

PHYTOREMÉDIATION : INFLUENCE DES LIGANDS NATURELS SUR LA MOBILISATION ET L'ACCUMULATION DE MÉTAUX PAR LES PLANTES

CAS DE PLANTS DE BLÉ MODIFIÉS GÉNÉTIQUEMENT

Fabienne Baraud*, Teresa W.-M. Fan**, Richard M. Higashi***

*Equipe de recherche en physico-chimie et biotechnologies - CAEN

**Department of land, air and water resources - Davis, USA

***Center for health and the environment, John Muir Institute of the environment - Davis, USA

La phytoremédiation est un procédé de traitement des sols applicable in situ pour traiter des pollutions métalliques. L'amélioration de ce type de procédé passe par une meilleure compréhension des processus de mobilisation, d'absorption et de séquestration des métaux par les plantes.

La chélation est reconnue comme un phénomène important régulant la solubilité, la biodisponibilité et le stockage interne des métaux.

L'influence de teneurs élevées en métaux sur les profils d'agents chélatants produits par les plantes a été étudiée sur des plants de blés modifiés génétiquement. L'ensemble des résultats suggère de possibles localisations de gènes gouvernant la mobilisation et la séquestration des métaux par ces plantes.

Phytoremediation is a remediation process that can be used to clean up soils contaminated with heavy metals. Three main approaches can be utilized: phytoextraction, phytovolatilization, and phytostabilization, each of them exploiting the natural ability of plants to accumulate or exclude/stabilize elements from soils. To implement this alternative technology, a better understanding of the various processes controlling metal mobilization, uptake and sequestration by plants is needed.

Metal chelation is recognized as an important factor, regulating to a large extent metals solubility and availability to plants. Natural ion chelators (or MIL : Metal Ion Ligand), produced in the tissues or exuded by the roots, are involved in these phenomena, but their exact nature and the various mechanisms have to be precised.

We investigated the influence of elevated metals concentrations on MIL profiles and on metal accumulation in the plant tissues in wheat (*Triticum aestivum* L. CV Chinese Spring) genetically modified by disomic addition of wheatgrass (*Lophopyrum elongatum* L.) chromosomes. Qualitative and quantitative determinations of MIL profiles are realised by GC-MS and RMN 1-D and 2-D. Concentrations of metals in the tis-

sus are obtained by energy dispersive X-ray fluorescence spectroscopy. Correlations between some metals (ie, Fe, Zn, Mn) and some MIL exuded or present in the roots (ie, acétate), depending on the various genotypes, have been observed. The results suggest possible chromosomal location(s) of gene(s) involved in mobilization and/or sequestration of metals.

MATERIELS ET MÉTHODES

Obtention et croissance du matériel végétal

Des additions disomiques de chromosomes de *Lophopyrum elongatum* L. au blé *Triticum aestivum* L. CV. Chinese Spring (procédure décrite par ailleurs^[1]) ont conduit à l'élaboration de différents génotypes désignés comme suit dans le reste de l'étude (neuf génotypes au total) : CS : Chinese Spring non modifié AG : hybride amphiploïde 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 : hybrides d'addition disomique possédant respectivement les chromosomes 1E, 2E... à 7E ajoutés. Après germination (3-4 jours à température ambiante), les pousses sont transplantées dans des récipients de 10 L en polyéthylène sombre (3 génotypes par récipient, 5 graines par génotype) contenant une solution nutritive ("Hoagland's solution", suivant Epstein^[2]). Les plants sont maintenus et aérés en chambre de croissance (Sanyo). Ils subissent des cycles jour/nuit respectivement de 16 h (à 25°C)/8 h (à 19°C) et une humidité constante régulée à 70 %. Le pH de la solution est ajusté quotidiennement à 6. Après 10 jours, un traitement contaminant est imposé à l'ensemble des 9 génotypes, par introduction d'une solution nutritive modifiée, aux teneurs cinq fois plus élevées en Mn, Ni, Cu, Zn et contenant, de plus, 1 mg/L de cadmium. Parallèlement, un autre ensemble de 9 génotypes continue sa croissance sur la solution nutritive non modifiée, servant ainsi de référence ("contrôle"). Au 20^e jour, les plantes sont récoltées. Les racines sont séparées des

feuilles. L'ensemble des tissus est pulvérisé et lyophilisé. Trois jours avant la récolte, les exsudats racinaires sont collectés (procédure décrite par ailleurs^[3]) et lyophilisés. Les poids secs (tissus et exsudats) sont déterminés avant stockage à -70°C.

Analyses

Les teneurs en métaux sont déterminées dans les tissus (feuilles et racines) par spectroscopie de Fluorescence X à Energie Dispersive (ED-XRF, JVAR Inc.) EX3600 spectrometer^[4].

Des analyses qualitatives et quantitatives de composés organiques exsudés ou métabolisés pouvant potentiellement complexer les métaux (LIM) sont réalisées dans les tissus (feuilles et racines) et les exsudats, par chromatographie gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (GC-MS) ainsi que par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN 1D et 2D)^{[3], [5]}. Une analyse des peptides et protéines riches en groupements thiol (ex : phytochélatines, connues comme étant impliquées dans des processus de tolérance au Cd^[6]) est également effectuée sur les tissus racinaires, par une technique d'électrophorèse sur gel polyacrylamide (méthode et résultats présentés par ailleurs^[1]).

RESULTATS ET DISCUSSION

Deux types d'effets peuvent être dégagés à partir de cette étude :

- effet génotypique : par comparaison, pour un type de conditions expérimentales donné (traitement ou contrôle) des résultats pour les différents hybrides, le parent CS étant pris comme référence.

- effet du traitement appliqué (correspondant à l'effet d'une pollution métallique) : par comparaison, pour un génotype donné, des résultats sous "traitement" à ceux sous "contrôle".

Production de biomasse

Sous contrôle, une diminution de la biomasse produite (feuilles et racines), par rapport au parent CS, est observée pour la totalité des hybrides (figure 1). Cette tendance persiste dans les conditions de traitement. Sur la base d'un rapport $E/R = \text{masse Exsudat}/\text{masse Racine}$ (tableau 1), une réduction relative de l'exsudation est notée pour tous les génotypes, comparativement à CS. Elle est plus particulièrement marquée pour 2, 3, 6 et AG. Sous traitement, on note cette fois une augmentation relative de l'exsudation (E/R) pour 2, 3 et AG, laissant supposer une perturbation de l'exsudation liée à l'ajout des chromosomes 2E et 3E.

L'effet traitement se traduit par une réduction de la biomasse produite (feuilles et racines), quel que soit le génotype (figure 1). Cette réduction peut être attribuée

à l'effet toxique du cadmium (déjà observé par ailleurs^[4]), voire à un effet toxique lié aux autres métaux présents en excès. Cette réduction est plus importante au niveau des feuilles pour 1 à 6 et, inversement, plus marquée au niveau des racines pour 7, AG et CS. L'excès de métaux essentiels combiné à la présence de Cd induit en outre une diminution de l'exsudation relative (E/R) pour les génotypes 1, 4, 7 et CS (type d'effet constaté par ailleurs^[4]), mais une augmentation pour 2, 3 et AG (tableau 1), renforçant l'hypothèse d'un effet des chromosomes 2E et 3E sur l'exsudation.

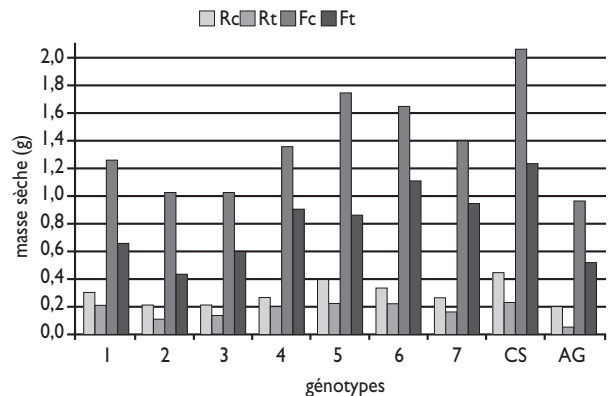


Figure 1 : Biomasse produite : masse sèche des racines (R) et des feuilles (F) : contrôle (c) et traitement (t).

Tableau 1 : Exsudats (E/R) : production relative et variations observées

| | Influence génotype | | Influence traitement | | |
|----|--------------------|------------|--------------------------------|------------|-------|
| | E/R X 1000 | | Variation E/R par rapport à CS | | |
| | Contrôle | Traitement | Contrôle | Traitement | |
| 1 | 15,0 | 11,7 | -9 % | 1 % | -22 % |
| 2 | 9,9 | 16,2 | -40 % | 40 % | 63 % |
| 3 | 9,4 | 15,9 | -43 % | 37 % | 69 % |
| 4 | 18,0 | 11,2 | 9 % | -4 % | -38 % |
| 5 | 13,7 | 11,7 | -17 % | 1 % | -14 % |
| 6 | 10,6 | 10,0 | -36 % | -13 % | -5 % |
| 7 | 17,5 | 12,9 | 6 % | 11 % | -26 % |
| AG | 10,9 | 16,5 | -34 % | 42 % | 52 % |
| CS | 16,5 | 11,6 | - | - | -30 % |

Teneurs métalliques

Influence génotypique

Sous contrôle, dans les racines (figure 2a), le fer est l'élément le plus concentré. Les variations génotypiques sont marquées : comparativement à CS, les teneurs en Fe sont plus élevées de 1 à 4, mais plus faibles pour 5 et 6. Les variations en Mn sont également relativement importantes, une augmentation étant notée principale-

ment pour 2, 3, 4, 7 et AG. Au niveau des feuilles, les variations sont moins marquées (résultats non inclus dans ce document). Mn y est le métal le plus concentré, laissant supposer un transport aisé depuis les racines ("translocation"). Les variations les plus remarquables sont une augmentation importante en Fe (+61 %) pour AG et une diminution (de 30 à 50 %) en Cu de 4 à 7. Sous traitement, dans les racines (figure 2b), les métaux les plus concentrés sont Zn et Cd. On note l'accumulation importante en Cd, comparable pour CS, 1, 2, 5, 6 et 7, moindre pour 4 et plus élevée pour AG. Comparativement à CS, les concentrations en Zn sont plus importantes pour 2, 3 et AG mais moindre pour 1, 4, 6 et 7. Les variations génotypiques en Fe, Mn (voire Ni et Cu) observées sont globalement du même type que sous contrôle. Dans les feuilles, le métal le plus concentré est Zn. Les variations les plus notables, en Fe, Ni et Cu, restent du même type que sous contrôle.

Effet du traitement

Il se traduit par une très forte accumulation des métaux (excepté pour Mn (figure 2)) aux niveaux des racines, quelque soit le génotype. Les variations les plus marquées sont observées pour Zn (concentrations 6 à 11 fois plus fortes) et pour Cu (3 à 9 fois). Dans les feuilles l'accumulation s'observe de façon moins systématique, et reste moins marquée que dans les racines. On y note par ailleurs une réduction en Mn (probablement liée à la moindre absorption constatée au niveau des racines) pour tous les génotypes, ainsi qu'en Cu (excepté pour 5 et 6) laissant supposer un phénomène de séquestration important pour ce dernier au niveau des racines. Les teneurs en Zn et Ni y sont plus fortes, surtout pour 2 et 5 en Zn et 3 en Ni, tandis que Fe augmente uniquement pour 1, 2, 3 et AG.

Profils des LIM dans les tissus et exsudats

L'analyse du profil des exsudats révèle la présence de nombreux composés tels que 2'-DMA ("2'-deoxymugi-

neic acid" : phytosidérophore exsudé par le blé et connu pour son rôle dans l'absorption de Fe, voire Zn, Cu et Mn^{[7],[8]}), lactate, acétate, glycinebétaine...^{[1],[3]}. Sous contrôle, 2, 3 et AG présentent les teneurs en composés exsudés les plus élevés, corrélativement aux teneurs métalliques dans les racines. On note une tendance génotypique similaire entre le 2'-DMA et les teneurs en Fe, Zn, Mn et Cu (figure 3). Ceci laisse supposer une localisation sur les chromosomes 2E et 3E, de gènes liés à la production de cette molécule et confirmerait en outre son implication dans l'absorption de Fe et Zn, voire Mn et Cu. Sous traitement, les variations génotypiques entre les LIM exsudés tels que 2'-DMA ou acétate et les métaux dans les racines sont beaucoup moins évidentes, ce qui pourrait s'expliquer par un besoin moindre d'assistance à l'absorption par ces ligands (du fait de la plus grande disponibilité en métal libre dans la solution nutritive modifiée). Ceci reste cohérent avec la réduction globale de l'exsudation observée sous traitement (tableau 1), et suggère que l'absorption des métaux soit alors réalisée via d'autres mécanismes.

Sous contrôle, aucune corrélation significative n'est observée entre les LIM analysés dans les racines et les teneurs en métaux. Sous traitement, ces teneurs en LIM augmentent fortement en réponse à l'accumulation des métaux dans les racines (tableau 2). 2 et 3 montrent la plus forte accumulation en malate, citrate, lactate, alanine, et 5, 6 la plus forte en glycine, leucine, fumarate, aspartate... (tableau 2).

Une co-variation génotypique entre Fe, citrate, malate et lactate est constatée (tendance similaire relevée pour Mn et Zn) (figure 4), de même qu'entre Cd, alanine et un composé organique phosphaté (non clairement identifié, noté ici P-LIM) (figure 4).

Ainsi ces LIM pourraient être impliqués dans des phénomènes de séquestration des métaux en excès, voire éventuellement réduire leur effet toxique potentiel. Les

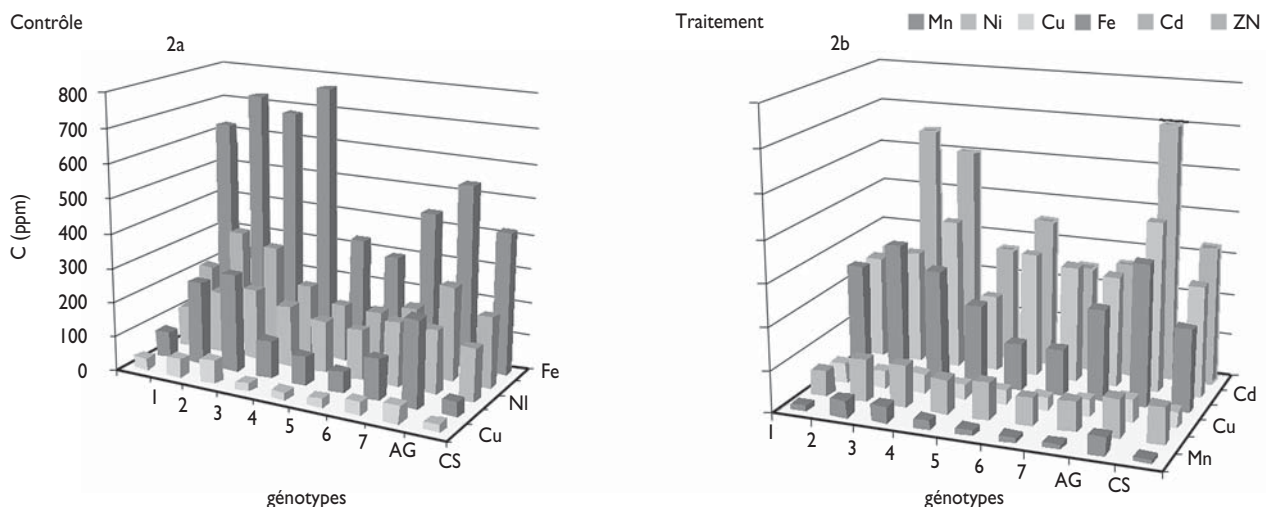


Figure 2 - Concentrations métalliques dans les racines (ppm) : contrôle (2a) et traitement (2b)

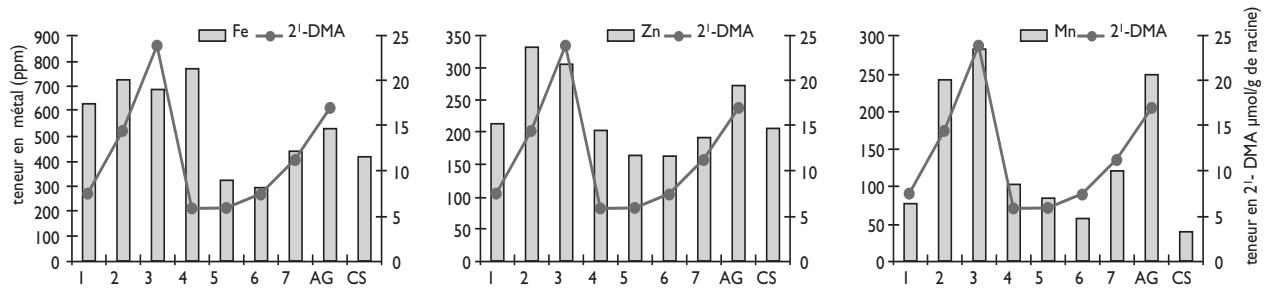


Figure 3 - 2'-DMA exsudé et Fe, Zn, Mn dans les racines (contrôle).

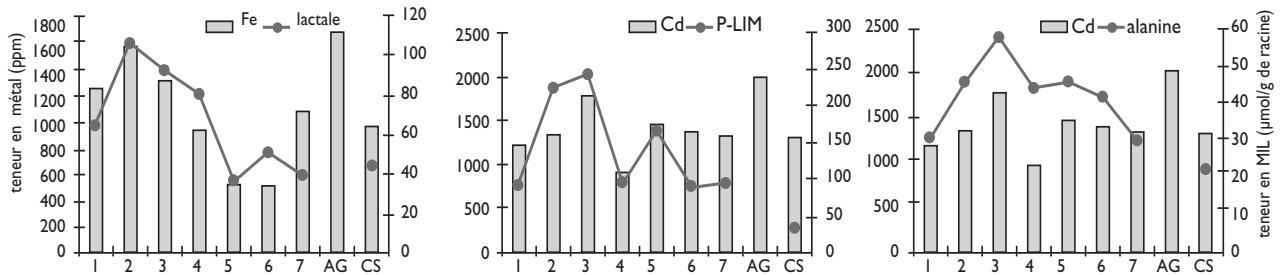


Figure 4 - Fer, cadmium et quelques LIM détectés dans les racines sous traitement

NB : pas de données pour AG par manque de tissu

gènes impliqués sembleraient être notamment 2E et 3E.

Ce type d'approche a permis de révéler des différences significatives tant au niveau de l'accumulation d'espèces métalliques que de la production d'exsudats ou de métabolites internes. L'analyse de tels résultats devrait aider à mieux appréhender l'ensemble des mécanismes (biochimie, composantes génétiques) mis en jeu par les plantes pour mobiliser, accumuler et tolérer les métaux, afin d'optimiser les procédés de remédiation par les plantes.

Tableau 2 : Concentrations de quelques LIM détectés dans les racines (μmol/g racine)

| | | Génotype | | | | | | | | |
|-----------|---|----------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Composé | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | AG | CS |
| glycine | C | 2,22 | 2,31 | 2,98 | 2,21 | 1,74 | 6,52 | 2,30 | 1,24 | 5,17 |
| | T | 4,02 | 6,47 | 5,71 | 4,75 | 21,13 | 13,48 | 6,68 | na | 1,82 |
| citrate | C | nd | 5,76 | 4,26 | 1,84 | 3,82 | 2,17 | 2,30 | 7,04 | 11,72 |
| | T | 34,55 | 54,19 | 51,87 | 31,77 | 25,14 | 23,84 | 22,12 | na | 18,60 |
| malate | C | 5,92 | 16,14 | 11,49 | 14,75 | 17,03 | 14,86 | 8,05 | 23,60 | 41,01 |
| | T | 58,65 | 105,95 | 92,80 | 80,71 | 37,89 | 52,17 | 40,48 | na | 44,87 |
| aspartate | C | 5,92 | 14,99 | 16,17 | 8,85 | 5,21 | 13,41 | 8,05 | 8,69 | 15,85 |
| | T | 22,90 | 29,12 | 13,80 | 17,53 | 47,37 | 36,28 | 26,29 | na | 5,84 |

C : contrôle T : traitement nd : non détecté na : non analysé (manque de tissu)

* Fabienne Baraud

Équipe de recherche en physico-chimie et biotechnologies - Bâtiment Sciences 2 Campus 2, Bd du Maréchal Juin, 14032 Caen Cedex - France f.baraud@vire.iutcaen.unicaen.fr

** Teresa W.-M. Fan

Department of Land, Air and water Resources - University of California, One Shields Ave., Davis, CA 95616-8627, USA.

*** Richard M. Higashi

Center for Health and the Environment, John Muir Institute of the Environment, University of California, One Shields Ave., Davis, CA 95616-8627, USA

Références

[1] Fan TW M et al. (2001) Genotypic influence on metal ion mobilization

and sequestration via metal ion ligand production by wheat. In Eller Heineman (ed) Nuclear Site Remediation, American Chemical Society, Washington DC, pp 417-431.

[2] Epstein E (1972) Mineral nutrition of plants : principles and perspectives. Wiley, New York.

[3] Fan TW M et al. (1997) Comprehensive analysis of organic ligands in whole root exudates using nuclear magnetic resonance and gas chromatography-mass spectrometry. Analytical Biochemistry 251: 57-68.

[4] Baraud F. et al (2002) Interactive effect of cadmium and soil humates on metal acquisition and sequestration in wheat (à paraître dans Environmental Chemistry, Springer Publisher).

[5] Fan TW M et al. (2001b) Comprehensive chemical profiling of gramineous root exudates using high-resolution NMR and MS. Phytochemistry. 57: 209-221.

[6] Sauerbeck DR (1991) Plant, element and soil properties governing uptake and availability of heavy metals derived from sewage sludge. Water, Air and Soil Pollution 57-58 : 227-237

[7] Romheld V (1991) The role of phytosiderophores in acquisition of iron and other micronutrients in gramineous species : an ecological approach. Plant and soil 130: 127-134.

[8] Hopkins BG et al (1998) Plant Nutrition 21: 2623-2637.