transport membranaire ; interactions ioniques ; régulation ; structure racinaire

Study of cadmium root absorption to improve modelling of cadmium transfer from soil to plant

This thesis aimed to improve the comprehension of cadmium (Cd) absorption by maize and alpine pennycress plants in order to model better its transfer into edible and hyperaccumulating plants. Since the model used is sensitive to the characteristics of root absorption, the first objective was to develop a rigorous method for measuring those parameters. Two protocols were finalized to describe precisely Cd net influx in both root compartments (apoplast and symplast) according to Cd concentration in solution. The results highlighted, for the first time, the existence of a low-affinity transport system (LATS) that works at the same time with the high-affinity transport system (HATS). However, the kinetics parameters measured through these experimentations did not succeed in improving significantly the model: Cd uptake by maize is overestimated by 100%, and Cd uptake by alpine pennycress is under-estimated by 66%. Several factors were investigated in order to understand the reasons of this difference. We showed that the experimental conditions used to measure the kinetics parameters present characteristics that are able to modify their values significantly: the ionic composition of the solution of exposition to Cd, Cd concentration during growth, and the root structure that forms in hydroponics. This thesis suggests to choose aeroponics as controlled culture condition, and to measure the kinetics parameters in an ionic composition that is representative of the close vicinity of the root cell walls and membranes in soil. This composition remains to be investigated.

Key words: root absorption; root adsorption; cadmium; membrane transport systems; ionic interactions regulation; root structure