

n° 153  
3 microfiches

Laurent  
L'HUILLIER

**Thèses et documents microfichés**

Biodisponibilité du nickel  
dans les sols ferrallitiques ferritiques  
de Nouvelle-Calédonie.

Effets toxiques de Ni sur le développement  
et la physiologie du maïs.

**ORSTOM**  
éditions

ACADÉMIE DE MONTPELLIER

**UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER II**

\* SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC \*

**T H È S E**

présentée à l'Université de Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc  
pour obtenir le diplôme de DOCTORAT

SPÉCIALITÉ :           PHYSIOLOGIE

Formation Doctorale : Bases de la Production Végétale

École Doctorale :       Biologie des Systèmes Intégrés - Agronomie - Environnement

**BIODISPONIBILITÉ DU NICKEL  
DANS LES SOLS FERRALLITIQUES FERRITIQUES  
DE NOUVELLE-CALÉDONIE.  
EFFETS TOXIQUES DE Ni SUR LE DÉVELOPPEMENT  
ET LA PHYSIOLOGIE DU MAÏS**

*par*

**Laurent L'HUILLIER**

Soutenue le 20 décembre 1994 devant le jury composé de :

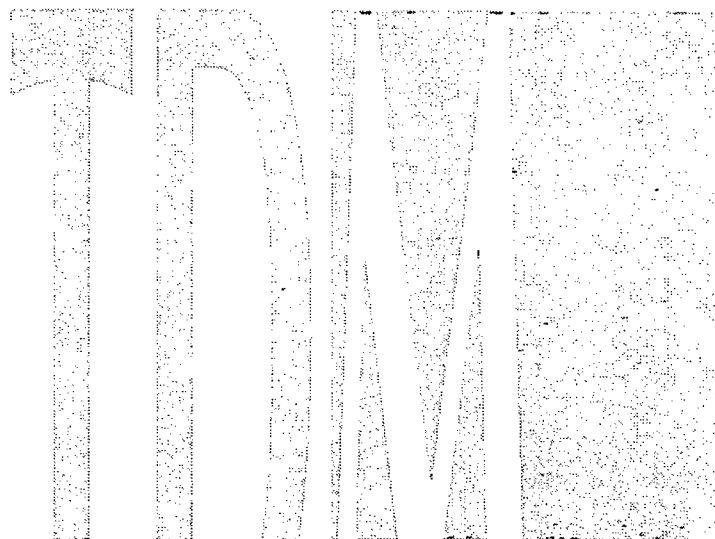
M. LAMANT André	Professeur, Université de Bordeaux I	<i>Rapporteur</i>
M. LEFEBVRE Claude	Professeur, Université Libre de Bruxelles	<i>Rapporteur</i>
M. BONZON Bernard	Directeur de Recherche, ORSTOM, Nouméa	<i>Examineur</i>
M. JUSTE Christian	Directeur de Recherche, INRA, Bordeaux	<i>Examineur</i>
Mme MICHAUD-FERRIÈRE Nicole	Chargé de Recherche, CNRS, Montpellier	<i>Examineur</i>
M. MOREL Jean-Louis	Professeur, ENSAIA-INPL, Nancy	<i>Examineur</i>
M. D'AUZAC Jean	Professeur, Université de Montpellier II	<i>Directeur de Thèse et Président du jury</i>

ORSTOM  
Laboratoire d'Agropédologie  
B.P. A5 - Nouméa - Nouvelle-Calédonie.

Université Montpellier II  
Laboratoire de Biotechnologie  
et de Physiologie Végétale Appliquée.

n° 153

3 microfiches



**Thèses et documents microfichés**



Orstom, l'Institut français de recherche scientifique  
pour le développement en coopération

La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, que les «copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective» et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, «toute représentation ou reproduction intégrale, ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause, est illicite» (alinéa 1<sup>er</sup> de l'article 40).

Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code pénal.

© ORSTOM éditions 1996, Paris

ISSN : 0767-922X

ISBN : 2-7099-1328-3

## REMERCIEMENTS

*Je tiens tout d'abord à exprimer ma plus vive reconnaissance à Bernard BONZON, sans lequel ces recherches n'auraient pu être lancées ni aboutir. Il m'a accueilli au Laboratoire d'Agropédologie du Centre ORSTOM de Nouméa afin d'y mener à bien l'essentiel de ce travail et m'a permis de rédiger cette thèse dans les meilleures conditions possibles. Il a su me transmettre sa rigueur scientifique et je lui dois l'essentiel des connaissances que j'ai acquises en agropédologie. Qu'il trouve ici le témoignage de toute ma gratitude pour l'aide considérable qu'il m'a apporté au long de ces quatre années, pour ses encouragements, ses conseils et ses critiques toujours constructives.*

*Monsieur le professeur D'AUZAC, Professeur de Physiologie Végétale à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc, a bien voulu accepter de diriger ces recherches malgré l'éloignement. Je le remercie vivement d'avoir toujours manifesté pour mon travail un intérêt passionné à la hauteur de cet éloignement, ainsi que pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Il m'a également fait le grand honneur d'assurer la présidence de ce jury. J'espère qu'il gardera un bon souvenir de mes "fax matinaux"... Je n'oublierai jamais, de mon côté, le professeur de physiologie végétale qu'il a été pour moi pendant plusieurs années, ainsi que son esprit toujours "pétillant" d'idées si propice à la recherche !*

*Messieurs les professeurs LAMANT et LEFEBVRE ont bien voulu accepter d'être les rapporteurs du jury. Je les en remercie sincèrement, ainsi que pour leurs rapports, tout à mon avantage, qui ont contribué à ma réussite dans cet examen. Ma gratitude revient également à Madame MICHAUD-FERRIÈRE et Messieurs JUSTE et MOREL pour leur participation en tant qu'examineurs et pour le jugement très favorable qu'ils ont porté à ce document.*

*Cette thèse ne serait ce qu'elle est sans le soutien financier important de la Province Sud. Les recherches ont en effet pu être conduites dans des conditions matérielles idéales nécessaires à la réalisation d'un document de qualité. J'espère d'une part avoir su exploiter toutes les possibilités qui m'ont été offertes, et, d'autre part, que ce travail sera utile au développement agricole de la région Sud. Que la Province Sud soit vivement remerciée pour la confiance toujours accordée tout au long de ces recherches. Je ne saurais oublier Monsieur DESVALS, Directeur de la Direction du Développement Rural de la Province Sud, et Monsieur ARRIGHI, Chef du service des Productions Végétales et des Forêts à la DDR, pour leur contribution essentielle à la collaboration entre la Province Sud et l'ORSTOM et pour l'intérêt qu'ils ont toujours porté à ces recherches.*

*Tous les membres de l'équipe du laboratoire d'Agropédologie de l'ORSTOM Nouméa ont participé activement à la réalisation de ce travail. Je les en remercie chaleureusement : Thierry BECQUER et Emmanuel BOURDON, mes deux "gourous" en matière de pédologie; Sylvie EDIGHOFFER, pour les nombreuses heures de sauna passées ensemble dans la serre, ainsi que Joseph OUCKEWEN, Léon TAPUTUARAI et William NIGOTE nos hommes "à tout faire" sans qui rien ne se ferait... Merci également à Gaëlle pour son aide pendant le "coup de bourre" des derniers jours de la rédaction...*

*Je n'oublierai pas la participation essentielle de nombreuses autres personnes du Centre ORSTOM de Nouméa. Je pense notamment à Messieurs PÉTARD et VEYSSEYRE, qui ont dirigé le Laboratoire Central d'Analyse et grâce auxquels (ainsi que les techniciens) de très nombreux résultats d'analyses physico-chimiques ont pu être publiés dans ce document. Marika TORTELIER et Yves PENVERN ont réalisé de leurs mains d'artistes quelques dessins (en particulier le plant de maïs) que je suis fier de présenter. Enfin, Jean-Pierre MERMOUD et Noël GALAUD ont permis une édition rapide et de qualité du document. Qu'ils en soient tous vivement remerciés.*

*Que Messieurs CORNET et MOREAU, respectivement Directeur délégué Chef du département "Milieux et Activités Agricoles" et responsable de l'UR 3D/A ("Systèmes de Culture et Fonctionnement Actuel des Sols") pendant cette période, reçoivent mes remerciements pour avoir donné leur accord à ce programme de recherche et pour leur soutien constant.*

*Je garde un excellent souvenir de l'aide de nombreuses personnes et laboratoires non-ORSTOM. J'exprime ainsi ma gratitude au CREA (Centre de Recherche et d'Expérimentation Agronomique) de Bourail pour m'avoir permis d'utiliser leur serre probablement la plus haute du Territoire; jamais je n'oublierai cet essai conduit à près de 200 km du laboratoire... Je suis reconnaissant à Bernard PELLETIER (SLN) pour m'avoir aidé dans le positionnement des sols riches en nickel sur la carte de leur répartition mondiale. J'adresse mes remerciements à tous ceux qui suivent : Nicole MICHAUD-FERRIÈRE et son équipe si sympathique (Jacques Escout et Lolita) du CIRAD Montpellier pour m'avoir guidé dans l'étude histo, Monique DURAND pour son aide en matière d'analyse à la microsonde électronique, Monsieur ROY du CNRS Montpellier et Hélène COLAS pour la mesure de la photosynthèse, Madame MARGOUT du CRIC de la Faculté de Médecine de Montpellier pour la microscopie électronique à transmission, Messieurs DATAS et ROSSI de l'USTL pour la microscopie électronique à balayage et la microsonde, Monsieur NITSHE du CNRS de Luminy pour la MET-microsonde, Didier TOUCHE de l'INRA Montpellier pour les autoradiographies, et bien sûr les étudiants et techniciens du laboratoire de Monsieur D'AUZAC à Montpellier, en particulier Claude CHALIÈS, expert dans l'installation des salles de culture, Ibtissam pour son aide pour les autoradiographies, Thierry Regnier,*

*mon cameraman lors de la soutenance, ainsi que Robert et Stéphane, mes deux "passeurs de diapos".*

*Enfin, ces remerciements ne seraient pas complets si je ne citais pas mes parents. Ils m'ont en effet soutenu pendant toutes ces années d'étude et m'ont permis d'en arriver là. Je leur exprime ici toute ma reconnaissance. Je terminerai en ayant une pensée particulière pour mon épouse, qui a enduré mon absence de longues soirées durant en compagnie de Jean-Baptiste, puis de Benoît... Qu'ils me pardonnent, cela n'arrivera plus !*

*À mon épouse,  
à Jean-Baptiste et Benoît*

## ABRÉVIATIONS

### SIGLES

cv	:	Cultivar.
CEC	:	Capacité d'échange cationique.
HR	:	Humidité Relative.
IR <sub>n</sub>	:	Inhibition de la croissance racinaire de n %.
MS, MF	:	Matière Sèche, Matière Fraîche.
H <sub>n</sub>	:	Hauteur du plant de maïs au niveau de la ligule de la dernière feuille dégainée, après n jours de croissance.
PPDS	:	Plus petite différence significative (au seuil de 5 %).
ppm	:	partie par million = mg kg <sup>-1</sup> = µg g <sup>-1</sup> .

### COMPOSÉS

DMG	:	Diméthylglyoxime.
DTPA	:	Acide diéthylènetriaminopentaacétique.
EDTA	:	Acide éthylènediaminetétraacétique.
TEA	:	Triéthanolamine.



## TABLE DES MATIÈRES

	Pages
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b>	3
<hr/>	
<b>1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	7
<hr/>	
<b>1.1. LES MÉTAUX LOURDS</b>	7
<i>Définitions</i>	7
<i>Sources et pollution</i>	7
<i>Normes pour les métaux lourds</i>	9
<i>Nécessité et phytotoxicité des métaux</i>	9
<i>Quantification d'une phytotoxicité</i>	10
<i>Mécanismes de résistance aux métaux</i>	11
<b>1.2. LE NICKEL</b>	13
<b>1.2.1. Sources et quantités de nickel dans l'environnement</b>	13
<i>Sources anthropiques</i>	13
<i>Sources naturelles</i>	14
<i>Le cas de la Nouvelle-Calédonie</i>	16
<b>1.2.2. Formes du nickel dans les sols</b>	17
<i>Formes dans la solution du sol</i>	17
<i>Formes dans la phase solide du sol</i>	18
<b>1.2.3. Biodisponibilité du nickel dans les sols</b>	18
<i>Facteurs d'influence</i>	19
<i>Estimation</i>	20
<b>1.2.4. Effets du nickel sur l'homme</b>	21
<b>1.2.5. Effets du nickel sur les plantes</b>	22
<i>Ni essentiel pour les plantes ?</i>	22
<i>Les effets toxiques du nickel sur les plantes</i>	23
<b>1.3. PHYTOTOXICITÉ DU NICKEL</b>	23
<b>1.3.1. Absorption de Ni</b>	23
<i>Formes absorbées et transportées</i>	23
<i>Caractéristiques de l'absorption</i>	24
<i>Facteurs influençant l'absorption de Ni</i>	24
<b>1.3.2. Symptômes de toxicité du nickel, et effets sur le développement de la plante</b>	25

<i>Symptômes de toxicité</i>	25
<i>Développement de la plante</i>	26
<b>1.3.3. Effets du nickel sur la nutrition minérale</b>	26
<b>1.3.4. Teneurs en nickel dans la plante. Seuils de phytotoxicité</b>	27
<i>Teneurs normales</i>	27
<i>Teneurs toxiques</i>	27
<i>Répartition dans la plante</i>	29
<b>1.3.5. Mécanismes de la toxicité du nickel chez les végétaux</b>	30
<i>Action sur la photosynthèse</i>	30
<i>Action sur le métabolisme des carbohydrates</i>	31
<i>Effet sur la cellule</i>	31
<i>Action sur les systèmes enzymatiques</i>	31
<b>1.3.6. Mécanismes de résistance</b>	32
<hr/>	
<b>2. MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	35
<hr/>	
<b>2.1. MATÉRIEL VÉGÉTAL</b>	35
<b>2.1.1. Les espèces cultivées</b>	35
<b>2.1.2. Culture sur sol en vase de végétation</b>	35
<b>2.1.3. Culture sur solution</b>	39
<b>2.1.4. Culture sur rhizotron</b>	40
<b>2.1.5. Description du plant de maïs</b>	40
<b>2.2. LES SOLS</b>	42
<b>2.3. ANALYSES DES VÉGÉTAUX, DES SOLS ET DES EAUX</b>	43
<b>2.3.1. Analyses chimiques des végétaux</b>	43
<b>2.3.2. Analyses physico-chimiques des sols</b>	44
<b>2.3.3. Analyses chimiques des solutions aqueuses</b>	45
<b>2.4. DOSAGE D'ACIDES ORGANIQUES</b>	46
<b>2.5. DOSAGE D'ENZYMES ET DE PROTÉINES</b>	47
<b>2.5.1. Peroxydases</b>	47
<i>Préparation des extraits</i>	47
<i>Mesure de l'activité des peroxydases</i>	47
<i>Electrophorèse</i>	48
<b>2.5.2. AIA-oxydase</b>	48

2.5.3. ATPase	48
2.5.4. Dosages de protéines	49
<b>2.6. DOSAGE D'ÉTHYLÈNE</b>	49
<b>2.7. MESURES DE LA PHOTOSYNTÈSE ET DE LA CONDUCTANCE STOMATIQUE</b>	50
2.7.1. Mesure de la photosynthèse	50
2.7.2. Mesure de la conductance stomatique	50
<b>2.8. UTILISATION DU NICKEL RADIOACTIF</b>	51
<i>Absorption de <sup>63</sup>Ni par des racines excisées</i>	51
<i>Absorption de <sup>63</sup>Ni par des plants entiers</i>	51
<i>Extraction et Dosage</i>	51
<b>2.9. TECHNIQUES DE LOCALISATION DU NICKEL</b>	52
2.9.1. Localisation du nickel par microsonde électronique	52
<i>Microanalyse en MEB</i>	52
<i>Microanalyse en MET</i>	53
2.9.2. Révélation du nickel par autoradiographie	54
2.9.3. Coloration du nickel par le diméthylglyoxime	54
2.9.4. Révélation du nickel par la méthode au sulfure d'argent	54
<b>2.10. OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES</b>	55
2.10.1. Microscopie photonique (MP)	55
<i>Coloration des protéines et des sucres</i>	55
<i>Coloration des lignines</i>	56
<i>Révélation du nickel</i>	56
2.10.2. Microscopie électronique à transmission (MET)	56
2.10.3. Microscopie électronique à balayage (MEB)	56
2.11. ANALYSES STATISTIQUES	56
<hr/>	
<b>3. BIODISPONIBILITÉ DU NICKEL DANS LES SOLS FERRALLITIQUES FERRITIQUES DE NOUVELLE-CALÉDONIE</b>	59
<hr/>	
3.1. CONDITIONS EXPÉRIMENTALES	60
3.2. RÉSULTATS	62

3.2.1. Mobilité du nickel dans les sols ferrallitiques ferritiques	62
3.2.2. Biodisponibilité du nickel dans les sols ferrallitiques ferritiques	68
3.3. DISCUSSION ET CONCLUSION	73
<i>RÉSUMÉ</i>	79
<hr/>	
<b>4. EFFETS TOXIQUES DU NICKEL SUR LE DÉVELOPPEMENT ET LA NUTRITION DU MAÏS</b>	<b>83</b>
<hr/>	
4.1. CONDITIONS EXPÉRIMENTALES	83
4.2. EFFETS DU NICKEL SUR LA CROISSANCE ET LE DÉVELOPPEMENT DU MAÏS	84
4.2.1. Résultats	84
<i>Modifications morphologiques</i>	84
<i>Effets du nickel sur la croissance et le développement du maïs</i>	84
4.2.2. Discussion	91
4.3. SEUILS DE TOXICITÉ DU NICKEL POUR LE MAÏS	94
4.3.1. Résultats	94
<i>Seuil de toxicité de Ni dans les parties aériennes du maïs</i>	94
<i>Seuil de toxicité de Ni dans la solution</i>	98
4.3.2. Discussion	100
4.4. DIFFÉRENCES DE SENSIBILITÉ AU Ni ENTRE ESPÈCES ET ENTRE CULTIVARS DE MAÏS	102
4.4.1. Résultats	102
4.4.2. Discussion	106
4.5. EFFETS DES CONCENTRATIONS TOXIQUES EN Ni SUR LA NUTRITION MINÉRALE DU MAÏS	107
4.5.1. Résultats	107
4.5.2. Discussion	110
4.6. CONCLUSION	111
<i>RÉSUMÉ</i>	115

<b>5. LOCALISATION DU NICKEL DANS LE MAÏS</b>	119
5.1. CONDITIONS EXPÉRIMENTALES	119
5.2. RÉSULTATS	120
5.2.1. Répartition du nickel à l'échelle de la plante	120
5.2.2. Localisation histologique du nickel	123
5.3. DISCUSSION ET CONCLUSION	141
RÉSUMÉ	147
<b>6. EFFETS TOXIQUES DU NICKEL SUR LA PHYSIOLOGIE DU MAÏS</b>	151
6.1. CARACTÉRISTIQUES DE L'ABSORPTION DU NICKEL PAR LE MAÏS	151
6.1.1. Conditions expérimentales	151
6.1.2. Résultats	152
<i>Influence du DNP sur l'absorption du nickel</i>	152
<i>Affinité des racines des deux cultivars de maïs pour Ni</i>	154
<i>Influence de Ca, Mg et Fe sur l'absorption de Ni</i>	154
6.1.3. Discussion et conclusion	158
<i>Influence du DNP sur l'absorption du nickel</i>	158
<i>Affinité des racines des deux cultivars de maïs pour Ni</i>	159
<i>Influence de Ca, Mg et Fe sur l'absorption de Ni</i>	159
6.2. LES MÉCANISMES FORTEMENT IMPLIQUÉS DANS LA TOXICITÉ DU NICKEL CHEZ LE MAÏS	161
6.2.1. Conditions expérimentales	161
6.2.2. Résultats	161
<i>Action du nickel sur l'acidification du milieu par les racines de maïs</i>	161
<i>Action du nickel sur la fuite d'électrolytes des racines de maïs</i>	162
<i>Action du nickel sur la teneur en eau du maïs</i>	165
<i>Action du nickel sur la structure et l'ultrastructure du maïs</i>	167
<i>Action du nickel sur l'activité des peroxydases</i>	185
6.2.3. Discussion et conclusion	185
<i>Action du nickel sur l'acidification du milieu par les racines de maïs</i>	185
<i>Action du nickel sur la fuite d'électrolytes des racines de maïs</i>	187
<i>Action du nickel sur la teneur en eau du maïs</i>	188
<i>Action du nickel sur la structure et l'ultrastructure du maïs</i>	190
<i>Action du nickel sur l'activité des peroxydases</i>	193

<b>6.3. LES MÉCANISMES PEU IMPLIQUÉS DANS LA TOXICITÉ DU NICKEL SUR LE MAÏS</b>	195
<b>6.3.1. Conditions expérimentales</b>	195
<b>6.3.2. Résultats</b>	195
<i>Action du nickel sur la photosynthèse</i>	195
<i>Action du nickel sur l'activité AIA-oxydase</i>	196
<i>Action du nickel sur la synthèse d'éthylène</i>	196
<b>6.3.3. Discussion et conclusion</b>	197
<i>Action du nickel sur la photosynthèse</i>	197
<i>Action du nickel sur l'activité AIA-oxydase</i>	198
<i>Action du nickel sur la synthèse d'éthylène</i>	199
<b>6.4. LES MÉCANISMES DE RÉSISTANCE AU NICKEL</b>	200
<b>6.4.1. Conditions expérimentales</b>	200
<b>6.4.2. Résultats</b>	201
<i>Teneurs en Ni dans les racines et les parties aériennes des deux cultivars</i>	201
<i>Activité peroxydase impliquée dans la lignification chez les deux cultivars</i>	202
<b>6.4.3. Discussion et conclusion</b>	203
<b>6.5. CONCLUSION</b>	208
<i>RÉSUMÉ</i>	211
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE</b>	215
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	223
<b>ANNEXES</b>	243

---

**INTRODUCTION  
GÉNÉRALE**

---

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

Depuis de nombreuses années, la protection de l'environnement est une préoccupation majeure des pays industrialisés. En effet, après des décennies de production de déchets incontrôlée, l'homme a pris conscience de l'intérêt vital qu'il a à préserver l'équilibre écologique du milieu dans lequel il vit. D'autre part, toute agriculture moderne est orientée vers des productions végétales de haut rendement économique, mais aussi de qualité. Par conséquent, les facteurs pouvant altérer ces productions doivent être contrôlés au mieux de façon à limiter leurs effets indésirables.

Dans ce cadre, les métaux lourds font partie des polluants les plus dangereux pour l'ensemble des organismes vivants (Norseth, 1994) et des végétaux en particulier (Foy *et al.*, 1978) : ils sont généralement toxiques à des concentrations très faibles. Le nickel est l'un de ceux qui posent le plus souvent des problèmes de phytotoxicité (Foy *et al.*, 1978).

C'est la raison pour laquelle cette étude a été engagée, dans le cadre d'un programme de recherches plus général sur les facteurs de la fertilité et des conditions de mise en valeur des sols ferrallitiques ferritiques du Sud de la Nouvelle-Calédonie. Ces derniers possèdent, en effet, de très fortes teneurs en nickel dont on connaissait mal la biodisponibilité et moins encore les risques potentiels de phytotoxicité. L'étude a démarré en 1991, soutenue financièrement par la Province Sud du Territoire. Elle a été conduite à la fois au Laboratoire d'Agropédologie du Centre ORSTOM de Nouméa et au Laboratoire de Biotechnologie et de Physiologie Végétale Appliquée de l'Université de Montpellier II. Sollicitant les connaissances et les techniques de la pédologie, de l'agronomie et de la physiologie végétale, elle apporte des réponses à un certain nombre de questions qui se posaient lors de son lancement. Elle devrait également constituer le premier maillon d'une longue suite de travaux sur le nickel et les autres métaux lourds présents dans les différents milieux naturels de la Nouvelle-Calédonie.

Les sols issus des roches ultrabasiques du Sud de la Nouvelle-Calédonie sont pour la plupart des sols ferrallitiques très évolués. Ils ont effectivement des teneurs en fer très élevées, souvent plus de 75 %, ce qui a entraîné la création d'une sous-classe "ferritique" dans cette grande classe des sols tropicaux (Latham *et al.*, 1978). Ils se distinguent également par des teneurs en nickel exceptionnelles, de l'ordre de 1 %. Par suite, ces sols constituent un milieu particulièrement riche en problèmes et intéressant à étudier tant pour les pédologues, que pour les agronomes, les physiologistes ou les botanistes.



Le nickel semble relativement peu mobile dans ces sols. Cependant, certains facteurs sont susceptibles d'influer sur sa mobilité et d'augmenter sa disponibilité pour les végétaux. Il semblerait qu'une diminution du pH soit un facteur décisif. Les constituants de la phase solide du sol, telles que les oxydes de fer ou la matière organique, pourraient également jouer un rôle déterminant. Étant donné les variations de pH, de teneur en oxydes de fer, et de teneur en matière organique rencontrées dans les sols ferrallitiques ferritiques, il nous a paru important de caractériser la biodisponibilité du nickel dans ces types de sols, à la fois par des tests biologiques (cultures de maïs), et par des réactifs chimiques. Cette première partie des résultats est présentée dans le chapitre 3.

Par ailleurs, un effet toxique précoce du nickel semble être un ralentissement de la croissance racinaire. Un ralentissement de la croissance des parties aériennes, ainsi qu'une diminution de la production sont parfois rapportés. Mais, généralement, il semble que ces effets correspondent à des teneurs très toxiques, dépassant largement le seuil de tolérance de la plante. Par conséquent, une étude précise des effets du nickel sur la croissance et la nutrition du maïs (utilisé comme plante-test en raison de la grande sensibilité de ses réponses aux variations des caractéristiques physiques et chimiques des sols), depuis les premiers stades de son développement jusqu'à sa production, ainsi qu'une définition précise du seuil de phytotoxicité du nickel pour le maïs nous ont paru indispensables. Le chapitre 4 présente les résultats de cette étude.

Les deux chapitres suivants concernent la physiologie de la toxicité du nickel sur le maïs. Les désordres physiologiques induits par un métal en excès semblent être multiples, mais les mécanismes mis en jeu sont généralement mal connus. Le nickel serait absorbé facilement, quand il est disponible, et serait transporté partiellement vers les parties aériennes. Il entraînerait une baisse de la photosynthèse, ainsi qu'une accumulation de carbohydrates foliaires, ce qui peut paraître contradictoire. Par ailleurs, le nickel semble pouvoir activer ou inhiber de nombreux systèmes enzymatiques. Mais, à notre connaissance, le mode d'action toxique du nickel n'est toujours pas complètement expliqué. Ainsi, dans cette partie de l'étude, matière du chapitre 5, nous sommes nous d'abord intéressés à la localisation du nickel dans le maïs. Enfin, le chapitre 6 présente les caractéristiques de l'absorption du nickel et les réponses physiologiques du maïs intoxiqué par Ni, et propose plusieurs mécanismes visant à expliquer son action toxique chez le maïs.

# CHAPITRE *1*

---

## SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

---



# I

---

## SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Tous les métaux lourds, lorsqu'ils sont en excès dans le milieu, peuvent être toxiques pour la plupart des organismes vivants : la faune et la flore aquatique, la microfaune et la microflore du sol, les végétaux et les animaux terrestres. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons uniquement aux effets toxiques des métaux, et du nickel en particulier, dans le système sol / plante.

### 1.1. LES MÉTAUX LOURDS

#### *Définitions*

Selon Phipps (1981), un métal est souvent défini d'après les propriétés physiques de son état élémentaire (malléabilité, conductivité, ...), ce qui correspond mal aux problèmes posés par la biologie. Dans ce cadre, il est plus juste de définir les métaux en terme de réactivité chimique, comme des éléments qui tendent à exister sous forme cationique. Ils ont également tendance à agir comme des acides de Lewis, acceptant des doublets d'électrons et permettant des liaisons de coordination pour former des complexes. Cependant, cette définition n'est pas suffisante dans la mesure où elle englobe des éléments qui ne sont pas des métaux, tels que l'arsenic et le sélénium. Par conséquent, il n'y a pas de définition absolue pour caractériser les métaux. De plus, le terme métal est souvent utilisé indifféremment pour l'élément et les composés qui le contiennent (par exemple, "l'absorption de Ni par ..." ne distingue pas la forme sous laquelle Ni est absorbé).

On désigne généralement par "métaux lourds" les éléments dont le numéro atomique est supérieur à 20. Les métaux traces sont ceux trouvés en très faible quantité ( $< 100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MS), ce qui est généralement le cas pour tous les métaux lourds, mais il existe des exceptions, tant au niveau des sols que des végétaux. Ce terme est parfois confondu avec les oligo-éléments, désignant les éléments nécessaires à la croissance d'un organisme en faible quantité.

#### *Sources et pollution*

Les roches magmatiques contiennent naturellement des métaux lourds, parfois à des teneurs importantes pouvant être exploitées par l'homme à l'échelle industrielle. L'altération de la roche libère des métaux que l'on retrouve dans les sols et les eaux, le plus souvent à l'état de traces.

Tableau 1.1. Normes pour les métaux lourds dans les boues d'épandage des stations d'épuration, les eaux potables et les aliments.

Métal	BOUES						EAUX ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ ) France <sup>4</sup>	ALIMENTS ( $\text{mg.kg}^{-1}$ MS) Australie <sup>5</sup>
	(mg.kg <sup>-1</sup> MS)			(kg.ha <sup>-1</sup> .an <sup>-1</sup> )				
	France <sup>1</sup>	CEE <sup>2</sup>	Etats Unis <sup>3</sup>	France <sup>1</sup>	CEE <sup>2</sup>	Etats Unis <sup>3</sup>		
Hg	20	16-25	57	-	0,1	0,85	1	0,03
Cd	40	20-40	85	-	0,15	1,9	5	0,05
Se	-	-	-	-	-	5,0	10	1
Ni	400	300-400	420	0,6	3	21	50	-
Pb	1600	750-1200	840	-	15	15	50	0,3-2,5
Cr	2000	-	3000	-	-	150	50	-
Cu	2000	1000-1750	4300	-	12	75	1000	10-200
Zn	6000	2500-4000	7500	-	30	140	5000	150

<sup>1</sup> AFNOR NFU 44-041 (1985); <sup>2</sup> CEC (1986); <sup>3</sup> US EPA (1993); <sup>4</sup> MSSP (1989); <sup>5</sup> pour la plupart de aliments (NH & MRC, 1980).

Des teneurs importantes en métaux lourds peuvent apparaître dans les sols à la suite de la pollution de l'environnement résultant de l'activité humaine (Foy *et al.*, 1978; Wallace et Berry, 1989b; Zabel, 1993). La métallurgie, les fonderies, les combustions de carburants, de pétrole et de charbon, et les incinérateurs conduisent à des émissions importantes de métaux dans l'air, surtout pour Cd, Pb, Zn et Cu. Leur retombée constitue généralement la principale source de pollution pour les sols. L'épandage de produits agricoles (boues des stations d'épuration, composts) constituent la seconde source de pollution des sols par les métaux. Ils peuvent en effet contenir des teneurs importantes en métaux lourds, et ces produits sont généralement épandus au champ en quantités très importantes. Les boues des stations de traitement des eaux usées sont souvent polluées par des effluents industriels. Les produits chimiques agricoles, fertilisants ou pesticides, peuvent être des sources de pollution métallique non négligeables. Par exemple, la bouillie bordelaise utilisée régulièrement peut générer des problèmes de phytotoxicité dus au cuivre. L'oxysulfate de zinc est un pesticide pouvant être phytotoxique par excès de Zn. Les engrais phosphatés contiennent couramment 2 à 200 ppm de Cd, pouvant augmenter considérablement la teneur en cadmium d'un sol.

#### *Normes pour les métaux lourds*

Le tableau 1.1 présente les principales normes établies pour les métaux lourds : dans les boues résiduelles des stations d'épuration, les composts, les eaux potables et quelques aliments. L'étude de l'ADEME et INRA (1994) présente une synthèse sur les métaux présents dans les boues d'épuration. En règle générale, les teneurs en nickel dans les aliments sont faibles : sur 234 aliments analysés, une étude de l'Organisation Mondiale de la Santé (W.H.O., 1991) a montré que seulement 3 % avaient des teneurs supérieures à 1  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MS.

#### *Nécessité et phytotoxicité des métaux*

Les métaux sont des constituants intégrés à la biosphère, et on les retrouve par conséquent naturellement dans les sols et les végétaux. Certains sont essentiels au développement des végétaux (Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, et probablement Ni; Heller, 1990, et § 1.2.5) et des animaux (Fe, Mn, Cr, Zn, Cu, Co, Mo, ainsi que Sn, V, Ni, et Li; Neuzil, 1990), mais toujours à l'état de traces.

Bien que tous les métaux puissent être toxiques pour les végétaux, des phytotoxicités n'ont été observées qu'avec quelques un d'entre eux dans la nature. En effet, la toxicité est liée à la présence de certaines formes des métaux dans la solution du sol, généralement une forme ionique (Mench, 1990). Or, la plupart des métaux sont sous des formes peu disponibles dans les sols. Ainsi, Al peut être toxique seulement dans des sols très acides, Mn et Fe dans des sols hydromorphes. Les toxicités de Pb, Co, Be, et Cd n'apparaissent que dans des conditions extrêmes. Cr, Ag, Sn, Ga et Ge sont toxiques en culture sur solution mais quasiment jamais dans les sols. Par contre, il semble que Zn, Cu et Ni soient ceux qui posent le plus fréquemment des problèmes de phytotoxicité (Foy *et al.*, 1978; Angelone et Bini, 1992).

Pb, Hg et Cd sont surtout étudiés pour leur tendance à rentrer dans la chaîne alimentaire par le biais des végétaux et pour leur toxicité pour l'homme. Ainsi, la plupart des recherches portant sur les effets des métaux sur les plantes concernent Zn, Cu, Mn, Al et Ni, ainsi que Cd et Pb (Foy *et al.*, 1978; Angelone et Bini, 1992; Nellessen et Fletcher, 1993).

En règle générale, l'inhibition de la croissance racinaire est un effet précoce de la toxicité des métaux lourds sur les végétaux (Barceló et Poschenrieder, 1990). Mais cet effet est difficile à observer, si bien que le principal effet visible est une diminution de la croissance des parties aériennes. Il peut y avoir diminution de la croissance sans déformations foliaires, chloroses, nécroses ou colorations particulières. Des chloroses, induites par une carence en fer, sont souvent un effet toxique des métaux (De Kock, 1956; Terry, 1981).

Les principaux effets toxiques sont généralement observés au niveau des racines, et ils peuvent être très divers (Punz et Sieghardt, 1993) : diminution de la biomasse, changement de la morphologie, diminution de l'élongation racinaire, diminution de la densité de poils absorbants, subérisation ou lignification accrue, épaississement du méristème, brunissement ou apparition de pigments, ...

D'une manière générale, les mécanismes de phytotoxicité sont très mal connus (voir Foy *et al.*, 1978; Woolhouse, 1983; Aller *et al.*, 1990; Verkleij et Schat, 1990). Les métaux induisent souvent une phytotoxicité : (1) en altérant les transferts hydriques, aboutissant à un flétrissement de la plante, généralement en dégradant préférentiellement le système racinaire (Rauser et Dumbroff, 1981; Barceló et Poschenrieder, 1990), (2) en altérant l'intégrité du plasmalemmes des cellules du cortex racinaire, soit par dégradation de la membrane (cas de Cu) permettant des phénomènes de fuites d'ions (Meharg, 1993; Punz et Sieghardt, 1993), soit par fixation du métal sur la membrane (cas de Al) altérant les systèmes d'absorption (Matsumoto *et al.*, 1992; Nichol *et al.*, 1993), (3) en inhibant la mitose au niveau des méristèmes racinaires (Robertson et Meakin, 1980; Bennet *et al.*, 1987); (4) en inhibant la photosynthèse (Carlson *et al.*, 1975; Clijsters et Van Assche, 1985; Moya *et al.*, 1993), (5) en affectant diverses activités enzymatiques, telle qu'une diminution de l'activité de la RubisCo (E.C. 4.1.1.39) par Cd, Cu, Pb, ou Zn, entraînant une diminution de la fixation photosynthétique du CO<sub>2</sub> (Agarwala *et al.*, 1961; Van Assche et Clijsters, 1990; Karataglis *et al.*, 1991).

#### *Quantification d'une phytotoxicité*

Une phytotoxicité due à un métal peut être mesurée par (Baker et Walker, 1989):

⇒ le pourcentage de germination;

⇒ la croissance des parties aériennes (hauteur, poids frais et sec);

⇒ la croissance des racines (longueur, nombre, poids frais et sec). Généralement ces mesures mettent le plus nettement en évidence l'action toxique d'un métal;

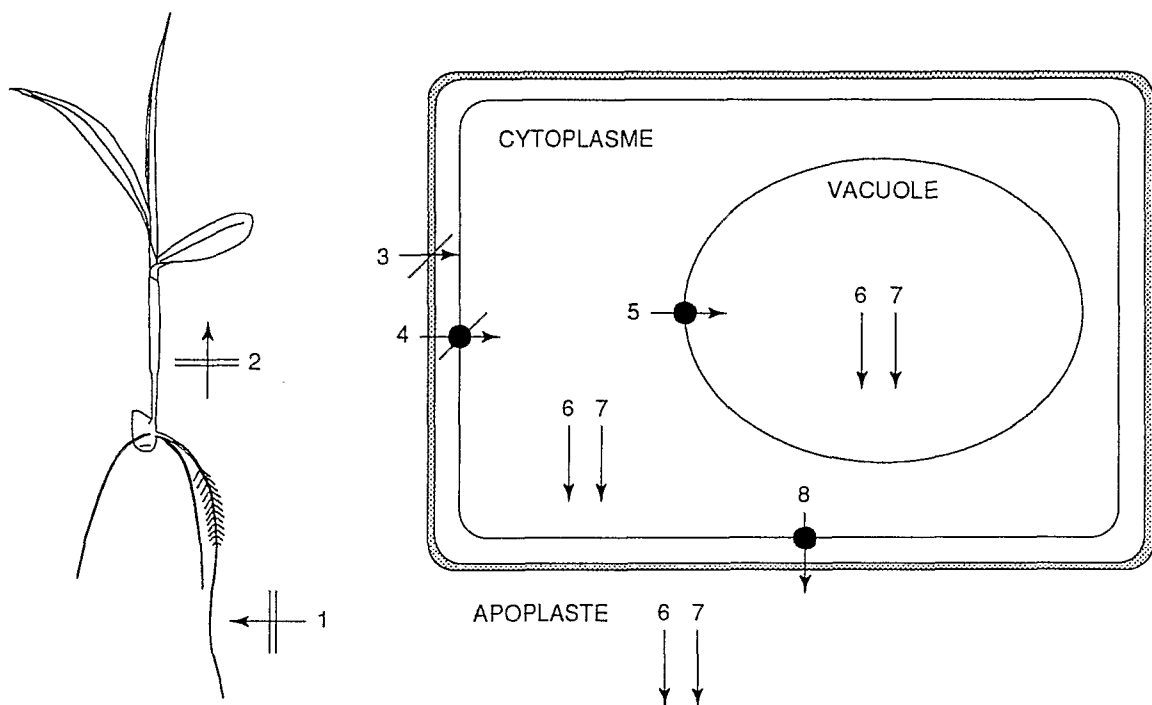
⇒ certaines mesures particulières: (1) la croissance du tube pollinique, (2) les dégâts causés à la membrane, mesurés par le pourcentage de cellules plasmolysées après immersion

dans une solution de glucose 1 M, (3) l'activité mitotique, l'élongation et la différenciation cellulaire au niveau de la racine, (4) certaines réponses du métabolisme, tel que l'activité de la photosynthèse, de la respiration, le taux de chlorophylles, l'activité des peroxydases.

#### Mécanismes de résistance aux métaux

De nombreuses plantes sont connues pour pouvoir résister à des concentrations élevées en métaux. Certaines sont même utilisées pour assainir des eaux polluées, comme la Jacinthe d'eau (*Eichhornia crassipes*) par exemple, qui accumule et tolère des quantités élevées de métaux dans ses tissus (Turnquist *et al.*, 1990).

Les synthèses bibliographiques faisant le point sur les mécanismes de résistance aux métaux sont nombreuses (Ernst, 1976; Cumming et Taylor, 1990; Jackson *et al.*, 1990; Verkleij et Schat, 1990). Globalement, il existe deux types de mécanismes : (a) l'exclusion, mécanisme par lequel la plante limite l'absorption du métal (l'absorption est considérée ici comme étant le passage à travers le plasmalemme des cellules racinaires), (b) la tolérance, où l'absorption se produit, mais la résistance est due à des complexations, ou des précipitations de l'élément sous des formes non toxiques, ou à un stockage dans la vacuole. La figure 1.1 présente les mécanismes potentiels impliqués dans la résistance aux métaux lourds.



**Fig. 1.1. Représentation schématique des mécanismes potentiels impliqués dans la résistance aux métaux lourds.** (1) exclusion par les racines; (2) rétention par les racines; (3) fixation sur les composés pectiques de la paroi; (4) faible perméabilité de la membrane plasmique; (5) transport dans la vacuole; (6) précipitation; (7) complexation; (8) excrétion à partir du cytoplasme vers l'apoplaste.



Un exemple du mécanisme d'exclusion est l'excrétion d'acides organiques dans la rhizosphère, les complexes formés diminuant la disponibilité du métal. Cela a été montré avec Al et l'acide malique excrété par des lignées de blé (Delhaize *et al.*, 1993), ou Al et l'acide citrique sur deux cultivars de haricot (Miyasaka *et al.*, 1991). L'absorption des métaux peut aussi être diminuée par une augmentation du pH de la rhizosphère par les racines, diminuant la solubilité des métaux, ou par une augmentation du potentiel rédox, diminuant notamment l'absorption de Fe et Mn qui sont absorbés sous forme réduite, ou encore par la sécrétion d'un mucilage contenant des molécules complexantes telles que des polysaccharides (Cumming et Taylor, 1990). Les parois peuvent également intervenir dans ce mécanisme d'exclusion : Wang *et al.* (1992) ont montré que la différence de résistance à Mn et Cu de deux génotypes de tabac était due à des différences de rapport  $\text{COO}^- / \text{COOH}$  au niveau des parois des cellules racinaires. Des différences de constitution du plasmalemme peuvent entraîner des différences d'exclusion, en particulier vis à vis de Cu, qui est toxique en dégradant le plasmalemme (Strange et Macnair, 1991; Meharg, 1993).

Par ailleurs, une plante peut tolérer de fortes quantités d'un métal dans ses tissus, par exemple en le stockant dans les vacuoles, comme cela a été observé dans les feuilles de pomme de terre avec Mn (McCain *et al.*, 1990). De nombreux végétaux supérieurs, en présence de teneurs excessives en métaux, peuvent synthétiser des molécules complexantes, telles que des acides organiques (Lee *et al.*, 1978; Gabbrielli *et al.*, 1991; Harmens *et al.*, 1994), ou des polypeptides particuliers appelés phytochélatines. La synthèse des phytochélatines (PC) est induite par de nombreux métaux, dont Cu, Zn, Ni, Pb et surtout Cd (Grill *et al.*, 1987; Scheller *et al.*, 1987; Tomsett et Thurman, 1988). Ces polypeptides ont pour structure générale  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  où  $n = 2-7$  (Steffens, 1990), et il semble que leurs groupements -SH soient fortement impliqués dans la liaison avec les métaux (Grill *et al.*, 1985; Obata et Umebayashi, 1993). Les phytochélatines seraient très efficaces pour fixer les métaux, puisque Gupta et Goldsbrough (1991) ont observé que plus de 90 % du cadmium était associé aux PC chez des plants de tomate tolérants. Il est admis que les complexes PC-Métal sont localisés dans le cytoplasme (Steffens, 1990), mais de récents travaux montrent qu'ils peuvent se trouver aussi dans la vacuole (Vögeli-Lange et Wagner, 1990).

Brune *et al.* (1994) ont montré l'existence des mécanismes 1, 2, 4, 5 et 7 (cf. fig. 1.1) chez l'orge exposé au zinc.

## 1.2. LE NICKEL

### 1.2.1. Sources et quantités de nickel dans l'environnement

La figure 1.2 présente les différentes sources du nickel, et leur transfert entre les différents compartiments de l'environnement.

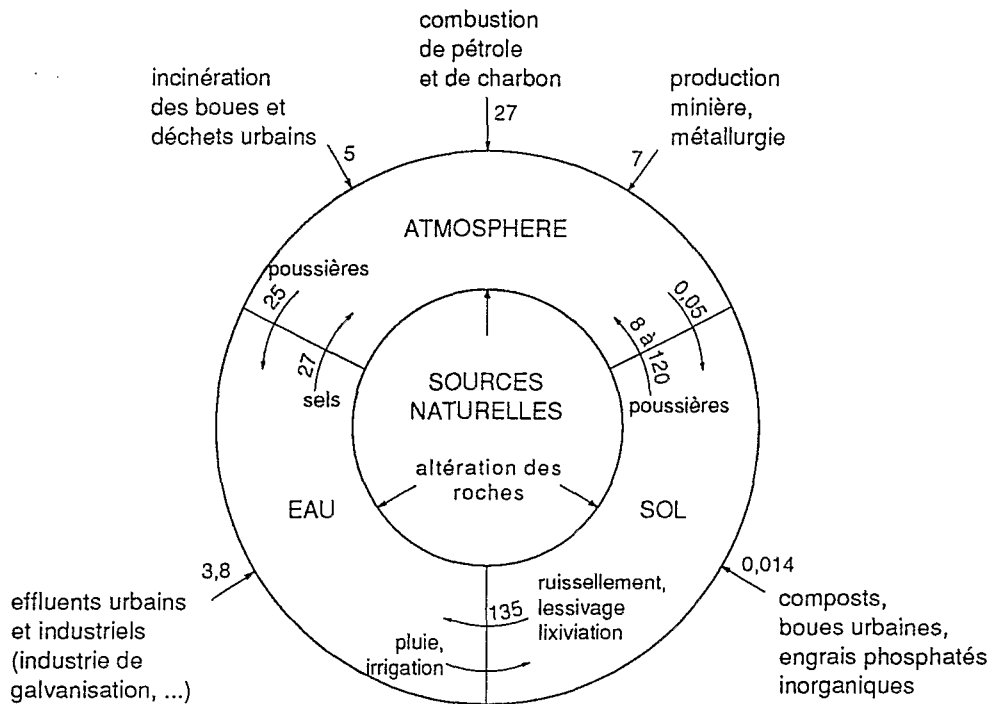


Fig. 1.2. Sources et quantités de nickel transférées dans l'environnement (en  $10^6$  kg / an). (Nriagu, 1979; W.H.O., 1991).

#### *Sources anthropiques*

La source anthropique de nickel la plus importante provient de la combustion de mazout et de résidus de pétrole (contenant naturellement du nickel en faible quantité) pour le chauffage et la production d'énergie (W.H.O., 1991). Le nickel se retrouve alors dans l'atmosphère, puis se dépose à la surface des eaux et des sols. La production minière, la métallurgie et l'industrie de galvanisation constituent également des sources de pollution relativement importantes. Le nickel est en effet largement utilisé pour la fabrication de nombreux composés : la majorité (environ 80 %) est utilisé pour les alliages (surtout des aciers inoxydables). Le reste sert essentiellement au nickelage, l'industrie chimique et la fabrication de monnaies (les pièces de 1 F et 2 F français sont en nickel à 99,9 %).

Il a été montré que les teneurs en nickel dans les sols et les végétaux ont tendance à augmenter au fur et à mesure que l'on se rapproche des différentes usines (Temple et Bisessar, 1981; Frank *et al.*, 1982; Bogatto et Shorthouse, 1991).

La fabrication de batteries Ni-Cd, de composants électroniques, de ciments et de certaines peintures sont des sources de pollution de moindre importance.

Généralement, l'apport de nickel avec les boues urbaines occasionne une augmentation des teneurs en nickel dans les racines et les parties aériennes de la plupart des plantes cultivées (McLean et Dekker, 1978; Soon *et al.*, 1980). Les engrais phosphatés contiennent toujours naturellement de faibles teneurs en nickel (environ 30 ppm).

Cependant, il semble que les quantités de Ni d'origine anthropique reçues par les sols soient relativement faibles (Uren, 1992), et généralement inférieures aux normes concernant les quantités que l'on peut apporter (cf. tableau 1.1).

#### *Sources naturelles*

La plus grande partie du nickel est présent à l'origine dans les roches magmatiques, associé à des silicates ferromagnésiens dit ultrabasiques (pauvres en silice, moins de 44 %), essentiellement les péridots (nésosilicates ferromagnésiens), également les serpentines (phyllosilicates ferromagnésiens, dérivant en particulier des péridots), ou encore les pyroxènes. Les teneurs élevées en Ni trouvées dans ces roches (environ 0,3 %) seraient dues pour une grande part au fait que le rayon ionique de Ni<sup>2+</sup> (70 pm) est très proche de celui de Mg<sup>2+</sup> (72 pm), si bien qu'il pourrait y avoir substitution de Mg par Ni (Nalovic et Quantin, 1972; Manceau, 1984; Uren, 1992).

Certains minerais possèdent des accumulations importantes de nickel sous formes de sulfures (1 à 4 %), exploités généralement en profondeur, tel qu'au Canada, en Russie, et en Australie. Le second type d'accumulation résulte de l'altération des roches ultrabasiques (surtout péridotites) sous climat tropical humide (Uren, 1992). Le profil d'altération est alors caractérisé par une zone supérieure oxydée riche en oxydes de fer associés au nickel, et une zone inférieure riche en silicates nickelifères (appelés de façon générale garniérites (Faust, 1966, cité par Manceau, 1984), du nom de J. Garnier, qui a découvert ce minerai en Nouvelle-Calédonie en 1863). Des mines importantes de ce type (1 à 3 % en moyenne), en général à ciel ouvert, sont trouvées principalement en Nouvelle-Calédonie, en Indonésie, à Cuba, en République Dominicaine, aux Philippines, et au Brésil.

La majorité des sols cultivables en contiennent naturellement 1 à 390 ppm de nickel, avec une moyenne de 25 ppm (Holmgren *et al.*, 1993). Cependant, les sols dérivés des roches ultrabasiques, comme les péridotites et les serpentinites, peuvent en contenir plus de 7000 ppm (Brooks, 1987), voire jusqu'à 20 000 ppm (Latham *et al.*, 1978). Ainsi, le nickel est un des métaux lourds les plus répandus de façon naturelle dans les sols, et on retrouve des sols riches en nickel (> 1000 ppm) un peu partout dans le monde (Fig. 1.3).

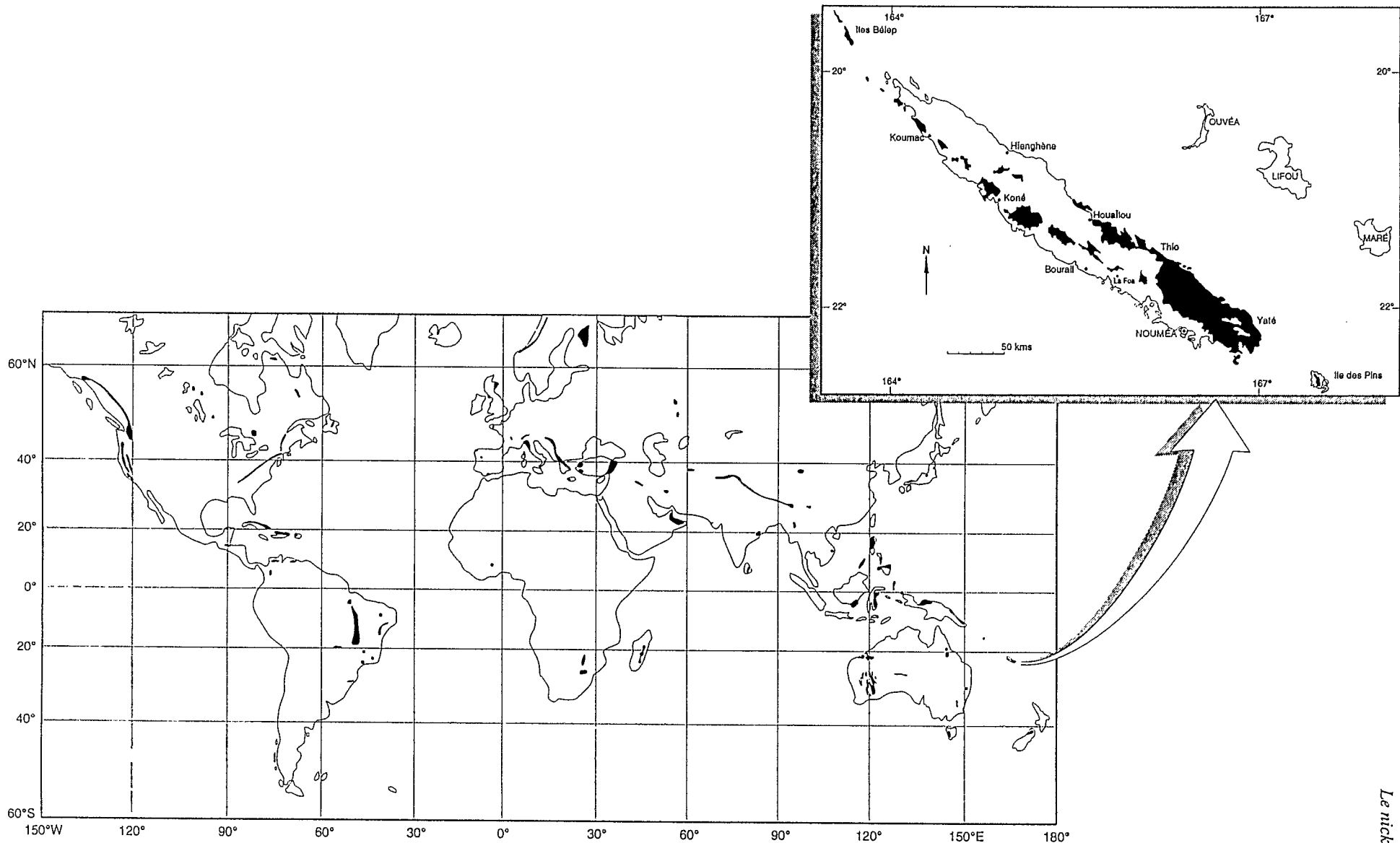


Fig. 1.3. Répartition des sols riches en nickel (> 0,1 %) dans le monde (positions et surfaces approximatives), et en Nouvelle-Calédonie. (D'après Boldt, 1967; Latham, 1978; Derry, 1980; Brooks, 1987).

Les eaux contiennent également du nickel provenant de l'altération de la roche, mais généralement en faible quantité. Le tableau 1.2 donne les concentrations moyennes trouvées dans l'environnement.

**Tableau 1.2. Concentrations en nickel rencontrée dans les sols, les eaux et l'atmosphère (d'après Anderson *et al.*, 1973; Brooks, 1987; W.H.O., 1991; Uren, 1992). (moyennes entre parenthèses).**

	Unité	Normal	Élevé
Sols cultivables	mg.kg <sup>-1</sup>	1-390 (25)	500-20 000
Solutions du sol	µg.l <sup>-1</sup>	10-90 (20)	100-3250
Eaux douces	µg.l <sup>-1</sup>	2-10	-
Eaux de mer	µg.l <sup>-1</sup>	0,2-0,7	-
Eaux de pluie	µg.l <sup>-1</sup>	0,17-17	> 50
Atmosphère	ng.m <sup>-3</sup>	0,1-3	-
Végétaux cultivés	µg.g <sup>-1</sup> MS	1-10 (5)	10-47 000

#### *Le cas de la Nouvelle-Calédonie*

Troisième producteur mondial en 1989 (96 000 t de nickel exporté), la Nouvelle-Calédonie constitue le plus gros gisement de minerai de nickel au monde (environ 25 % des réserves). La principale roche mère qui a donné naissance à ces sols est la péridotite (contenant environ 0,3 % de nickel), couvrant plus du tiers de la surface du Territoire. La mise en place de cette roche remonte à l'ère Tertiaire, à l'oligocène, où une énorme masse de péridotites issue du manteau supérieur a recouvert une grande partie du Territoire. Dès le Miocène, son altération sous climat tropical humide a provoqué une érosion chimique et mécanique intense aboutissant à la formation de sols très évolués (Guillon, 1975).

Le nickel est exploité au niveau des horizons d'altération (saproliques grossières) où se trouvent les plus fortes teneurs. En effet, selon Trescase (1975), l'altération des péridots a lieu dans des conditions de pH alcalin (8 à 8,5), le nickel précipitant alors sous forme d'hydroxyde Ni(OH)<sub>2</sub>. La plus grande partie du nickel est piégée dans le réseau maillé d'antigorite primaire (type de serpentine) à la base du profil (saproliques grossières), l'hydroxyde de nickel venant se loger dans les lacunes du maillage serpentineux. Au sommet de la saproliques grossière, l'altération de l'antigorite libère du nickel qui redescend vers la base, où il vient enrichir l'antigorite primaire, ce qui explique les teneurs en nickel souvent élevées à ce niveau (1 à 3 %, pouvant atteindre exceptionnellement 40 % dans certaines garnièrites, comme la népouite). Dans la partie supérieure du profil, le nickel est associé à la goethite (hydroxyde de fer), l'hématite (oxyde de fer) et à l'asbolane (oxydes de manganèse et de cobalt), à des teneurs avoisinant les 1 % (Nalovic et Quantin, 1972; Trescase, 1975; Schwertmann et Latham, 1986).

Les sols dérivés des roches ultrabasiques (surtout péridotites) représentent près de 30 % de la surface du territoire (Fig. 1.3; Latham *et al.*, 1978; Paris, 1981). Les principaux sont les sols ferrallitiques ferritiques représentant environ 5 % des surfaces cultivables. L'importance des oxydes de fer dans ces sols s'explique par l'intense lixiviation du magnésium et de la silice. En effet, Trescase (1975) a établi une échelle de mobilité relative des éléments au cours de l'altération des péridotites :  $Mg \gg Si > Ni > Mn, Co \gg Al > Fe, Cr$ , aboutissant à la formation de sols très riches en oxydes de fer, jusqu'à 75 % (Latham, 1985). Ces teneurs exceptionnelles ont d'ailleurs conduit Latham *et al.* (1978) à créer une sous-classe (ferritique) des sols ferrallitiques alors inexistante dans la classification française des sols (CPCS, 1967). Les sols ferrallitiques ferritiques ont également de très fortes teneurs en nickel (de l'ordre de 1 %), qui sont parmi les plus fortes au monde (Brooks, 1987).

### 1.2.2. Formes du nickel dans les sols

#### *Formes dans la solution du sol*

La forme ionique la plus stable du nickel est  $Ni^{2+}$ . Cette forme est majoritaire à des  $pH < 7$ , où il tend à exister sous forme hydratée  $Ni(H_2O)_6^{2+}$  (d'après Uren, 1992). Cependant, sa prédominance diminue quand le  $pH$  augmente (Fig. 1.4). A  $pH \geq 7$  une grande partie peut être complexée, essentiellement avec  $OH^-$ , ou avec des complexants solubles organiques ou inorganiques, formant ainsi des précipités ( $Ni(OH)_2$ ) ou des complexes solubles (acides organiques, carbonates, sulfates, ...).

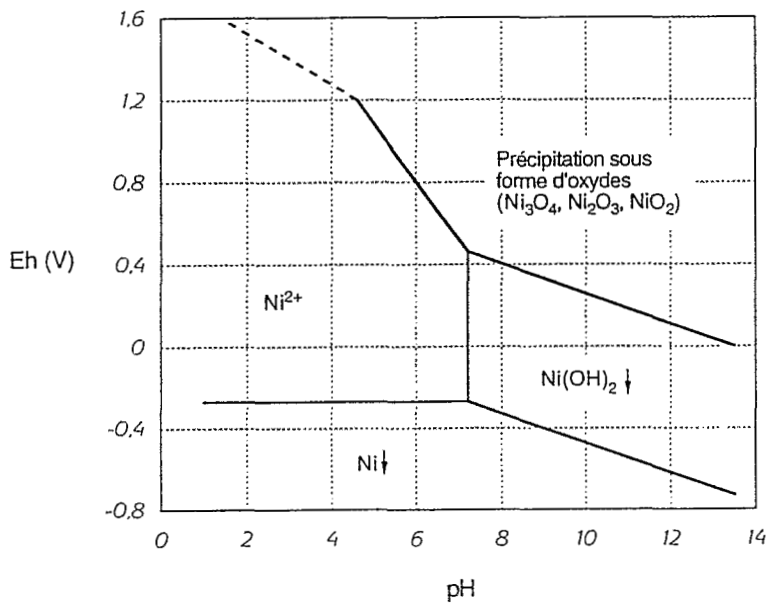


Fig. 1.4. Formes du nickel en solution en fonction du  $pH$  et des potentiels apparents des systèmes oxydo-réducteurs ( $Ni$  à  $10^{-2}$  M en solution aqueuse). (D'après Charlot, 1963).

A des pH > 7 les complexes de Ni semblent pouvoir se former facilement. Homer *et al.* (1991) rapportent qu'avec 3 mM de citrate et de nickel en solution à pH entre 6 et 7, 96 % du Ni est complexé au citrate sous forme  $[\text{Ni}(\text{Cit})]^-$ , le reste étant sous forme  $\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ .

Les complexes organiques formés avec Ni sont en règle générale d'une grande stabilité. En effet, selon la nature du complexant organique, on trouve les ordres de stabilité suivant :

-  $\text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+} \approx \text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ , avec la matière organique soluble d'une boue urbaine (Fletcher et Beckett, 1987);

-  $\text{Cu}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ , avec l'acide fulvique à pH 3,5 (Schnitzer et Skinner, 1967).

Ainsi, pour la plupart des complexants, leur constante de stabilité avec Ni est généralement comprise entre celles de Cu, Pb et Fe (complexes les plus stables), et celles de Mn, Ca et Mg (complexes les moins stables) (Irving et Williams, 1948; Uren, 1992).

La stabilité des complexes a tendance à diminuer lorsque le pH diminue.

#### *Formes dans la phase solide du sol*

Le nickel de la solution du sol représente une très faible partie de la quantité présente dans le sol. Le reste est distribué entre les phases organique et inorganique insolubles, qui constituent la phase solide du sol.

Dans la phase inorganique du sol, une grande partie du nickel est associée aux hydroxydes de fer et de manganèse, et aux phyllosilicates trioctaédriques (tels que les serpentines, la vermiculite) (d'après Uren, 1992). Il est possible que le nickel soit substitué au fer dans les oxy-hydroxydes de fer (Nalovic et Quantin, 1972; Singh et Gilkes, 1992).

Les associations du nickel avec la matière organique peuvent constituer une part non négligeable du nickel dans la phase solide du sol. Il semble qu'il soit lié en quantité relativement importante aux humines, car les acides humiques et fulviques, solubles, ne représentent qu'une partie mineure du nickel lié à la matière organique (Cheshire *et al.*, 1977, cité par Uren, 1992). Les microorganismes du sol peuvent également fixer des quantités importantes de Ni, et libérer de multiples molécules complexantes dans le milieu (Wildung *et al.*, 1979), telles que les porphyrines et l'uréase qui forment des complexes très stables (d'après Uren, 1992).

Par extraction séquentielle (§ 1.2.3), Wang et Qu (1992) ont montré que Ni était réparti de la façon suivante dans un loess : 70 % dans le résidu (inattaquable par les extractants employés), 20 % lié aux oxydes de Fe et Mn, 5 % lié à la matière organique, 4 % lié aux carbonates, 2 % sous forme échangeable.

### **1.2.3. Biodisponibilité du nickel dans les sols**

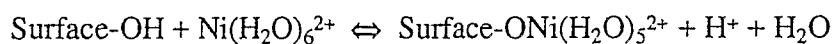
La biodisponibilité d'un élément du sol pour la plante est souvent associée à l'échangeabilité, l'assimilabilité, la disponibilité... En fait, il semble qu'il faille distinguer deux

concepts (Juste, 1988) : (1) la mobilité, aptitude de l'élément à passer dans les compartiments du sol où il est de moins en moins énergiquement retenu, (2) la biodisponibilité, aptitude à être absorbé par un organisme vivant à partir d'un compartiment quelconque du sol.

Les racines puisant les éléments préférentiellement dans la solution du sol, tous les facteurs favorisant une solubilisation du nickel sont donc susceptibles de favoriser son absorption racinaire. Cependant, la solubilisation de Ni n'est pas totalement suffisante pour permettre son absorption, car certains complexes de Ni sont solubles mais peu absorbés. En fait, l'absorption d'un élément est étroitement liée à son activité ionique dans la solution. Celle-ci peut augmenter par un accroissement de la concentration de Ni en solution, et/ou par une diminution de la concentration des autres éléments ou des complexants présents dans la solution.

### *Facteurs d'influence*

L'absorption de Ni dépend des formes sous lesquelles il existe dans le sol. Le pH est très certainement le facteur d'influence le plus important (Anderson et Christensen, 1988). En effet,  $\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$  est présent à des  $\text{pH} \leq 7$  (§ 1.2.2), et plusieurs études ont montré, à l'aide d'extractants, que la rétention du nickel par le sol diminue fortement quand le pH diminue (Harter, 1983; Willaert et Verloo, 1988; Basta et Tabatabai, 1992). La réaction de Ni avec les surfaces du sol, principalement avec les groupements -OH, est en effet la suivante (Tinker, 1986) :



Une augmentation du nombre de protons déplace donc la réaction vers la gauche.

Plusieurs études ont ainsi montré qu'une diminution du pH favorise une absorption du nickel par la plante (Halstead *et al.*, 1969; Allinson et Dzialo, 1981; Sauerbeck et Hein, 1991; Lübben et Sauerbeck, 1991). Selon Mizuno (1968), des valeurs de pH du sol inférieures à 5,6 augmentent fortement l'absorption du nickel. Ainsi, Crooke (1956) a observé qu'un chaulage améliore la croissance de plants d'avoine cultivés sur serpentinites. Wallace (1989a, b, c) a montré qu'un chaulage diminue l'absorption de Ni chez le maïs, le soja et le haricot.

En règle générale, l'absorption des métaux lourds, en culture sur solution, est plus élevée quand ils sont sous forme ionique libre que sous forme complexée (De Kock et Mitchell, 1957; Wallace, 1980). Ainsi, Gerzabek et Ullah (1990) ont clairement montré, sur le maïs cultivé sur solution à pH 6, que les acides fulviques fixent Ni plus fortement que les acides humiques, et qu'ils diminuent très nettement l'absorption de Ni par le maïs contrairement aux acides humiques. En revanche, dans les sols, la mobilité et l'absorption du nickel est plus élevée quand Ni est sous forme complexée que sous forme libre (Wallace, 1980; Willaert et Verloo, 1988). Toutefois, il semble que l'absorption diminue quand le rapport complexant / Ni dans le sol augmente (d'après Uren 1992). Dunemann *et al.* (1991) ont montré que l'absorption de Ni par l'avoine variait en fonction des différents complexes



présents dans la solution de différents sols, les complexes chargés négativement et de poids élevé étant les moins absorbés.

Dans l'étude de Wang et Qu (1992), le nickel lié aux oxydes de fer et de manganèse a constitué la source majeure de nickel assimilable dans un loess.

Bien que le calcium et la magnésium soient retenus moins fortement que le nickel sur la matière organique du sol (§ 1.2.2), leur quantité dans la solution du sol est généralement très supérieure à celle du nickel, si bien qu'ils peuvent entrer en compétition avec Ni pour des sites de fixation, et en déplacer une partie vers la solution (Fletcher et Beckett, 1987). Cependant, du fait des concentrations en Ca et Mg généralement très supérieures à celle de Ni, l'activité ionique de celui-ci peut rester faible.

Le potentiel rédox constitue également un facteur important. Les conditions réductrices peuvent favoriser une solubilisation du nickel fixé : a) en réduisant et en solubilisant les oxydes de Fe et de Mn, libérant alors du nickel, b) en favorisant la formation d'acides complexants solubles, pouvant être absorbés par la plante lorsqu'ils sont de faible poids. Ainsi, il a été montré que Ni est davantage absorbé par les plantes en conditions réductrices (Brown *et al.*, 1989; Wang et Qu, 1992).

### *Estimation*

La plante est le meilleur révélateur de la biodisponibilité d'un élément. Cependant, son impossibilité à fournir des résultats immédiats, et les différences de sensibilité suivant les espèces, ont incité le développement de méthodes chimiques, permettant l'évaluation rapide de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments traces du sol. Les réactifs chimiques utilisés pour évaluer le nickel disponible sont très divers. Généralement, l'extraction chimique est corrélée avec les quantités prélevées par une plante, afin de préciser la validité du dosage.

L'extraction à l'eau distillée semble donner la meilleure estimation de la quantité de Ni absorbée, de même que l'acide acétique (Haq *et al.*, 1980). Cependant ces méthodes sont généralement faiblement corrélées avec la teneur en Ni dans la plante.

Le nickel extrait par le DTPA 5 mM à pH 7,3 a donné une très bonne corrélation ( $r = 0,92$ ) avec les teneurs en Ni dans les grains d'un blé, sur sol calcaire (Wang et Qu, 1992). L'intérêt du test au DTPA, mis au point par Lindsay et Norvell (1978), a été confirmé par d'autres études (McLean et Dekker, 1978; Sauerbeck et Hein, 1991; Juste et Tauzin, 1992).

Mench *et al.* (1992) ont extrait le nickel de boues urbaines avec : eau distillée,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0,1 M,  $\text{CaCl}_2$  0,1 M, HCl 0,1 M, EDTA pH 7. Les meilleures corrélations avec les teneurs en Ni dans les feuilles du maïs cultivé sur le même sol sont obtenues avec  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  et l'eau distillée ( $r > 0,9$ ). Sauerbeck et Hein (1991) ont constaté que les meilleures corrélations, par rapport aux teneurs en Ni dans les racines ou les feuilles de carotte cultivée sur un sol amendé avec des boues de station d'épuration, sont obtenues avec  $\text{CaCl}_2$  0,05 M,  $\text{CuCl}_2$  0,025 M et le DTPA 5mM+TEA+ $\text{CaCl}_2$ .

Hughes et Noble (1991) ont caractérisé la disponibilité du nickel sur différents sols dérivés de serpentinite, en utilisant plusieurs extractants. Il ressort que les extractants les mieux corrélés avec les teneurs en Ni des feuilles de la végétation du site sont l'acide acétique, l'acétate d'ammonium,  $\text{CuCl}_2$ , EDTA et  $\text{AlCl}_3$ . Cependant, il existe de fortes variations suivant l'origine du site, si bien qu'aucun extractant ne semble adapté à l'ensemble des sols sur serpentinite.

Certains auteurs utilisent des extractions séquentielles (extractants de force croissante) pour caractériser les formes du nickel dans le sol, et déterminer lesquelles sont les mieux corrélées avec l'absorption de Ni. Ainsi, Wang et Qu (1992) ont utilisé sur un sol calcaire (loess) : (1)  $\text{MgCl}_2$  1 M à pH 7 (Ni échangeable), (2) acétate de sodium 1 M à pH 5 sur le résidu (Ni lié aux carbonates), (3)  $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$  0,04 M dans l'acide acétique à 25 % sur le résidu (Ni lié aux oxydes de Fe et Mn), (4)  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 % à pH 2 sur le résidu (Ni lié à la matière organique), (5) le résidu final est traité par  $\text{HClO}_4\text{-HNO}_3\text{-HCl}$ . Il ressort que les meilleures corrélations avec les teneurs en Ni dans les grains d'un blé, cultivé sur sols calcaires, sont obtenues avec le Ni lié aux oxydes de Fe et Mn (0,9), avec Ni lié à la matière organique (0,83), et Ni lié aux carbonates (0,78). Il semble également que la matière organique soit la fraction la plus importante pour la disponibilité de Ni sur les sols issus de serpentinites dans le Transvaal (Hughes et Noble, 1991).

Noble et Hughes (1991) ont constaté que l'efficacité des méthodes d'extraction dépend du type de plante avec laquelle elles sont corrélées. En effet, sur sols issus de serpentinite, les végétaux accumulent de fortes quantités de Ni dans leurs tissus, et semblent puiser du nickel du sol dans des fractions considérées habituellement comme non disponibles. Dans ce cas, les extractants utilisés habituellement n'étaient pas efficaces pour doser le nickel échangeable.

Des auteurs ont discuté de l'intérêt et des limites des méthodes d'extraction chimiques destinées à évaluer la mobilité des métaux dans les sols et leur biodisponibilité (Juste, 1983; Juste, 1988; Hirner, 1991; del Castilho, 1993). Ure *et al.* (1993) proposent une harmonisation des diverses techniques d'extraction.

Des programmes informatiques de calcul des équilibres chimiques, tel que GEOCHEM (Sposito et Mattigod, 1980), ont été écrits dans le but de prédire les formes et les activités des éléments dans la solution du sol. Ils peuvent être des outils efficaces pour évaluer la disponibilité des métaux dans un sol.

#### 1.2.4. Effets du nickel sur l'homme

D'après l'étude de l'OMS (W.H.O., 1991), bien que tous les composés contenant du nickel soient probablement cancérigènes, il n'y a pratiquement aucun risque détectable dans la plupart des secteurs de l'industrie du nickel et dans leur environnement. Des inhalations à long terme à  $1 \text{ mg.m}^{-3}$  de nickel contenu dans l'air sous forme soluble pourraient causer

l'apparition de cancers des poumons, mais de telles conditions ne sont quasiment jamais atteintes. Cependant, une période de latence de 20 à 40 ans est nécessaire avant l'apparition de tels cancers, si bien qu'il y a peu d'informations sur les niveaux d'exposition à risque (Norseth, 1994). Des effets néphrotoxiques ont été observés dans des cas d'exposition industrielle accidentelle à du carbonyle de nickel (une des formes de Ni les plus toxiques, car volatile et rapidement absorbé au niveau des poumons). On a signalé chez les ouvriers d'ateliers d'affinage du nickel des effets chroniques tels que rhinite, sinusite et asthme. Par ailleurs, l'hypersensibilité de contact est très largement documentée tant dans la population générale que chez les ouvriers exposés au nickel dans leur profession (W.H.O., 1991).

Il semble qu'une absorption alimentaire de nickel présente également peu de risques, l'homme étant capable de l'éliminer assez rapidement. Dans l'organisme, la plus grande quantité du nickel absorbé se lie à l'albumine dans le sang, bien qu'il ait plus d'affinité pour l'acide aminé L-histidine (mais qui est moins abondant). Des échanges entre l'albumine et la L-histidine permettent l'élimination progressive du nickel par les urines sous forme liée à l'acide aminé (W.H.O., 1991).

### 1.2.5. Effets du nickel sur les plantes

#### *Ni essentiel pour les plantes ?*

Depuis une vingtaine d'années, plusieurs travaux tendent à prouver que le nickel est un élément essentiel au développement des végétaux supérieurs. Dixon *et al.* (1975) sont les premiers à avoir montré, sur le haricot, que Ni est constituant essentiel de l'uréase (E.C. 3.5.1.5). En effet, de l'urée s'accumule dans les feuilles à des niveaux toxiques en l'absence de nickel, et l'addition de Ni au milieu de culture permet d'éviter tout symptômes de déficience. Cela a été confirmé par la suite sur le soja, l'orge, et d'autres plantes (Eskew *et al.*, 1983; Dalton *et al.*, 1988). L'absence de nickel perturbe le cycle complet de l'orge, et empêche la production de grains (Brown *et al.*, 1987). Ces résultats, de plus en plus nombreux, poussent plusieurs auteurs à conclure que le nickel doit être maintenant considéré comme un élément essentiel au développement de toutes les plantes supérieures (Brown *et al.*, 1987; Dalton *et al.*, 1988). Il semble que les teneurs en nickel dans les sols soient toujours suffisantes pour qu'une plante ne soit jamais déficiente en nickel.

De nombreux travaux ont montré récemment que le nickel est également nécessaire à l'activité de plusieurs enzymes bactériennes : l'uréase, l'hydrogénase, la carbone monoxyde dehydrogénase, et la méthylcoenzyme M réductase (d'après Dalton *et al.*, 1988; Maier *et al.*, 1990).

Par ailleurs, l'étude de Graham *et al.* (1985) suggère que Ni intervient dans la synthèse des phytoalexines. En effet, ils ont montré sur une légumineuse (cowpea : *Vigna unguiculata*) qu'une déficience en nickel induit une sensibilité à la rouille, alors que l'addition de Ni au milieu de culture diminue très nettement l'attaque foliaire du champignon.

### *Les effets toxiques du nickel sur les plantes*

Autant les études sur la nécessité du nickel pour les végétaux sont récentes et nombreuses, autant la phytotoxicité de Ni est connue depuis longtemps et bien documentée. L'étude de Nellessen et Fletcher (1993) montre que Ni fait partie des métaux les plus étudiés. Il semble en effet que ce soit un des métaux qui pose le plus fréquemment des problèmes de phytotoxicité (Foy *et al.*, 1978; Angelone et Bini, 1992).

La toxicité du nickel sur serpentinites a suscité de nombreuses études (Soane et Saunder, 1959; Anderson *et al.*, 1973; Hughes et Noble, 1991).

Cependant, de nombreuses caractéristiques restent encore à préciser, tel que la biodisponibilité du nickel, en particulier dans les sols ferrallitiques ferritiques de Nouvelle-Calédonie, les seuils de phytotoxicité du nickel, les mécanismes de l'intoxication d'une plante par Ni, ou encore les mécanismes de tolérance d'une plante vis à vis de Ni.

Nous proposons de faire le point dans le paragraphe suivant sur les caractéristiques de l'intoxication des végétaux, les caractéristiques de l'absorption de Ni, les mécanismes de la phytotoxicité, et les moyens dont disposent les végétaux pour lutter contre les excès de nickel.

## **1.3. PHYTOTOXICITÉ DU NICKEL**

La toxicité du nickel sur le développement des plantes a été signalée pour la première fois par Haselhoff (1893). Depuis, un grand nombre de travaux sur le sujet ont été réalisés (voir Mishra et Kar, 1974). Ce paragraphe fait le point sur les caractéristiques de l'absorption du nickel, les effets toxiques, les mécanismes de toxicité, et les moyens de résistance des végétaux vis à vis du nickel.

Le sujet de l'étude concernant uniquement les plantes cultivées, nous n'aborderons pas le problème particulier des plantes autochtones (souvent endémiques) qui sont adaptées aux sols riches en nickel, à part dans le dernier paragraphe sur les mécanismes de résistance.

### **1.3.1. Absorption de Ni**

#### *Formes absorbées et transportées*

Il semble que  $\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$  soit la principale forme sous laquelle Ni est absorbée par les racines des végétaux (Mishra et Kar, 1974; Tinker, 1986). De nombreuses études montrent en effet que Ni est absorbé facilement quand il est apporté sous forme libre (sel), et beaucoup moins quand il est complexé (Crooke, 1954; De Kock et Mitchell, 1957; Wallace, 1980; Dünemann *et al.*, 1991).

Il y a peu de données concernant les formes sous lesquelles Ni est transporté des racines vers les feuilles. Tiffin (1971) a étudié le transport du nickel dans le xylème de la tomate, du maïs, du concombre, de la carotte et de l'arachide. Chez la tomate et la maïs, à une

concentration physiologique dans le xylème ( $< 3 \mu\text{M}$ ), Ni était transporté principalement sous forme d'un complexe chargé négativement, alors qu'à des concentrations supérieures la forme  $\text{Ni}^{2+}$  augmentait considérablement. Chez le concombre, la carotte et l'arachide, Ni était transporté sous forme d'un complexe chargé négativement à toutes les concentrations testées (0,5 à  $50 \mu\text{M NiCl}_2$ ). Le transporteur semblait être le même pour les différentes plantes. Bien qu'il n'ait pas été caractérisé, le fait que le complexe n'était pas dissocié lors de l'électrophorèse à pH 5,4 suggère une grande stabilité. Cataldo *et al.* (1988) ont montré sur le soja que Ni était associé à plusieurs complexes différents dans le xylème : des acides organiques, des acides aminés et des peptides. Par ailleurs, leur nombre et leur nature variaient avec l'âge du plant.

Ni semble être relativement mobile dans le phloème (Neumann et Chamel, 1986). Il semble qu'il soit généralement transporté sous forme complexée, étant donné le pH basique du phloème. Wiersma et Van Goor (1979) ont montré sur le ricin que  $^{63}\text{Ni}$  était complexé avec un composé organique de 1000 à 5000 Da, le complexe étant chargé négativement. Selon Stephan et Scholz (1993), la nicotianamine pourrait être un transporteur pour l'ensemble des métaux dans le phloème.

Willaert et Verloo (1988) ont également montré sur des broyats d'épinard que Ni est associé à des complexes neutres ou chargés négativement.

Dans la cellule, Cataldo *et al.* (1978b) ont montré sur le soja que Ni était situé principalement dans le cytoplasme, 77 % étant associé à des composés de 500 à 10 000 Da, sous forme de complexes anioniques et cationiques.

### *Caractéristiques de l'absorption*

Selon Turina (1968), l'absorption du nickel chez les monocotylédones (seigle, blé et maïs) a lieu principalement au travers de la coiffe de la racine.

Plusieurs résultats suggèrent que  $\text{Ni}^{2+}$  est absorbé activement à travers le plasmalemme (Verlière et Heller, 1981; Körner *et al.*, 1986; Aschmann et Zasoski, 1987). En effet, le froid et le 2,4-dinitrophénol, inhibiteurs du métabolisme, diminuent les quantités de Ni absorbées.

Cataldo *et al.* (1978a) ont suggéré que l'absorption de  $\text{Ni}^{2+}$  chez le soja se produit au niveau du même transporteur que pour  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ . Selon Gabbrielli *et al.* (1991), il existe chez *Alyssum bertolonii* une inhibition compétitive de l'absorption de Ni par Zn et Co, suggérant un site d'absorption commun pour ces trois métaux. Ni et Cu seraient également en compétition pour leur absorption par le riz (Tang et Miller, 1991).

### *Facteurs influençant l'absorption de Ni*

En plus des facteurs influençant la biodisponibilité de Ni en modifiant ses formes dans le sol (cf. § 1.2.3), et sur lesquels nous ne reviendrons pas, d'autres peuvent intervenir en agissant directement au niveau des sites d'absorption.

De nombreuses études montrent que les amendements calciques diminuent l'absorption des métaux lourds (Morel *et al.*, 1988). Heikal *et al.* (1989a) ont montré que les 50 % d'inhibition de la croissance racinaire de la laitue par 15  $\mu\text{M}$  de Ni en solution de Hoagland diluée 10 fois, étaient quasiment évités avec l'addition de 50 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Un apport de CaO a diminué la teneur en Ni des grains de maïs de 7,5 à 4,5  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MS (Bonzon *et al.*, 1991b).

Un apport de magnésium diminue également l'absorption de Ni. Par exemple, avec l'avoine cultivé sur solution complète, la diminution de la croissance observée avec 25  $\mu\text{M}$  de Ni (- 60 %) disparaît presque totalement avec 5 mM de magnésium (Proctor et Mc Gowan, 1976). Sur le maïs, le ralentissement de la croissance racinaire (50 % en deux jours avec 2  $\mu\text{M}$  de Ni dans l'eau) est évitée avec 2,5 mM de Mg, ou 25 mM de Ca (Robertson, 1985). Dans ce cas Mg est plus efficace que Ca. Par contre, dans l'étude de Gabbrielli et Pandolfini (1984) sur *Alyssum bertolonii*, Ca est plus efficace que Mg à 1 mM. Il est possible que la réponse à un apport de Ca ou Mg diffère selon l'espèce.

La diminution de la toxicité par l'apport de Ca ou Mg peut-être dû à : (1) une diminution de l'activité de  $\text{Ni}^{2+}$  par augmentation de la force ionique du milieu, (2) un effet physiologique direct, telle qu'une compétition entre  $\text{Ca}^{2+}$  (ou  $\text{Mg}^{2+}$ ) et  $\text{Ni}^{2+}$  pour des sites d'absorption membranaires. Kinraide et Parker (1987) ont montré que le 2<sup>e</sup> mécanisme est prédominant entre Al et Ca.

Des interactions existent également entre Ni et des métaux. Taylor et Stadt (1990) ont montré l'existence d'un antagonisme entre Ni et Mn, celui-ci diminuant la toxicité de Ni sur la croissance racinaire du blé. Les effets toxiques de Ni, Cu et Zn chez l'orge semblent être additifs (Beckett et Davis, 1978). Par contre, il semble y avoir un effet toxique synergique entre Ni, Co et Zn, ainsi qu'entre Ni et Cu chez la laitue (Wallace et Berry, 1989a, b). Ainsi, les interactions entre les métaux sont souvent multiples et complexes, comme entre Zn et Ni, dépendant notamment de leur concentration (Burton *et al.*, 1986; Berry et Wallace, 1989).

### 1.3.2. Symptômes de toxicité du nickel, et effets sur le développement de la plante

#### *Symptômes de toxicité*

Un des premiers effets toxiques du nickel au niveau des parties aériennes se manifeste par un ralentissement de leur croissance, ce qui est très difficile à remarquer en plein champ. Cependant, certains symptômes de toxicité peuvent apparaître.

Il ne semble pas exister de symptômes de toxicité spécifique au nickel, excepté pour l'avoine. Dans ce cas, des chloroses en bandes transversales se manifestent sur la première feuille 24 heures après l'émergence du coléoptile. L'alternance du jour et de la nuit est nécessaire pour le développement de cette chlorose en bandes. Les zones potentiellement vertes se développent dans le coléoptile durant le jour, alors que les bandes potentiellement chlorosées se développent la nuit (Anderson *et al.*, 1973, 1979). Les mêmes symptômes furent observés par Crooke et Inkson (1955).

A part l'avoine, la toxicité se manifeste chez les monocotylédones souvent par de faibles chloroses foliaires longitudinales. Dans des cas plus sévères, les chloroses peuvent être plus prononcées, et des nécroses sur le bord des feuilles peuvent apparaître. Chez les dicotylédones les symptômes sont en général des chloroses en tâches, souvent entre les nervures foliaires, ressemblant aux symptômes de déficience en manganèse (Hewitt, 1953; Vanselow, 1966; Mishra et Kar, 1974). Des déformations des tiges et des feuilles peuvent apparaître, ainsi qu'un épaissement des feuilles (Frank *et al.*, 1982). Chez le haricot, un des premiers effets toxiques du nickel se manifeste par une orientation verticale anormale des feuilles (Rauser, 1978).

Des auteurs ont observé que la toxicité du nickel ressemble beaucoup à une déficience en fer (Hewitt, 1948; Vergnano et Hunter, 1953).

#### *Développement de la plante*

D'une manière générale, la croissance des racines est davantage inhibée que celle des parties aériennes (Barceló et Poschenrieder, 1990; Piccini et Malavolta, 1992; Rubio *et al.*, 1994).

Le nickel en excès ralentit également la croissance des parties aériennes. Setia *et al.* (1988) ont observé une diminution de la longueur des entre-noeuds et de l'épaisseur des feuilles chez le blé. Il semble que la croissance des feuilles soit davantage diminuée que celle des tiges (Estañ *et al.*, 1988; Salim *et al.*, 1988).

L'inhibition de la croissance des parties aériennes aboutit généralement à une forte diminution, voire un arrêt de la production de la plante (Frank *et al.*, 1982). De plus, il semble que la diminution du poids des fruits, ou des grains, soit supérieure à la diminution du poids des tiges et des feuilles (Estañ *et al.*, 1988; Salim *et al.*, 1988; Piccini et Malavolta, 1992).

### **1.3.3. Effets du nickel sur la nutrition minérale**

Selon Crooke et Inkson (1955), de fortes concentrations en nickel dans le milieu de culture diminuent l'absorption de la plupart des éléments majeurs. Cette réduction de l'absorption serait due à une dégradation du système racinaire (Knight et Crooke, 1956).

Crooke (1958) a constaté une diminution de l'assimilation du calcium chez le pois. Ni diminuerait également l'absorption de Ca, Mg et K chez le riz (Rubio *et al.*, 1994). Par ailleurs, Hewitt (1953) a observé des symptômes de déficience en manganèse sur les feuilles de tomate et de pomme de terre, et Estañ *et al.* (1988) ont constaté, sur le piment doux, une diminution des teneurs en Mn et Zn dans les feuilles, et en Fe, Cu, Mn, et Zn dans les racines.

Cependant, ces études ne tiennent généralement pas compte des différences de développement entre les plants témoins et les plants intoxiqués, qui sont des sources de grandes variations dans les teneurs minérales de la plante.

Les chloroses observées en présence d'excès de nickel pourraient être induites par une déficience en fer. En effet, Ni diminue la teneur totale en fer chez l'orge (Forster, 1954) et l'avoine (Roth *et al.*, 1971). Cependant, il semble que ce ne soit pas toujours le cas, puisque Crooke et Knight (1955) ont observé que la teneur totale en fer varie peu dans des plants d'avoine montrant des symptômes de toxicité dus au nickel. Dans ce cas, seules les zones chlorosées ou nécrosées étaient carencées en fer (Crooke et Knight, 1955). Selon Crooke *et al.* (1954), les chloroses produites par le nickel et d'autres métaux lourds seraient dues à une réduction de la disponibilité du fer dans le tissu. Par ailleurs, il apparaît que les carences en fer sont souvent dues à une masse racinaire déficiente (d'après Uren, 1992).

#### 1.3.4. Teneurs en nickel dans la plante. Seuils de phytotoxicité

##### *Teneurs normales*

Les teneurs en Ni des végétaux supérieurs varient habituellement de 0,05 à 5,0  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de matière sèche (Vanselow, 1966; Keeney et Walsh, 1975; Hutchinson, 1981).

##### *Teneurs toxiques*

Pour les raisons citées plus haut (§ 1.2.3), il est très difficile de définir une limite toxique en solution ou dans le sol, et la comparaison des différents résultats trouvés dans la littérature a peu de sens tant les conditions de culture sont différentes. Il est possible qu'un seuil toxique en terme d'activité en solution puisse être défini, mais il semble qu'aucune étude n'ait été faite pour le nickel, contrairement à l'aluminium (Alva *et al.*, 1986; Wheeler *et al.*, 1992).

Vanselow (1966) a suggéré que des teneurs en nickel dans les tissus supérieures à 50  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MS pouvaient être considérées comme excessives. Ainsi, des symptômes de toxicité apparaissent sur de jeunes *Citrus* contenant 55  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MS de Ni dans leurs feuilles. Selon Kabata-Pendias et Pendias (1992), les seuils de toxicité chez les plantes non tolérantes se situent entre 10 et 30  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MS.

Cependant, le seuil de tolérance au-delà duquel se manifeste l'intoxication varie beaucoup selon les espèces, et même selon les variétés. Ainsi, dans une étude où plusieurs plantes ont été cultivées sur un sol riche en nickel, Hunter et Vergnano (1952) ont constaté que : (1) l'orge était la plante la moins affectée, (2) le blé, le haricot et l'ivraie étaient peu affectés, (3) l'avoine, la pomme de terre, le navet, et le chou étaient fortement affectés, (4) la betterave était la plante la plus affectée. Les teneurs en nickel dans ces plantes étaient en accord avec l'intoxication, l'orge et le blé absorbant peu de Ni (3 à 4  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MS), alors que les autres avaient des teneurs beaucoup plus élevées (de 40 à 100  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MS dans les feuilles).



Tableau 1.3. Teneurs en nickel toxiques dans la plante.

Plante	Stade	Teneur ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS)	Effets	Référence
aubergine	4 mois	27 (F)	- 16 % PS plant	Salim <i>et al.</i> (1988)
avoine	adulte	42 (F)	RC	Hunter et Vergnano (1952)
	110 j	>28 (Pa), >60 (Gr)	RC	Halstead <i>et al.</i> (1969)
	adulte	88 (PA)	37 % RC	Anderson <i>et al.</i> (1973)
blé	23 j.	25 (F) et 500 (R)	- 10 % PS F et - 20 % PS R	Taylor (1988)
<i>Citrus</i>	ns	55 (F)	toxique	Vanselow (1966)
haricot	75 j.	47 (F)	20 % RC et - 60 % poids Gr	Piccini et Malavolta (1992)
luzerne	83 j.	44 (PA)	RC	Halstead <i>et al.</i> (1969)
maïs	ns	19 (F)	Chlo et RC	Soane et Saunders (1959)
	18 j.	8,4 (PA)	- 6 % PS PA	Wallace (1989a)
orge	témoin au stade 5 F	11,3 (PA)	Teneur critique	Beckett et Davis (1977)
		12 (11 à 19) (PA)	Teneur critique	Davis et Beckett (1978)
ray-grass ( <i>Lolium perenne</i> )	F témoin 12-15 cm.	14 (PA)	Teneur critique	Davis et Backet (1978)
	4 sem.	154 (PA)	Chlo et 14 % RC	Khalid et Tinsley (1980)
	F témoin 25 cm.	90 (PA)	Teneur critique	Davis et Carlton-Smith (1984)
soja	18 j.	13 (F)	-22 % PS PA	Wallace (1989a)
		42 (F)	-52 % PS PA	

F : feuilles; Gr : grains; PA : parties aériennes; Pa : paille; R : racines.

Chlo : chloroses; PS : poids sec; RC : ralentissement de la croissance.

ns : non spécifié.

D'autre part, Sauerbeck et Hein (1991) ont distingué quatre types de plantes : (1) celles qui absorbent peu de Ni et qui ne manifestent pas de toxicité : blé de printemps, orge, moutarde et colza, (2) celles qui absorbent des quantités intermédiaires de Ni et qui manifestent parfois une toxicité : épinard, laitue, carotte et avoine, (3) celles qui absorbent beaucoup de Ni et qui sont sévèrement intoxiquées : haricot, radis et maïs doux, (4) celles qui absorbent beaucoup de Ni sans manifester de toxicité : ivraie. De plus, Piccini et Malavolta (1992) ont constaté une différence de sensibilité importante entre deux cultivars de haricot.

Le tableau 1.3 montre que les teneurs toxiques dans les végétaux varient fortement selon l'espèce végétale.

Par ailleurs, la teneur en nickel peut varier durant la croissance de la plante (Crooke et Knight, 1955; Guha et Mitchell, 1966). La définition d'une teneur toxique devrait par conséquent tenir compte du stade de développement de la plante.

L'avoine est souvent utilisée pour tester le potentiel de toxicité d'un sol, car c'est une plante relativement sensible au nickel, et manifestant des symptômes de toxicité reconnaissables (cf. § 1.3.2).

Les seuils de toxicité en solution, en culture hydroponique sur milieu nutritif complet, varient de quelques  $\mu\text{M}$  à quelques dizaines de  $\mu\text{M}$  de Ni, dépendant surtout de la force ionique du milieu et de l'espèce cultivée (Rausser, 1978; Robertson, 1985; Heikal *et al.*, 1989a; Wallace et Abou-Zamzam, 1989; Piccini et Malavolta, 1992; Krupa *et al.*, 1993; Moya *et al.*, 1993; Xyländer *et al.*, 1993).

Le nickel semble être un des métaux les plus phytotoxiques. En effet, Juste *et al.* (1989) ont montré que Ni et Cd, utilisés à la même concentration, avaient des effets toxiques comparables sur le maïs. Il en serait de même pour Ni et Cu chez l'orge et le ray-grass (Beckett et Davis, 1977; Davis et Beckett, 1978). Certains auteurs ont proposé une modélisation de la phytotoxicité des métaux en utilisant la fréquence de distribution de Weibull (Taylor *et al.*, 1991). Ainsi, l'ordre décroissant de toxicité sur le blé serait : Cd > Cu > Ni > Al > Mn > Zn.

#### *Répartition dans la plante*

Les racines sont en règle générale l'organe privilégié d'accumulation du nickel, avec environ 80 à 90 % du Ni de la plante (Cataldo *et al.*, 1978b; Taylor, 1988; Wallace, 1989d; Lübben et Sauerbeck, 1991; Sauerbeck et Hein, 1991). En général, Zn, Cd, Mn, Fe, Se et Mo sont rapidement transportés vers les parties aériennes, tandis que Cu, Ni, Co, Pb et Cr sont retenus dans les racines (d'après Mench *et al.*, 1992).

Au niveau des parties aériennes, les grains contiendraient généralement davantage de nickel que les feuilles, et celles-ci davantage que les tiges (Hunter et Vergnano, 1952; Crooke et Knight, 1955; Sauerbeck et Hein, 1991; Mench *et al.*, 1992). Ainsi, Lübben et Sauerbeck (1991) ont constaté que les teneurs étaient 40 fois plus forte dans les grains que dans la paille

d'un blé (6,5 contre 0,15  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MS). Cataldo *et al.* (1978b) ont montré sur le soja, en suivant la migration de Ni radioactif, que le nickel des racines migre presque en totalité vers les grains, et très peu vers les tiges et les feuilles.

Le nickel est relativement mobile dans la plante, et les teneurs ont tendance à évoluer avec son développement. Ainsi, les jeunes feuilles d'avoine en contiennent plus que les feuilles âgées (Hunter et Vergnano, 1952; Crooke et Knight, 1955). Neumann et Chamel (1986) ont en effet nettement mis en évidence, chez le pois et le géranium, un transport de  $^{63}\text{Ni}$  dans le phloème, à partir des feuilles vers les tissus puits.

Mesjasz-Przybylowicz *et al.* (1994) ont montré, sur une espèce autochtone d'Afrique accumulant le nickel (*Senecio coronatus*), que Ni est localisé essentiellement au niveau de l'épiderme des feuilles, puis dans l'épiderme des tiges, et au niveau du rhizoderme.

Au niveau cellulaire, Ni est souvent situé en majorité dans le cytoplasme. Ainsi, Cataldo *et al.* (1978b) ont observé que plus de 90 % du Ni des racines et des feuilles de soja était associé à la fraction cytoplasmique, le reste étant associé surtout aux parois cellulaires (6 % dans les feuilles, 7,6 % dans les racines). Cependant, Ni semble pouvoir se lier aux chloroplastes (Golovchenko et Cherednichenko, 1962), en particulier au niveau du stroma et des lamelles du stroma (Veeranjaneyulu et Das, 1982), aux noyaux (Sigee, 1982), ou dans la vacuole associé à des polyphosphates (Kunst et Roomans, 1985). Il est probable que la répartition cellulaire de Ni dépende fortement de l'espèce végétale.

### 1.3.5. Mécanismes de la toxicité du nickel chez les végétaux

Bien que plusieurs auteurs aient observé des actions toxiques ponctuelles du nickel, aucun n'a pu mettre en évidence un mécanisme de toxicité. L'action toxique du nickel semble complexe, et elle est probablement le résultat de plusieurs effets combinés.

#### *Action sur la photosynthèse*

De nombreuses études ont montré que la photosynthèse est inhibée par le nickel (Carlson *et al.*, 1975; Clijsters et Van Assche, 1985; Sheoran *et al.*, 1990; Bishnoi *et al.*, 1993a). Cette inhibition semble être le résultat de plusieurs effets : une inhibition de la chaîne de transport des électrons, surtout au niveau du photosystème II (Tripathy *et al.*, 1981; Veeranjaneyulu et Das, 1982; El-Sheekh, 1993), une diminution de la teneur en chlorophylle et de la conductance stomatique (Sheoran *et al.*, 1990; Piccini et Malavolta, 1992; Bishnoi *et al.*, 1993a), ou une inhibition des réactions sombres de la photosynthèse, c'est à dire du cycle de Calvin (Krupa *et al.*, 1993). Les inhibitions du PS II sont généralement mises en évidence *in vitro*, et Krupa *et al.* (1993) suggèrent que Ni agit *in vivo* davantage sur le cycle de Calvin.

On peut regretter dans ces études l'absence de résultats sur la croissance, ce qui ne permet pas de mesurer les répercussions de l'inhibition de la photosynthèse sur la diminution de la croissance de la plante.

### *Action sur le métabolisme des carbohydrates*

Une action toxique du nickel semble se situer au niveau du transport des carbohydrates. En effet, des excès de Ni induisent une accumulation d'amidon dans les feuilles de plusieurs plantes, telles que le haricot (Rauser, 1978; Samarakoon et Rauser, 1979), le riz (Moya *et al.*, 1993), la lentille d'eau (Xyländer *et al.*, 1993).

Le mécanisme d'action de Ni sur le métabolisme des carbohydrates n'est toujours pas expliqué. Moya *et al.* (1993) ont montré, par analyse de broyats de riz, que Ni augmente les teneurs en carbohydrates des feuilles et diminue celles des racines. Samarakoon et Rauser (1979) ont aussi montré une diminution de l'exportation de photoassimilats marqués au  $^{14}\text{C}$  (amidon, et surtout glucose et saccharose) à partir des feuilles de haricot exposé à des excès de nickel. Par conséquent, il semble que Ni puisse bloquer soit le transport du saccharose des feuilles vers les racines, soit la synthèse de saccharose à partir d'amidon dans les feuilles.

Par ailleurs, entre Ni, Co, Zn et Cd, il semble que Ni soit l'élément qui induit la plus forte accumulation d'amidon foliaire (Rauser, 1978).

### *Effet sur la cellule*

Dans l'étude de Robertson et Meakin (1980), la croissance des racines de *Brachystegia spiciformis*, cultivé dans de l'eau, est fortement ralentie à partir de  $0,03 \text{ mg.l}^{-1}$  de Ni ( $0,5 \mu\text{M}$  Ni; - 25 % de réduction en 3 jours). A cette dose, ils observent une absence totale d'activité mitotique au niveau des méristèmes racinaires.

Gabrielli *et al.* (1990) ont observé, au niveau du méristème racinaire de *Silene italica* cultivé sur solution aqueuse, que le nombre de cellules en anaphase et en télophase diminue à partir de  $2,5 \mu\text{M}$  de Ni, et qu'elles disparaissent totalement avec  $7,5 \mu\text{M}$ . Cette diminution de l'activité mitotique est bien corrélée avec la diminution de la croissance racinaire.

### *Action sur les systèmes enzymatiques*

Gabrielli *et al.* (1990) ont montré, sur *Silene italica* cultivé sur solution aqueuse, que  $7,5 \mu\text{M}$  Ni (induisant une diminution de la croissance racinaire de 65 %) augmente l'activité des peroxydases totales solubles (+ 68 % dans les racines, + 24 % dans les feuilles), et concerne surtout des peroxydases basiques.

Le nickel inhiberait le système enzymatique du cycle de Calvin chez le haricot (Krupa *et al.*, 1993). Wildner et Henkel (1979) ont montré que Ni peut se substituer au Mg de la RubisCo *in vitro*, entraînant une diminution de son activité carboxylation/oxygénation.

La synthèse d'éthylène serait fortement inhibée par Ni chez le soja, par une inhibition de l'activité EFE (Ethylene Forming Enzyme) (Pennazio et Roggero, 1992). Roustan *et al.* (1989) ont également observé une diminution de la synthèse d'éthylène par des embryons de carotte cultivés sur des milieux riches en nickel.

L'activité de l'ATPase plasmalemmique des racines de riz est inhibée par des excès de nickel dans le milieu de culture (plus de  $100 \mu\text{M}$ ) (Ros *et al.*, 1992a).

### 1.3.6. Mécanismes de résistance

Il n'y a pas, dans la littérature, de résultats clairs démontrant l'existence de mécanismes de résistance au nickel chez les plantes cultivées. Seules les espèces accumulatrices de nickel, généralement autochtones et souvent endémiques, fournissent des résultats intéressants dans ce domaine. Les sols riches en nickel ont effectivement permis le développement d'une flore très spécialisée, et de nombreux travaux témoignent de leur intérêt (Proctor et Woodell, 1975; Jaffré *et al.*, 1977; Jaffré, 1980; Brooks, 1987; Reeves, 1992).

Ces espèces peuvent tolérer des teneurs en nickel très élevées (exprimée par rapport à la matière sèche) : 1,8 à 4,7 % dans les feuilles de *Psychotria douarrei* (Jaffré et Schmid, 1974), 0,65 % dans les feuilles de *Hybanthus floribundus* (Severne, 1974), plus de 25 % dans le latex de *Sebertia acuminata* (Jaffré *et al.*, 1976), 1 % dans les feuilles et 0,16 % dans les racines d'*Alyssum bertolonii* (Vergnano Gambi *et al.*, 1982), 0,8 à 1 % dans les feuilles d'*Alyssum troodii* (Homer *et al.*, 1991). Il existerait au moins 48 espèces accumulatrices de nickel (ayant plus de 1000 µg Ni.g<sup>-1</sup> MS dans les feuilles) en Nouvelle-Calédonie (Jaffré, 1980), et environ 200 dans le monde (Reeves, 1992).

Certains mécanismes de tolérance ont parfois été mis en évidence chez ces espèces : Ni est associé au malate dans les racines et les feuilles d'*Alyssum bertolonii* (Gabbrielli *et al.*, 1991), il est associé au citrate ou au malate dans les feuilles de plusieurs espèces accumulatrices en Nouvelle-Calédonie (Lee *et al.*, 1977, 1978; Kersten *et al.*, 1980), il est associé essentiellement au citrate et au malate dans les feuilles de *Dichapetalum gelonioides* (Homer *et al.*, 1991). L'intervention des acides organiques comme complexants semble donc prépondérante.

Par ailleurs, il a été montré que Ni est essentiellement localisé dans la vacuole de souches de champignons *Saccharomyces cerevisiae* Ni-résistantes, où il semble complexé à l'histidine (Joho *et al.*, 1992, cité par Gadd, 1993).

On trouve très peu de résultats chez les plantes cultivées. Piccini et Malavolta (1992) sont parmi les seuls à avoir montré des différences importantes de sensibilité à Ni entre deux cultivars de haricot. Bien qu'ils n'avancent pas d'explications, la différence pourrait provenir de teneurs en Ni plus faibles dans les racines et les tiges chez le cultivar résistant, c'est à dire d'un mécanisme d'exclusion.

La synthèse de phytochélatines (PC) en présence de Ni a peu été démontré. Il semble que le seul exemple soit une suspension cellulaire de *Rauvolfia serpentina* (Grill *et al.*, 1987): 100 µM Ni sur milieu de Linsmaier et Skoog pendant 3 jours ont induit une synthèse de PC, surtout de faible poids ((γ-Glu-Cys)<sub>2</sub>-Gly). Cependant, ils n'est pas sûr que les phytochélatines puissent intervenir dans la tolérance au Ni, car les liaisons PC-métal n'ont été montrées que pour Cu, Zn, Pb et Cd (Steffens, 1990).

## CHAPITRE 2

---

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

---



## 2

---

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Ce chapitre présente les principales techniques et les protocoles d'analyses utilisés. Compte tenu de la diversité des conditions expérimentales, les détails de chaque expérience sont précisés dans les différents paragraphes des résultats.

#### 2.1. MATÉRIEL VEGETAL

##### 2.1.1. Les espèces cultivées

La plus grande partie de ce travail a été réalisé avec le maïs (*Zea mays* L.). Le choix de cette espèce, outre son intérêt agricole, se justifie par sa rapidité de croissance et de développement, et sa sensibilité aux carences, aux toxicités et aux déséquilibres minéraux. De plus, notre laboratoire l'utilise comme plante-test depuis de nombreuses années et en connaît bien les besoins et le comportement. D'ailleurs, d'après Nellessen et Fletcher (1993), c'est la plante la plus utilisée pour l'étude des métaux lourds, fournissant ainsi le plus de références.

Trois cultivars de maïs ont été principalement utilisés : Hycorn 80 (la moins sensible au nickel parmi les cultivars testés), GH 5010 (sensibilité intermédiaire), et XL 94 (la plus sensible à Ni). D'autres cultivars ont été utilisés pour comparer leur sensibilité au nickel. Leurs noms sont précisés dans les résultats.

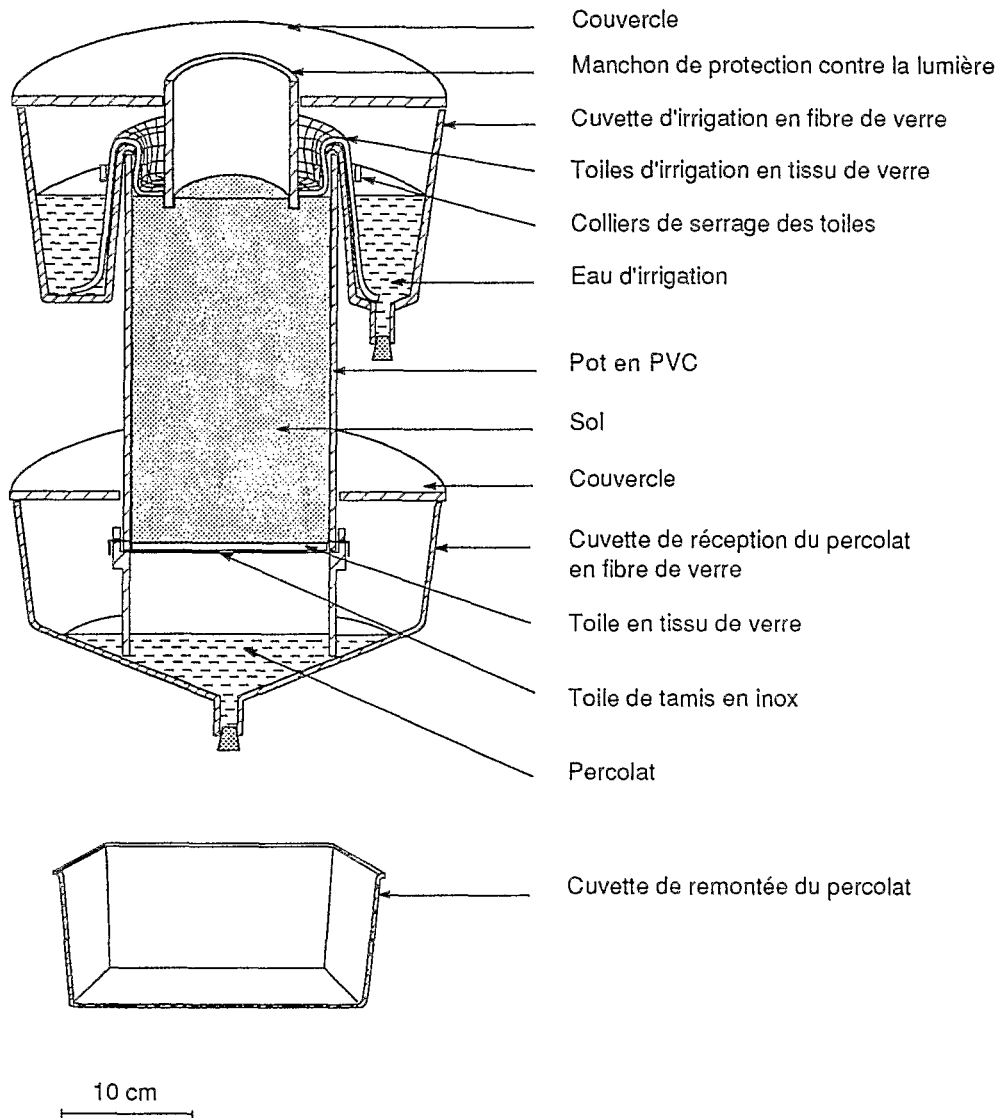
En plus du maïs, nous avons comparé plusieurs espèces végétales quant à leur sensibilité au nickel : le haricot (*Phaseolus vulgaris* L. cv Contender), la tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Roma), le sorgho (*Sorghum vulgare* cv Jumbo) et le Squash (*Cucurbita maxima* Duch. cv Delica ; hybride simple issu du croisement du concombre d'une courge).

Les plants ont été cultivés soit sur sol en vase de végétation sous serre, soit sur solution (culture hydroponique) en salle de culture. En outre, une expérience a porté sur des rhizotrons et le matériel utilisé est également présenté.

##### 2.1.2. Culture sur sol en vase de végétation

Ce type de culture a été utilisé principalement pour définir les effets du nickel sur la croissance et le développement du maïs.





**Fig. 2.1. Coupe d'un vase de végétation.** Une quantité d'eau précise peut être mise dans la cuvette d'irrigation (jusqu'à 3,5 litres). La récupération du percolat permet de contrôler la consommation en eau de la plante, et de doser la solution du sol à un temps donné. A la récolte, le pot se démonte entièrement. On peut alors récupérer la colonne de sol et les racines en plus des parties aériennes. Toutes les parties du pot sont peintes en blanc à l'extérieur de façon à limiter son échauffement par le soleil. Les couvercles permettent de limiter le développement des algues dans la solution. Le pot représenté a un volume de 4,7 litres, ce qui permet de cultiver du maïs en serre pendant 30 jours environ, sans distorsion par rapport à une culture en plein champ.

### *Description du vase de végétation*

La technique de culture sur sol en vase de végétation a été mise au point par MM. B. Bonzon et B. Denis, au laboratoire d'Agropédologie du Centre ORSTOM de Nouméa. La figure 2.1 nous en montre le détail : la colonne de sol est irriguée par le haut à l'aide d'une toile en fibre de verre, qui amène par capillarité la solution d'irrigation à la surface du sol. Une cuvette placée sous le pot permet de récupérer l'excès d'eau percolant à travers le sol. Ainsi, il est possible de contrôler avec précision (au gramme près) la quantité d'eau nécessaire pour amener le sol à la capacité au champ, ou la quantité d'eau absorbée par la plante.

Le volume des pots habituellement utilisés est de 4,7 litres, la masse de sol nécessaire à leur remplissage oscillant de 4,5 à 6 kg suivant sa densité. Ce volume permet de cultiver du maïs en serre sans distorsion par rapport au champ jusqu'au 30<sup>ème</sup> jour environ, plus précisément jusqu'à une hauteur de 75 cm mesurée du sol à la ligule de la dernière feuille dégainée. Des pots de 9 litres ont aussi été utilisés pour mener le maïs jusqu'à maturité.

### *Préparation et mise en place*

Le sol, prélevé sur le champ, est tamisé à 6 mm, puis soigneusement homogénéisé à la pelle. Une fois le poids de terre par pot déterminé, les pots sont remplis en évitant tout tassement, toujours avec la même quantité de sol.

Les pots sont ensuite installés dans la serre. Ils sont amenés lentement à la capacité au champ.

### *Dispositif expérimental*

Chaque expérience en serre a été bâtie selon le même type de dispositifs expérimentaux : des essais en blocs complets équilibrés (simples ou factoriels) à six répétitions, avec deux pots par traitement élémentaire, soit 12 pots par traitement au total. Ces conditions permettent d'avoir de faibles coefficients de variation sur les paramètres observés.

### *Semis*

Les semis sont réalisés en fin d'après-midi, avec des graines prégermées, à raison d'une graine par pot. Les plantules les plus vigoureuses sont utilisées. Leur radicule doit avoir 0,5 à 1 cm de long, ce qui oblige à lancer la germination 35 à 45 heures plus tôt. Celle-ci est réalisée à 28 °C, sur coton recouvert de papier filtre et imbibé d'eau déminéralisée.

### *Conditions nutritives*

Lors du semis, la terre des pots est à la capacité au champ. Les éléments nutritifs sont apportés en solution dans la cuvette d'irrigation, qui peut contenir jusqu'à 3,5 litres de solution. Le débit des toiles est ajusté de façon à ce que les plants soient au voisinage de la capacité au champ, en jouant à la fois sur la hauteur d'eau dans la cuvette d'irrigation et sur le nombre de toiles d'irrigation (Bonzon *et al.*, 1991a).

**Tableau 2.1. Composition de la fumure minérale pour la culture du maïs en vase de végétation.**  
(pot de 4,7 litres).

Produits ajoutés à la solution	Eléments	Quantités apportées *	
		mg.pot <sup>-1</sup>	kg.ha <sup>-1</sup>
Macroéléments :	N (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	355	190
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , KNO <sub>3</sub> ,	N (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	420	224
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O, Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O,	P **	129	69
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	K	379	203
	Ca	204	109
	Mg	124	66
	S	163	87
Microéléments :	B	3,9	2,1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O,	Zn	6,1	3,3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	Cu	9,0	4,8
	Mo	1,0	0,5

\* Les quantités de nutriments apportés par kg de sol correspondent aux quantités prélevées en plein champ par une culture de maïs ayant produit 15,6 t.ha<sup>-1</sup> de grain sec.

\*\* Sauf pour les sols ferrallitiques ferritiques (voir le texte, p. 5).

**Tableau 2.2. Composition de la solution nutritive de Hoagland modifiée, utilisée pour la culture hydroponique.**

Produits ajoutés à la solution	Eléments	Concentrations finales	
		μM	mg.l <sup>-1</sup>
Macroéléments :	N (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	14000	196
KNO <sub>3</sub> , NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,	N (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	2000	28
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O, MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	P	2000	62
	K	6000	235
	Ca	4000	160
	Mg	1000	24
	S	1000	32
Microéléments :	Cl	50	1,77
KCl, H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O,	B	25	0,27
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O,	Mn	2,0	0,11
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O, Fe-EDTA	Zn	2,0	0,13
	Cu	0,5	0,03
	Mo	0,5	0,05
	Fe	20	1,12

Le tableau 2.1 donne le détail de la fumure minérale pour une culture sur sol en vase de végétation. Elle est apportée en 3 fractions : au semis, au 10<sup>ème</sup> et au 20<sup>ème</sup> jour de culture. Fe et Mn sont présents naturellement en quantité suffisante et il est inutile d'en ajouter.

Pour les sols ferrallitiques ferritiques du Sud de la Nouvelle-Calédonie (§ 2.2), des études ont montré qu'il était nécessaire d'apporter 7 t.ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> pour lever toute carence en phosphore (Gourdon *et al.*, 1991). Celui-ci est apporté sous forme de superphosphate triple à 46 % de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Le produit, broyé, est mélangé au sol sous forme solide avant sa mise en pot. (pour l'apport de nickel voir le paragraphe 2.2).

#### *Conditions climatiques*

Selon la saison, les températures varient de 27 à 40 °C le jour et de 16 à 24 °C la nuit, et l'humidité relative de 30 à 60 % le jour et de 80 à 90 % la nuit. La durée d'ensoleillement oscille entre 11 h et 13 h par jour.

### **2.1.3. Culture sur solution**

La culture sur solution (ou hydroponique) est utile lorsqu'il s'agit de travailler sur le système racinaire en plus des parties aériennes.

#### *Dispositif expérimental*

Les graines sont tout d'abord désinfectées par un bain d'hypochlorite de sodium à 1 % pendant 15 min. Après rinçage à l'eau déminéralisée, elles sont mises à germer à 28 °C sur du coton recouvert de papier filtre et imbibé d'eau déminéralisée. Après 40 heures environ, les plantules de maïs ayant les racines les plus longues sont sélectionnées pour être mises en culture. Pour les autres espèces, les temps de germination étaient les suivants : 36 heures pour le sorgho, 4 jours pour le haricot, la tomate et le squash. Les graines prégermées sont coincées ou maintenues à l'aide d'un manchon en mousse dans des trous faits sur des plaques en polystyrène, à raison d'au moins douze plants par plaque. Celles-ci sont posées à la surface du milieu de culture dans des bacs en polyéthylène d'une contenance de 5 litres.

#### *Conditions nutritives*

Le tableau 2.2 donne le détail de la solution de culture utilisée. Il s'agit d'une solution de Hoagland modifiée diluée 4 fois (Hoagland and Arnon, 1950). Cette dilution permet d'avoir une solution de concentration très proche de celle mise pour la culture sur sol en vase de végétation. Les bacs contiennent 3 litres de solution, changées tous les trois jours.

Le nickel (NiCl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O) est introduit dès le premier jour à des doses croissantes comprises entre 0 et 100 µM. Le pH de la solution est de 5,3, et il n'est pas modifié par les additions de NiCl<sub>2</sub>. A ce pH, le nickel est sous forme Ni(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub><sup>2+</sup>, totalement disponible pour la plante. L'aération des solutions est réalisé à l'aide d'une arrivée d'air comprimé assurant un débit de 3 à 4 l.min<sup>-1</sup>. Le bullage est assurée par un tube en polyéthylène percé en plusieurs

endroits par une aiguille, et fixé au fond du bac par des ventouses. Ce système permet d'éviter des problèmes de fixation du nickel sur les buleurs classiques en silice ou en bois.

#### *Conditions climatiques*

Les températures étaient de  $24 \pm 1$  °C le jour et  $22 \pm 1$  °C la nuit, et l'humidité relative de  $60 \pm 5$  % le jour et  $70 \pm 8$  % la nuit. L'éclairage était assuré par une rampe de tubes fluorescents (Mazdafluor Solara) fournissant une énergie lumineuse de  $200 \pm 5$   $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  au niveau des plantes, pendant 14 heures par jour.

#### 2.1.4. Culture sur rhizotron

Le rhizotron permet l'observation de la morphologie du système racinaire tout au long de la croissance de la plante. Le bac de culture est principalement constitué de deux plaques de verre parallèles espacées de 3 cm, assemblées comme le montre la figure 2.2.

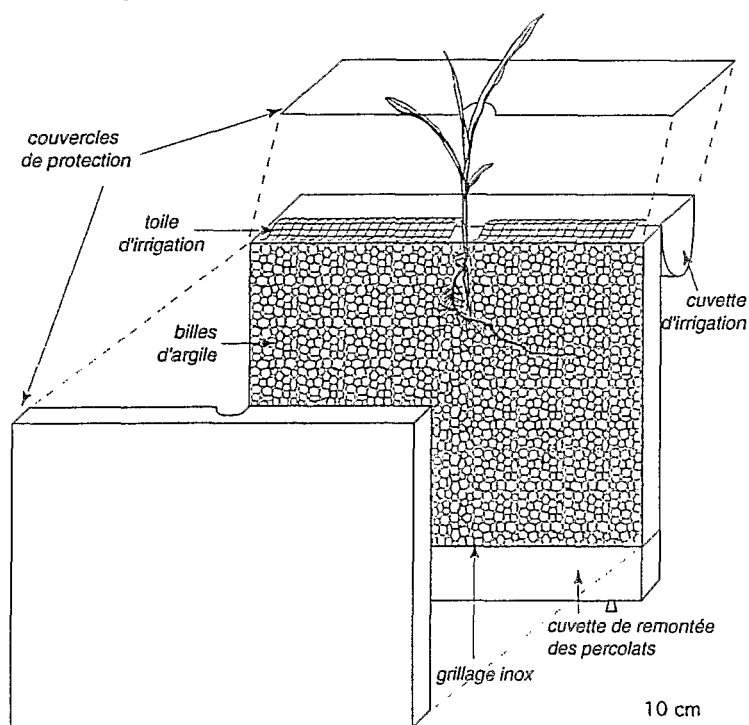


Fig. 2.2. Culture du maïs sur rhizotron.

Le support de culture, composé de billes d'argile expansée (Lenihydrokultur), occupe l'espace entre les deux plaques. Une solution nutritive (Hoagland diluée au quart contenant différentes concentrations de  $\text{NiCl}_2$ ) est apportée à l'aide d'une toile en fibre de verre trempant dans une cuvette d'irrigation placée sur le côté. L'excès de solution percolant est recyclé régulièrement. Un grain de maïs prégermé est repiqué 2 cm sous la surface du support. Le système, placé dans une serre, permet de cultiver le plant pendant environ 1 mois.

#### 2.1.5. Description du plant de maïs

A travers les expériences décrites plus loin, différentes parties du plant de maïs ont été prélevées. Afin de faciliter la compréhension, la figure 2.2 décrit un plant de maïs âgé d'environ 4 semaines, et une plantule de 8 jours.

Ainsi, pour les expériences utilisant des racines excisées, seules les radicules ont été prélevées. Pour les analyses chimiques, les parties aériennes ont été coupées au niveau du mésocotyle chez la plantule, et juste au-dessus des racines coronaires chez le plant plus âgé. Les racines de la plantule ont été coupées à leur base, à 1 cm du noeud cellulaire.

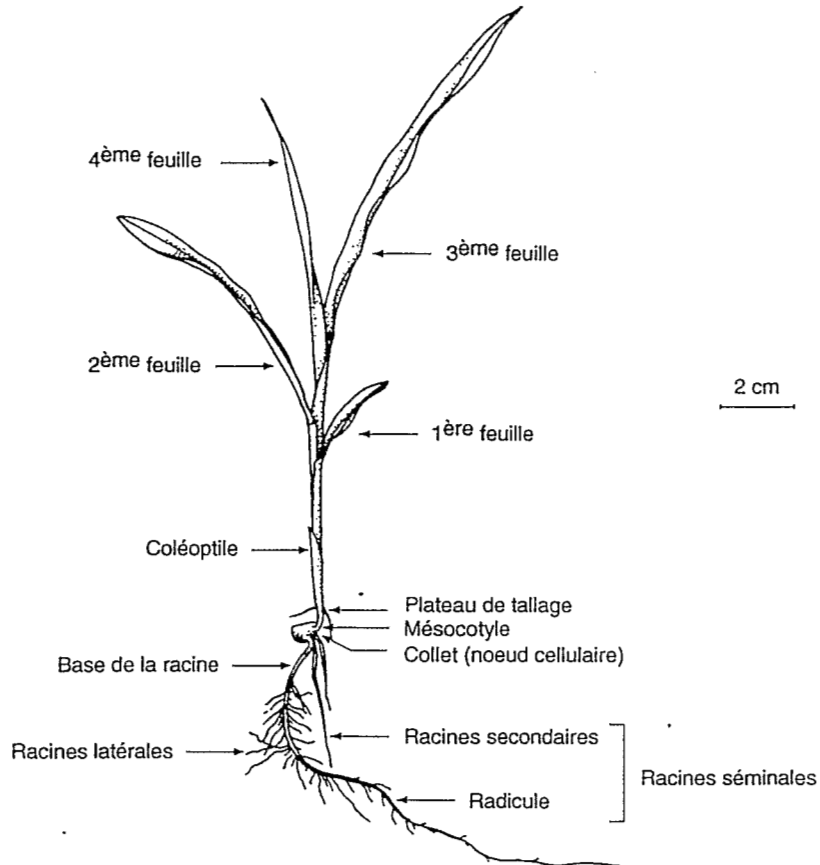
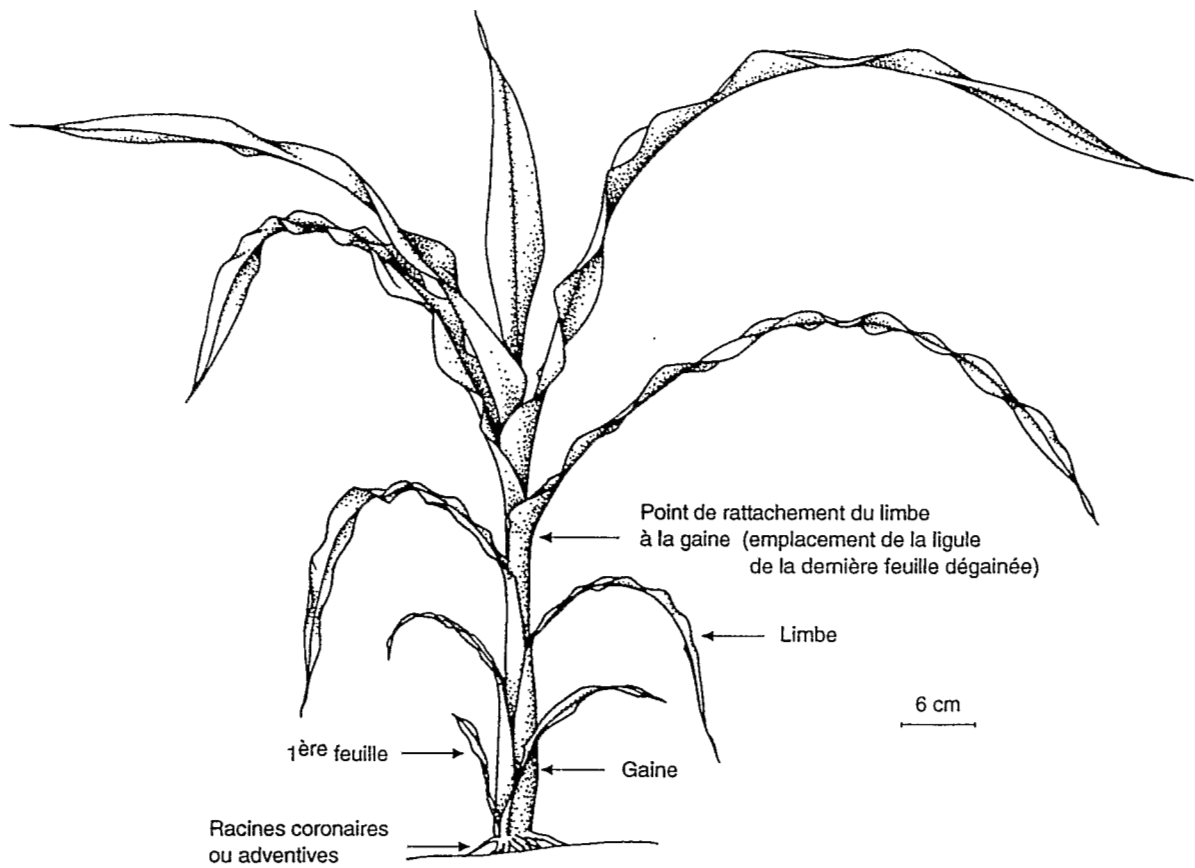


Fig. 2.3. Plant de 4 semaines au stade 10 feuilles (6 feuilles dégainées), et jeune plantule de maïs de 8 jours au stade 4 feuilles (deux premières feuilles dégainées).

## 2.2. LES SOLS

Cette étude s'étant déroulée, pour sa plus grande partie, en Nouvelle-Calédonie à Nouméa, nous avons par conséquent travaillé sur des sols du Territoire. Deux grands types de sols ont été utilisés : un sol alluvial équilibré, et plusieurs faciès de sols ferrallitiques ferritiques.

Le sol alluvial, prélevé dans la région de La Foa en Nouvelle-Calédonie (cf. Fig. 1.3), est un sol équilibré à faible teneur naturelle en nickel (environ 150 mg.kg<sup>-1</sup> de sol sec). Cette caractéristique nous a permis de l'utiliser comme sol témoin "sans nickel", et d'étudier l'influence de cet élément sur la croissance et le développement du maïs en lui rajoutant des doses croissantes de sulfate de nickel (ajouté au sol sous forme solide et mélangé à l'aide d'un mélangeur (Chopin) pendant 5 minutes). L'horizon 0-25 cm a été utilisé. Ses principales caractéristiques sont présentées dans le tableau 2.3.

Les sols ferrallitiques ferritiques ont été prélevés dans le Sud de la Nouvelle-Calédonie (cf. Fig. 1.3), dans la vallée de la Coulée. Ils proviennent principalement de l'altération de péridotites (nésosilicates ferromagnésiens), principales roches mères de cette région. Ces dernières contiennent du nickel en quantité relativement importante (environ 0,3 %). A cours de leur évolution pédologique, la silice et le magnésium sont fortement lixiviés. Les sols qui en résultent ont des teneurs très importantes en fer, sous forme d'oxy-hydroxydes, ainsi que de fortes teneurs en nickel, de l'ordre de 1 %, dont le problème de la phytotoxicité a motivé cette étude.

Quatre types de sols ferrallitiques ferritiques ont été étudiés : deux sols dans deux positions différentes (plaine et piedmont), et sur deux horizons (0-20 cm et 40-60 cm). Leurs principales caractéristiques sont données dans le chapitre 3.

**Tableau 2.3. Principales caractéristiques physico-chimiques du sol alluvial (horizon 0-25 cm).**

Texture (%)	argile	12,5
	limons	24,7
	sables	61,0
Matière organique (mg.g <sup>-1</sup> )	C	10,6
	N	1,07
	C/N	9,9
Complexe d'échange (méq.100 g <sup>-1</sup> )	Ca	8,5
	Mg	7,3
	K	0,3
	Na	0,1
	CEC	15,8
Phosphore (mg.g <sup>-1</sup> )	total	1,5
	assimilable	0,1
Ni (mg.kg <sup>-1</sup> )	total	150

## 2.3. ANALYSES DES VÉGÉTAUX, DES SOLS ET DES EAUX

Les analyses ont été réalisées au Laboratoire Central d'Analyses du centre ORSTOM de Nouméa, sous la direction de M. Pétard, puis de M. Veysseyre. Les méthodes utilisées sont décrites plus en détail dans les notes techniques de M. Pétard (1993a, b et c).

### 2.3.1. Analyses chimiques des végétaux

#### *Préparation des végétaux*

La culture en vase de végétation permet d'analyser uniquement les parties aériennes. Toutefois, dans certains cas, les racines ont aussi été analysées après lavage au Tween 40 (Merck), agent mouillant permettant d'éliminer la plupart des fines particules du sol.

Le dispositif de culture hydroponique permet par contre la récolte et l'analyse de la plante entière. Pour l'analyse des racines, celles-ci sont rincées pendant quelques secondes à l'eau déminéralisée avant d'être analysées.

Les échantillons récoltés sont pesés à l'état frais, puis séchés à l'étuve à 105 °C pendant 44 h. Ils sont à nouveau pesés, puis broyés et tamisés à 0,5 mm.

#### *Dosages des végétaux*

Une quantité déterminée d'échantillon sec est calciné au four à moufle à 450 °C. Après pesée, les cendres obtenues sont reprises par HCl concentré. La solution est ensuite filtrée sur papier filtre sans cendres.

Pour la détermination de la silice, le résidu de la filtration est attaqué par l'acide fluorhydrique à chaud pour éliminer la silice, puis évaporé à sec et pesé. La quantité de silice est déterminée par différence de poids.

Après la détermination de la silice, le résidu est repris par HCl concentré et de l'acide borique à 5 %. La solution est jointe au filtrat obtenu après la dissolution des cendres. Du lanthane est ajouté à la solution jusqu'à 0,5 %, de façon à atténuer les interférences dans le dosage. Les cations sont dosés par spectrométrie d'émission (K, Na) ou d'absorption atomique en flamme air / acétylène (Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Ni) (Varian AA 300). La limite de détection du nickel est environ de 1  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de matière sèche (pour certaines expériences nécessitant plus de précision, Ni a été dosé en spectrométrie d'absorption atomique à four en graphite, la limite de détection étant de l'ordre de 10  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  MS). Le phosphore est dosé à l'auto-analyseur (Technicon II) par colorimétrie du complexe phosphovanadomolybdique à 420 nm.

L'azote est extrait par minéralisation des échantillons secs selon la méthode Kjeldahl (1883), puis dosé par titrimétrie de l'azote ammoniacal après déplacement à la soude et entraînement à la vapeur d'eau.



En ce qui concerne le soufre, l'échantillon est oxydé par une solution concentrée d'acide nitrique et de nitrate de magnésium. Après reprise chlorhydrique, la solution est filtrée et l'ion  $\text{SO}_4^{2-}$  est déterminé par turbidimétrie avec le chlorure de baryum, à l'auto-analyseur.

Les chlorures sont extraits à l'eau bouillante, puis dosés par potentiométrie avec une électrode d'argent.

### 2.3.2. Analyses physico-chimiques des sols

#### *Préparation des échantillons de sol*

Le sol est séché au tunnel à infra-rouges à 40 °C. Les racines des plants cultivés en serre sont extraites soigneusement à la main. Le sol est ensuite tamisé à 2 mm et homogénéisé. Une partie est broyée et tamisée à 0,2 mm, une autre à 0,5 mm.

#### *Déterminations physiques des sols*

Pour la détermination du potentiel capillaire (pF), l'échantillon tamisé à 2 mm est saturé en eau, puis soumis à une pression d'air déterminée (exprimée par le logarithme de la pression en  $\text{g.cm}^{-2}$ ). Après 24 heures, l'humidité restante de l'échantillon est déterminée (par séchage à 105 °C). Le pF 4,2 (pression de 16  $\text{kg.cm}^{-2}$ ) correspond au point de flétrissement; le pF 2,5 (pression de 316  $\text{g.cm}^{-2}$ ) correspond à la capacité au champ.

Les fractions granulométriques sont déterminées de la façon suivante : après destruction de la matière organique à l'eau oxygénée, les particules sont dispersées par agitation; les fractions argile ( $a \leq 0,002$  mm) et limons fins ( $0,002 < lf \leq 0,02$  mm) sont déterminées par sédimentation à l'aide d'une pipette de "Robinson"; après élimination de ces fractions, les limons grossiers ( $0,02 < lg \leq 0,05$  mm) et les sables fins ( $0,05 < sf \leq 0,2$  mm) sont séparés par tamisage à 0,05 et 0,2 mm; les sables grossiers ( $0,2 < sg \leq 2$  mm) sont déterminés par pesée.

#### *Déterminations chimiques des sols*

Le pH est mesuré à partir d'une suspension de sol tamisé à 2 mm : soit dans l'eau, soit dans une solution de KCl 1M, dans le rapport sol / solution de 1/2,5. La différence des deux mesures ( $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}} - \text{pH}_{\text{KCl}}$ ) indique le comportement du complexe d'échange : échangeur de cations quand  $\Delta\text{pH}$  est positif, échangeur d'anions quand  $\Delta\text{pH}$  est négatif.

Pour la matière organique, le carbone total est dosé selon la méthode de Walkley et Black (1934). L'azote total est minéralisé selon la méthode Kjeldahl (1883) sur un sol broyé et tamisé à 0,2 mm, puis dosé par titrimétrie de l'azote ammoniacal.

Les bases échangeables sont extraites, sur un sol tamisé à 2 mm, par une solution molaire de chlorure d'ammonium à pH 7,0 dans l'éthanol à 60 % (méthode Tucker). Les bases (Ca, Mg, K, Na) sont dosés par spectrométrie d'absorption atomique en flamme (Varian AA 300).

Pour la capacité d'échange, une fois les bases échangeables extraites, les ions ammonium restant sont déplacés par une solution de nitrate de potassium 1,5 M et de nitrate de calcium 0,25 M. Les ions ammonium libérés sont dosés au pH-mètre, et les ions chlorures par potentiométrie. La différence des deux mesures donne la CEC en terme de méq.100 g<sup>-1</sup> de sol. Dans le cas des sols ferrallitiques, on peut noter que la méthode Tucker à pH 7,0 est probablement mal adaptée. En effet, leur teneur exceptionnelle en oxy-hydroxydes de fer leur confère une capacité d'échange anionique non négligeable et d'autant plus importante que le pH est faible, si bien que la CEC déterminée à pH 7,0 est très certainement biaisée. Il convient donc d'interpréter les résultats avec précaution.

Pour la détermination du phosphore total, le phosphore est extrait par fusion à la soude, sur sol tamisé à 0,2 mm. Il est dosé à l'auto-analyseur (Technicon II) par colorimétrie du complexe phosphomolybdique à 820 nm. Pour le phosphore assimilable, la méthode de Olsen modifiée est utilisée (Olsen *et al.*, 1954) : sur sol broyé-tamisé à 0,5 mm, le phosphore est extrait par une solution de fluorure d'ammonium et d'hydrogencarbonate de sodium 0,5 M, puis déterminé par colorimétrie du complexe phosphomolybdique réduit à 880 nm.

Pour l'analyse totale (K, Ca, Mg, Na, Al, Cr, Co, Fe, Mn et Ni), l'échantillon, broyé et tamisé à 0,2 mm, est attaqué par l'acide perchlorique à ébullition, après destruction de la matière organique par l'acide nitrique. Après filtration sur filtre sans cendres, du lanthane est ajouté à la solution d'attaque. Les éléments sont dosés par spectrométrie d'absorption atomique en flamme (Varian AA 300). La limite de détection du nickel contenu dans le sol est environ de 0,01 %. La silice est déterminée sur le résidu de filtration par différence de poids après élimination par la soude.

Dans l'étude de la mobilité et de la biodisponibilité du nickel, celui-ci est extrait du sol tamisé à 2 mm selon deux techniques :

- par une solution de DTPA 5 mM + CaCl<sub>2</sub> 0,01 M ajustée à pH 5,3 par de l'acide acétique, dans un rapport sol / solution d'extraction de 5 g / 25 ml, d'après la méthode de Lindsay et Norvell (1978) adaptée aux sols ferrallitiques de la Nouvelle-Calédonie (Pétard, 1993a). Après une heure d'agitation, le mélange est centrifugé puis filtré sur papier. Le nickel contenu dans le filtrat est dosé par spectrométrie d'absorption atomique. La limite de détection est environ de 0,2 µg Ni.g<sup>-1</sup> de sol.

- par une solution de KCl 1 M dans un rapport sol / solution de 1 / 10, avec 1 h d'agitation. Après centrifugation et filtration, Ni est dosé sur le filtrat comme ci-dessus.

### 2.3.3. Analyses chimiques des solutions aqueuses

Une fois récoltés, les échantillons sont conservés au réfrigérateur.

La conductivité est mesurée à l'aide d'un conductimètre (Metrohm 660). Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

Le pH est mesuré au pH-mètre (Metrohm 605).

Les chlorures sont dosés par colorimétrie par la méthode au thiocyanate mercurique à 480 nm. Les sulfates sont dosés par turbidimétrie à l'auto-analyseur. Les phosphates (somme de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  en  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) sont dosés par colorimétrie du complexe phosphomolybdique à 880 nm.

Les cations, en présence de lanthane 1 % et d'acide perchlorique 2 %, sont dosés par spectrométrie d'émission (pour K), ou par spectrométrie d'absorption atomique en flamme (Varian AA 300) (pour Ca, Mg, Ni, Fe). La limite de détection du nickel en solution est environ de  $0,04\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

## 2.4. DOSAGE D'ACIDES ORGANIQUES

Nous nous sommes intéressés aux acides organiques dans le sens où leur synthèse peut être activée en cas d'intoxication par les métaux lourds (Suhayada et Haug, 1986; Delhaize, Ryan et Randall, 1993).

### *Préparation des échantillons*

Les analyses ont été faites sur des plants de maïs cultivés en hydroponie pendant 10 jours. Des échantillons moyens de 12 plants sont constitués : les analyses des racines correspondent à l'ensemble du système racinaire, et celles des feuilles correspondent à l'ensemble des parties aériennes.

5 g de matière fraîche broyée sont mélangés avec 2 ml de résine échangeuse de cations (Dowex 50 W 8) de manière à solubiliser les anions. Après 30 min d'agitation, le mélange est filtré sous vide. Le filtrat, amené à pH 8,0 par  $\text{NH}_4\text{OH}$ , est déposé sur une colonne contenant une résine échangeuse d'anions (Temex 1 x 8, 200-400 mesh). Les composés neutres (sucres) et basiques (acides aminés) ne sont pas retenus et sont donc éliminés. Les acides organiques retenus sont élués par l'acide formique. L'éluat est ensuite évaporé sous air comprimé, amené à sec, puis repris par 2,5 ml d'eau MilliQ. Les échantillons sont alors prêts pour l'analyse.

### *Dosage*

Les acides organiques sont séparés par HPLC : 20  $\mu\text{l}$  d'échantillon sont injectés sur la colonne (Aminex HPX 87 H), équipée en sortie d'une micromembrane de suppression permettant d'atténuer le bruit de fond. L'élution se fait avec NaOH, à 65 °C et 35 bar. La détection se fait à 210 nm (absorption de la double liaison de la fonction COOH).

## 2.5. DOSAGE D'ENZYMES ET DE PROTÉINES

### 2.5.1. Peroxydases

Nous nous sommes intéressés aux peroxydases (EC 1.11.1.7) en tant que marqueurs de stress (Castillo, 1986). Nous avons ainsi comparé les activités de différents organes de maïs (apex racinaire, base de la racine, et feuille), en fonction de la concentration en nickel dans la solution, du temps de culture, et du cultivar (sensible et tolérant au nickel).

#### *Préparation des extraits*

Les extraits ont été préparés à partir de plants de maïs cultivés en hydroponie.

Les peroxydases ont été séparées en deux fractions, dites solubles (S) et ioniques (I), de la façon suivante : le matériel frais, prélevé en milieu de journée, est broyé finement à l'aide d'un potter dans un tampon phosphate de potassium 0,05 M (pH 6,6) à 2 °C (dans un rapport d'environ 1 g de MF pour 10 ml de tampon). Le tampon contient 3 % (par rapport à la matière fraîche) de PVP (polyvinylpyrrolidone) insoluble (Polyclar A.T.). Le broyat est centrifugé 30 min à 20 000 g, à 2 °C. Le surnageant constitue la fraction soluble, contenant les peroxydases cytoplasmiques solubles et pariétales libres. Le culot est épuisé en activité peroxydasique soluble par trois extractions successives dans les mêmes conditions (fractions S2 à S4, réunies avec S1). Le culot est ensuite repris dans un tampon de force ionique élevée (tampon + NaCl 1 M), pour extraire les peroxydases liées aux parois par forces ioniques. Trois nouvelles extractions successives sont réalisées comme précédemment, les surnageants constituant les extraits I1 à I3. Les échantillons sont conservés au congélateur jusqu'à la fin des dosages.

#### *Mesure de l'activité des peroxydases*

Les peroxydases ont été dosées soit avec le gaïacol comme substrat pour la mesure de l'activité totale, soit avec la syringaldazine pour la mesure des peroxydases impliquées dans la lignification (Imberty *et al.*, 1985). L'activité a été déterminée à 25 °C par spectrophotométrie d'absorption (Beckman, Model 26).

Pour la mesure de l'activité peroxydasique totale, le mélange réactionnel est constitué de 2 ml de tampon Tris-Maléate 0,1 M (pH 6,5) contenant du gaïacol à 40 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 4 mM, et 20 µl d'extrait enzymatique. L'activité est déterminée à partir de la cinétique de formation du tétragaïacol à 470 nm, avec le coefficient d'extinction molaire de 26,6 cm<sup>-1</sup>.mM<sup>-1</sup>. Les activités en nanokatal.mg<sup>-1</sup> protéines (ou g<sup>-1</sup> MF) sont calculées à partir de l'équation suivante :

$$\frac{\Delta DO_{470} \times V_{\text{cuve}}(\text{ml}) \times V_{\text{extraction}}(\text{ml}) \times 4000}{\Delta t(\text{s}) \times V_{\text{d'extrait}}(\text{ml}) \times M(\text{g MF ou mg protéines}) \times 26,6}$$

Pour la mesure de l'activité des peroxydases impliquées dans la lignification, le mélange réactionnel est constitué de 2 ml de tampon Tris-Maléate 0,1 M (pH 6,5) contenant de la syringaldazine à 0,1 mM (dissout à 2 mM dans du méthanol), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 4 mM, et 100 µl d'extrait enzymatique. La cinétique de formation des produits d'oxydation de la syringaldazine est suivie à 530 nm. Les activités sont données en  $\Delta DO \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  protéines (ou g<sup>-1</sup> MF).

### *Electrophorèse*

Les extraits de la fraction soluble ont été séparés par focalisation isoélectrique sur gel d'agarose (0,6 %). Le gel mis dans la cuve est recouvert d'un tampon Tris-Borate 0,1 M. Les paramètres de la migration sont les suivants : 75 V; 2,5 mA; 2 °C pendant environ 3 heures. 10 à 20 µl de chaque échantillon (3 µg de protéines) sont déposés dans les puits au milieu du gel. Les bandes peroxydasiques sont révélées en présence de 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30 % et de 50 ml de tampon Tris-Maléate 0,1 M (pH 6,5) contenant du gaïacol à 40 mM.

### **2.5.2. AIA-oxydase**

L'activité AIA-oxydase est déterminée par la vitesse de dégradation de l'acide indole-acétique, selon la méthode de Gordon et Weber (1951).

L'activité AIA-oxydase a été dosée sur la fraction soluble décrite ci-dessus pour l'extraction des peroxydases.

Le milieu réactionnel comprend : 2,28 ml de tampon phosphate 6,66 mM (pH 6,0), 50 µl de MnCl<sub>2</sub> à 100 µM, 50 µl d'acide *p*-coumarique à 50 µM, 100 µl d'AIA à 4 mM, et 50 µl d'extrait enzymatique. La réaction est conduite à 30 °C pendant une heure. Le réactif de Salkowski (2 ml de FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 1,5 M, 70 ml d'eau distillée et 40 ml d'acide sulfurique pur) est alors ajouté de façon à stopper la réaction (2 ml de réactif pour 0,5 ml de milieu réactionnel). La quantité d'AIA restante est déterminée au spectrophotomètre (Beckman) par mesure de l'absorbance à 535 nm au bout de 9 min. La différence avec la quantité présente au départ détermine l'activité AIA-oxydase, exprimée en  $\Delta DO \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  protéines (ou g<sup>-1</sup> MF).

### **2.5.3. ATPase**

L'activité de l'ATPase plasmalemmique des racines de maïs a été suivie par la mesure de l'acidification du milieu de culture par des racines excisées.

Les plants de maïs sont cultivés en hydroponie pendant 3 jours sur solution de Hoagland diluée 10 fois, à pH 5,3. Au troisième jour, des lots de 36 racines excisées sont mises à incuber dans 75 ml de solution de Hoagland 1/10 fraîche, à pH 6,00, avec différentes

concentrations de  $\text{NiCl}_2$ , ou  $50 \mu\text{M}$  de vanadate. La température du milieu est maintenue à  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . L'évolution du pH de la solution est suivie avec un pH-mètre de précision. L'activité est exprimée en néq de  $\text{H}^+$  formés au moment de la mesure par g MF et par ml de solution.

#### 2.5.4. Dosages de protéines

Les teneurs en protéines des extraits sont dosées selon la méthode de Bradford (1976) pour déterminer les activités spécifiques des enzymes. La concentration en protéines est déterminée par référence à une courbe étalon établie à partir d'une solution de sérum albumine bovine (SAB).

### 2.6. DOSAGE D'ÉTHYLÈNE

Nous nous sommes intéressés à l'éthylène en tant que marqueur de stress (Fuhrer, 1982) sur des plants de maïs exposés au nickel.

Les graines de maïs sont stérilisées dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1 % pendant 15 min. Après trois rinçages à l'eau distillée, elles sont mises à germer sur coton imbibé d'eau distillée, en conditions stériles, pendant 36 heures à  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Pour la mise en culture, plusieurs supports ont été testés (coton, phytigel, agar, sable, et vermiculite) : l'agar présente la meilleure neutralité vis à vis du nickel, les autres supports diminuant sa disponibilité de sorte qu'aucune toxicité n'est observée aux doses de nickel habituelles (jusqu'à  $300 \mu\text{M}$ ). Des solutions d'agar (Difco) à  $6 \text{ g.l}^{-1}$  sont préparées, additionnées de concentrations croissantes de chlorure de nickel (0 à  $200 \mu\text{M}$ ) en milieu Hoagland 1/4. Chaque milieu est coulé dans des tubes préalablement autoclavés 20 min à  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ . Après refroidissement, chaque tube reçoit une plantule, puis est bouché à l'aide de bouchons stériles (le volume gazeux est alors environ de 80 ml). Les traitements sont répétés trois fois. Les cultures sont maintenues dans une chambre de culture, dans les conditions définies plus haut (§ 2.1.3).

Après 8 heures, 1 ml de gaz est prélevé à l'aide d'une seringue hypodermique et la concentration d'éthylène est déterminée par chromatographie en phase gazeuse (Shimadzu GC-8A). L'éthylène est identifié et quantifié en comparaison avec le temps de rétention et la hauteur du pic d'un milieu standard. Les tubes sont ensuite débouchés et protégés avec du coton, en attendant l'analyse suivante, de façon à permettre le renouvellement du milieu gazeux, nécessaire à une bonne croissance de la plante. Les analyses sont répétées durant huit jours. A ce stade, les plants recevant les doses élevées de nickel sont fortement intoxiqués.

## 2.7. MESURES DE LA PHOTOSYNTHÈSE ET DE LA CONDUCTANCE STOMATIQUE

Les mesures de photosynthèse et de conductance stomatique ont été faites sur des plants de maïs cultivés en serre. Elles ont été faites dans les mêmes conditions, au même moment, à l'aide du même appareil (LI-COR, LI-6200).

### 2.7.1. Mesure de la photosynthèse

La mesure de la photosynthèse est faite par analyse des échanges de CO<sub>2</sub> par infrarouge. Le principe est le suivant : on enferme une surface donnée de feuille dans une chambre reliée à l'analyseur. Les échanges de CO<sub>2</sub> sont ainsi analysés en continu.

Afin de maintenir dans la chambre une humidité relative constante et égale à celle de l'extérieur, le volume d'air de la chambre passe continuellement à travers un dessiccant (perchlorate de magnésium) avec un flux contrôlé.

L'appareil intègre ensuite différents paramètres, tels que la température, le taux de CO<sub>2</sub> et la pression de vapeur de la chambre, la transpiration de la feuille, la pression atmosphérique, et le flux à travers le dessiccant, pour calculer le taux de la photosynthèse de la feuille. Cette mesure correspond à la photosynthèse nette.

Les mesures sont faites sur plusieurs feuilles, prises séparément et sur la partie médiane de leur limbe. Les plants de maïs sont placés sous une lampe assurant un éclairage puissant (200  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  au niveau de la feuille) et stable. La température au niveau de la feuille est de 27 °C, et le taux de CO<sub>2</sub> dans la chambre de 350 ppm au début de la mesure. Seuls les pots sont déplacés, afin d'être dans des conditions identiques à chaque fois. Un temps de 15 min sous la lampe est respecté avant de commencer les mesures. Celles-ci ont été faites en fin de journée.

Les résultats sont la moyenne de six mesures (après réouverture de la chambre à chaque fois), chacune étant elle-même la moyenne de six mesures faites en continu pendant 3 secondes, évitant ainsi une influence de la diminution du taux de CO<sub>2</sub>.

### 2.7.2. Mesure de la conductance stomatique

La conductance stomatique traduit la facilité avec laquelle les stomates laissent s'échapper la vapeur d'eau, autrement dit l'ouverture stomatique.

Le principe est le suivant : on laisse transpirer une surface de feuille dans une chambre qui contient un microcapteur d'humidité. Après avoir fermé la chambre, l'appareil mesure le temps que met l'air de la chambre pour passer d'une humidité H1 à une humidité H2. On mesure ainsi la transpiration.

L'appareil intègre ensuite différents paramètres, tels que la température et la pression de vapeur de la chambre, celles à la surface de la feuille, la pression atmosphérique, la conductance "non stomatique", ainsi que la surface et le taux de transpiration de la feuille, pour enfin calculer la conductance stomatique. Cette mesure correspond à la moyenne des conductances stomatiques des deux faces de la feuille.

## 2.8. UTILISATION DU NICKEL RADIOACTIF

Étant donné la très grande sensibilité d'analyse de la technique (environ 50 dpm, soit  $2 \cdot 10^{-12}$  g de  $^{63}\text{Ni}$ ), l'utilisation des radioéléments permet de suivre des cinétiques d'absorption sur des temps très courts, de quelques minutes à quelques heures.

Le nickel radioactif  $^{63}\text{Ni}$  est particulièrement intéressant du fait de sa très longue demi-vie (125 ans), et de la faible énergie de ses rayonnements  $\beta^-$  ne nécessitant pas de protections lourdes (énergie maximum = 0,066 MeV, arrêtés par 5 cm d'air). Le produit est livré sous forme de  $^{63}\text{NiCl}_2$  dans HCl 0,5 M, avec une activité spécifique de  $465 \text{ MBq} \cdot \text{mg}^{-1}$  de Ni (Dupont de Nemours). Pour les expérimentations, 10  $\mu\text{l}$  de produit sont dilués dans 100 ml d'eau (activité totale : 7,4 MBq).

Les expériences ont été faites soit sur des racines de maïs excisées soit sur des plants de maïs entiers.

### *Absorption de $^{63}\text{Ni}$ par des racines excisées*

Les plants de maïs sont cultivés sur solution de Hoagland 1/4 dans les conditions définies plus haut (§ 2.1.3). Au bout de quatre jours, les racines sont excisées à 1 cm du noeud cellulaire (elles mesurent alors 8 à 10 cm). Les racines sont alors soit mises directement dans des solutions de Hoagland 1/4 contenant différentes quantités de  $^{63}\text{Ni}$ , soit mises dans de l'eau déminéralisée contenant  $^{63}\text{Ni}$  après avoir été rincées pendant 12 heures dans de l'eau pure avec aération. Les solutions de  $\text{NiCl}_2$  sont marquées à  $740 \text{ kBq} \cdot \text{l}^{-1}$  ( $20 \mu\text{Ci} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Des lots de huit racines (environ 1 g), avec 3 répétitions, sont mises à incuber dans les différents solutions radioactives.

### *Absorption de $^{63}\text{Ni}$ par des plants entiers*

Les plants de maïs sont cultivés sur solution de Hoagland 1/4 dans les conditions définies plus haut (§ 2.1.3). Au bout de sept jours, les plants sont transférés sur le même milieu contenant en plus du  $^{63}\text{NiCl}_2$  à  $740 \text{ kBq} \cdot \text{l}^{-1}$ .

### *Extraction et Dosage*

A la fin de l'incubation (de quelques minutes à quelques heures), les différents organes sont récupérés (les racines sont rincées 3 fois rapidement à l'eau déminéralisée), et les poids



frais sont déterminés. Les tissus, une fois hachés, sont mis dans des fioles contenant une solution de HCl 0,2 N dans un rapport tissu / milieu d'extraction d'environ 1g de MF / 30 ml.

Les flacons sont mis à agiter à 70 °C toute une nuit. Le dosage du nickel est effectué le lendemain. Le milieu d'extraction est mis en contact avec du liquide scintillant (ReadySafe, Beckmann) (1 ml d'extrait / 10 ml de scintillant). Le liquide scintillant est sensible aux radiations  $\beta^-$  émises par  $^{63}\text{Ni}$  : il émet alors des rayonnements lumineux (scintillation), dont le nombre est proportionnel au nombre et à l'intensité des particules  $\beta^-$  émises. Le nombre de rayonnements lumineux est détecté par un spectromètre à scintillation (Beckman LS 6000 SC), donnant les résultats en dpm (désintégrations par minute).

Le comptage s'effectue durant 2 minutes sur la fenêtre 0-600. Chaque échantillon est dosé 3 fois. Une légère scintillation artefactuelle (environ 220 dpm) est due à l'acidité du milieu d'extraction : celle-ci est retranchée pour les calculs. Un échantillon étalon d'activité et de concentration connues permet d'exprimer les résultats en ng de Ni.g<sup>-1</sup> MF. Le seuil de détection est estimé à 0,1 ng Ni.g<sup>-1</sup> MF.

## 2.9. TECHNIQUES DE LOCALISATION DU NICKEL

### 2.9.1. Localisation du nickel par microsonde électronique

Ce type d'appareil comporte une source émissive d'électrons, accélérés par différence de potentiel, et focalisés sur l'échantillon à analyser. L'interaction des électrons avec l'échantillon produit une émission de rayons X, caractéristiques des éléments qui le composent. Un détecteur analyse les émissions X, et donne la composition élémentaire de la zone analysée, en terme de concentration apparente. L'appareil est couplé à un microscope électronique (balayage ou transmission), permettant ainsi de visualiser la coupe et la zone analysée.

Il existe un rayonnement de fond inévitable et particulièrement important, si bien que pour émerger de ce bruit de fond de façon significative, un pic caractéristique doit correspondre à une concentration de l'élément concerné d'au moins 500 à 1000 ppm ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ). De plus, étant donné la structure anisotrope des échantillons végétaux, on doit considérer que l'on n'obtient, par cette méthode, que des concentrations relatives (par rapport à l'ensemble des éléments analysés) assez précises.

Les observations des coupes sont réalisées soit en microscopie électronique à balayage (MEB) soit en microscopie électronique à transmission (MET) :

#### *Microanalyse en MEB*

Les analyses sont effectuées sur des coupes provenant de plants de maïs cultivés en

hydroponie. Afin de conserver les éléments *in situ* lors de la préparation des échantillons, la fixation du matériel végétal doit être la plus rapide possible : des fragments d'organes de 5 mm sont immédiatement fixés à froid (- 70 °C) dans l'isopentane refroidi à l'azote liquide. Des coupes d'une épaisseur de 16 µm sont réalisées à - 30 °C à l'aide d'un cryomicrotome (Reichert-Jung, Cryocut E), et recueillies sur des lames de terphane. Après 48 heures à cette température, les coupes sont ramenées à température ambiante dans un dessiccateur. Les lames de terphane sont ensuite recouvertes d'une fine couche de carbone afin d'améliorer la conductivité des électrons, puis collées sur le porte-objet.

Les coupes sont observées et analysées au moyen d'un microscope électronique à balayage équipé d'un détecteur de rayons X en dispersion d'énergie (EDS) (Cambridge Instruments). La tension d'accélération des électrons est de 20 kV, l'intensité du courant du faisceau de 2,8 nA, et le temps de comptage de 100 sec. Le cobalt est utilisé comme référence.

Le diamètre et la profondeur de pénétration du faisceau d'électrons dans l'échantillon sont d'environ 5 µm. Les tirs sont dirigés sur les parois des cellules, l'intégrité cellulaire n'étant pas conservée par la méthode de cryo-fixation. Au moins 4 tirs sont réalisés pour chaque type cellulaire. L'analyse semi-quantitative est réalisée automatiquement par un logiciel analysant les spectres R-X. Les photographies présentées sont faites sur les électrons secondaires.

#### *Microanalyse en MET*

Les analyses sont effectuées sur des coupes provenant de plants de maïs cultivés en hydroponie. Les échantillons sont fixés dans un tampon phosphate 0,1 M (pH 7,2) contenant 2 % de glutaraldéhyde et 0,1 % de Na<sub>2</sub>S, pendant 12 heures à 4 °C. Les métaux sont alors fixés *in situ* sous forme de sulfure insolubles. Les échantillons sont ensuite déshydratés par des bains successifs d'acétone, puis d'oxyde de propylène, de degré croissant puis inclus dans la résine Spurr. Des coupes d'une épaisseur de 80 nm et 160 nm, réalisées à l'aide d'un ultramicrotome, sont recueillies sur des grilles en cuivre de 200-mesh, puis recouvertes d'une fine couche de carbone.

Les coupes sont observées au moyen d'un microscope électronique à transmission (JEOL JEM-2000 FX) et analysées par un détecteur de rayons X en dispersion d'énergie (Tracor Northern TN5500). La tension d'accélération des électrons est de 200 kV, l'angle entre l'objet et l'analyseur (take-off) de 72°, et le temps de comptage de 120 sec. Un programme d'analyse (SQMTF) permet d'ajuster les analyses sur des spectres de référence pré-mémorisés.

Le diamètre du faisceau est environ de 0,1 à 0,3 µm. Les tirs peuvent donc être dirigés précisément sur chaque organite de la cellule.

### 2.9.2. Révélation du nickel par autoradiographie

Nous avons réalisé des autoradiographies sur plante entière afin de localiser le nickel au niveau de la plante, et de visualiser sa migration et son accumulation. Le principe de la technique est basé sur la mise en contact d'une plante contenant l'élément radioactif avec un film sensible aux rayonnements émis par l'élément. Après révélation du film, celui-ci présente des zones d'autant plus noires que la concentration de l'élément dans la plante à ces endroits est importante.

Des plants de maïs ont été cultivés en hydroponie pendant un à huit jours, dans une solution de Hoagland 1/4 contenant du nickel radioactif à la dose de 740 ou 1480 kBq.l<sup>-1</sup> (voir le paragraphe 2.8 pour les détails du produit). L'expérience est faite de façon à ce que les plants aient le même âge à la fin de l'expérience. A la récolte, les racines sont rincés 2 fois pendant quelques secondes à l'eau déminéralisée, puis les plants sont séchés pendant 48 heures à 50 °C. Chaque plant est ensuite mis en contact, en chambre noire, avec un film sensible aux rayonnement  $\beta^-$  (Fuji, medical X ray Film, New RX). Le plant et le film sont pris en sandwich entre 2 plaques de verre épais reliées entre elles par un adhésif. Le tout est placé dans un sac en plastique noir. Les films sont entreposés au noir pendant 15 jours à température ambiante. Ils sont ensuite développés par un bain dans le révélateur (Kodak LX 24) pendant 5 min, un rinçage à l'eau distillée pendant 30 sec, un bain dans le fixateur (Kodak AL 4) pendant 5 min, rinçage à l'eau pendant 30 sec, et séchage.

### 2.9.3. Coloration du nickel par le diméthylglyoxime

Le diméthylglyoxime (DMG) donne avec les sels de nickel un précipité rouge très peu soluble (Charlot, 1974). La réaction est pratiquement spécifique. Ce produit est utilisé normalement en chimie minérale dans un but d'identification d'espèces atomiques en solution, et son utilisation pour localiser le nickel dans les tissus est délicate, en raison de la mobilité du précipité (voir la partie résultats).

Les meilleurs résultats ont été obtenus sur des parties d'organes frais, légèrement écrasées entre deux lames, et mis en contact avec une goutte de DMG (sel disodique octahydraté, Merck) à 0,1 % dans l'eau. Une coloration rose à rouge se développe en quelques minutes si une quantité suffisante de nickel est présente (au moins 50 mg.l<sup>-1</sup> accessibles au DMG. Voir la partie résultats). Après séchage à l'air, des photos sont prises à la loupe binoculaire.

### 2.9.4. Révélation du nickel par la méthode au sulfure d'argent

Cette technique est basée sur la transformation des métaux en sulfures métalliques insolubles par le sulfure de sodium (Danscher, 1981). Un sel d'argent est ensuite ajouté. Une coloration noire apparaît, correspondant à la réduction des ions argent sur les molécules de

sulfure métallique, ce qui permet de localiser l'emplacement des métaux contenus dans le tissu. La méthode au sulfure d'argent détecte pratiquement tous les métaux (sauf le mercure, et sauf certaines formes chimiques tel que le fer contenu dans les cytochromes).

Les échantillons sont prélevés sur des plants de maïs cultivés en hydroponie. Ils sont fixés dans un tampon phosphate 0,1 M (pH 7,2) contenant 2 % de glutaraldéhyde et 0,1 % de  $\text{Na}_2\text{S}$ , pendant 12 heures à 4 °C. Après déshydratation par des bains successifs d'éthanol de degré croissant, et inclusion dans une résine hydrosoluble (Kulrer 7100, Labonord), des coupes de 3  $\mu\text{m}$ , faites au microtome (LKB HistoRange), sont collectées sur des lames. Celles-ci sont recouvertes d'une solution de gélatine à 0,5 %, mise à sécher sur une platine chauffante, puis placées dans un récipient de façon à être recouvertes du milieu de développement, fraîchement préparé, de composition suivante : 60 ml de gomme arabique en tant que colloïde protecteur (500  $\text{g.l}^{-1}$ , filtré après agitation), 10 ml de tampon citrate 2 M (255 g d'acide citrique  $1.\text{H}_2\text{O}$  et 235 g de citrate de sodium  $2.\text{H}_2\text{O}$  pour un litre d'eau), 15 ml d'hydroquinone en tant qu'agent réducteur (56,6  $\text{g.l}^{-1}$ ), et 15 ml de lactate d'argent (7,3  $\text{g.l}^{-1}$ ). (celui-ci est ajouté juste avant utilisation). Après 90 min de réaction dans le noir à 26° C, les lames sont rincées à l'eau courante pendant 15 min, puis à l'eau distillée. Après séchage, elles sont montées dans du clearium. L'observation est faite soit en lumière blanche soit en fond noir. Dans le premier cas, les grains d'argent apparaissent en noir, dans le second en blanc, et ils correspondent à l'emplacement des métaux lourds.

## 2.10. OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES

### 2.10.1. Microscopie photonique (MP)

Les échantillons ont été prélevés sur des plants de maïs cultivés en hydroponie. Au bout de 8 jours de culture, les parties suivantes d'organes ont été prélevées : milieu du limbe de la seconde feuille à l'état mature, apex de la racine et "base" de la racine (zone située à 1 cm du noeud cellulaire). Ils ont été récoltés en même temps, en fin de journée, et immédiatement fixés dans un tampon phosphate 0,1 M (pH 7,2) contenant 2 % de glutaraldéhyde, pendant 24 heures à 4 °C. Une fois déshydratés graduellement par l'éthanol (50 %, 70 %, 90 % et 100 %, 1 h par bain), et inclus dans une résine hydrosoluble (Kulzer 7100, Labonord), les échantillons sont coupés au microtome (LKB HistoRange) à 3  $\mu\text{m}$  d'épaisseur.

#### *Coloration des protéines et des sucres*

Les coupes sont colorées par le réactif de Schiff (acide périodique 5 min, Schiff 10 min) et le naphthol blue-black (7 min), puis montées dans du clearium. Les protéines solubles ou non sont colorées en bleu (Fisher, 1968), et les dérivés glycosylés en rouge. Les coupes sont observées en microscopie photonique (Leitz-Leica), en contraste interférentiel.

### *Coloration des lignines*

Des coupes fraîches sont faites au vibratome à 40  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Elles sont ensuite colorées par le phloroglucinol-HCl (test de Wiesner) : 10 min de mise en contact avec une solution de phloroglucinol à 1 % dans l'éthanol à 95 °, puis montage dans HCl concentré. L'observation est faite immédiatement. Les parois lignifiées sont colorées en rouge.

### *Révélation du nickel*

La méthode de révélation du nickel au sulfure d'argent est décrite au paragraphe 2.9.4.

## **2.10.2. Microscopie électronique à transmission (MET)**

Les échantillons sont prélevés au même moment que pour la MP. Ils sont fixés dans un tampon phosphate 0,1 M (pH 7,2) contenant 2 % de glutaraldéhyde, puis avec  $\text{OsO}_4$  à 1 %. Après déshydratation par des bains successifs d'acétone, puis d'oxyde de propylène de degré croissant, les échantillons sont inclus dans la résine Spurr (Spurr, 1969). Les coupes ultrafines (80 nm) sont contrastées par le citrate de plomb et l'acétate d'uranyle. Les observations et les photos sont faites à l'aide d'un microscope électronique à transmission Hitachi H-7100.

## **2.10.3. Microscopie électronique à balayage (MEB)**

Les échantillons sont fixés dans un tampon phosphate 0,1 M (pH 7,2) contenant 2 % de glutaraldéhyde, pendant 24 heures à 4 °C. Ils sont ensuite déshydratés graduellement par l'éthanol (50 %, 70 %, 90 % et 100 %, 1 h par bain), puis soumis au contournement du point critique du  $\text{CO}_2$  (Homès, 1975). Les échantillons sont recouverts d'une pellicule d'or, puis collés sur un adhésif double-face sur le porte-objet. Les observations et les photos sont faites sur un microscope électronique à balayage Jeol JSM-6300 F opérant à 5 kV.

## **2.11. ANALYSES STATISTIQUES**

Dans les graphiques, les estimations de la variabilité des résultats sont données en terme d'écart-type de leur moyenne ( $m \pm sm$ ).

Dans les tableaux, la signification des différences entre les moyennes est déterminée à l'aide du test-t de Student au seuil de 5 %. Elle est indiquée par la plus petite différence significative (PPDS).

## CHAPITRE 3

---

### **BIODISPONIBILITÉ DU NICKEL DANS LES SOLS FERRALLITIQUES FERRITIQUES DE NOUVELLE-CALÉDONIE**

---



## 3

---

**BIODISPONIBILITÉ DU NICKEL  
DANS LES SOLS FERRALLITIQUES FERRITIQUES  
DE NOUVELLE-CALÉDONIE**

Les teneurs en nickel exceptionnellement élevées (environ 1 %) des sols ferrallitiques ferritiques du Sud de la Nouvelle-Calédonie peuvent-elles remettre en cause les efforts consacrés depuis une quinzaine d'années au développement agricole de cette petite région ? La question mérite d'être examinée : une part importante des problèmes rencontrés, par les maraîchers notamment, ne trouvent actuellement aucune explication classique (carences en éléments majeurs ou mineurs, difficultés phytosanitaires, etc.). Qui plus est, elle déborde du Sud calédonien et concerne l'ensemble des sols ferrallitiques ferritiques nickelifères de la Grande Terre et aussi, probablement, du monde (cf. Fig. 1.3).

La mobilité et la biodisponibilité du nickel issu de boues ou de sels ont été souvent étudiées (d'après Ademe et INRA, 1994). Par contre, les informations relatives à la mobilité du nickel préexistant du sol sont peu nombreuses. La revue bibliographique (chapitre 1) a montré que la mobilité et la biodisponibilité du nickel dans un sol dépendent des formes sous lesquelles il existe, ces dernières étant principalement liées aux caractéristiques minéralogiques et physico-chimiques du sol.

S'agissant des sols ferrallitiques ferritiques de Nouvelle-Calédonie, plusieurs auteurs (Nalovic et Quantin, 1972; Trescase, 1975; Schwertmann et Latham, 1986) ont mis en évidence que Ni est associé à des oxydes de fer, dont les teneurs sont très élevées (de 50 à 75 % environ, principalement de l'hématite et de la goéthite). L'étude de Bourdon et Becquer (1992) montre, de plus, que ces sols ont une capacité d'échange cationique très faible (quelques meq.100 g<sup>-1</sup>), car ils sont généralement dépourvus d'argile et ont peu de matière organique, hormis en surface. Par ailleurs, le pH est souvent acide, mais peut varier fortement selon la position du sol dans la toposéquence (entre 4,5 et 6,5). La mobilité de Ni pourrait donc varier de façon importante en fonction du faciès du sol ferrallitique ferritique et de ses caractéristiques physico-chimiques propres. Jusqu'à présent toutefois, dans ces sols en zones cultivables, les formes sous lesquelles le nickel existe, ses capacités de mobilité et d'absorption par les plantes ont été très peu précisées.

L'objectif des études relatées dans ce chapitre est ainsi de caractériser la mobilité et la biodisponibilité du nickel dans les principaux types de sols ferrallitiques ferritiques cultivables rencontrés dans le Sud de la Nouvelle-Calédonie.



### 3.1. CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Les travaux ont été conduits à l'aide de cultures sur vase de végétation (décrits au § 2.1) sur quatre échantillons de sol ferrallitique ferritique correspondant aux horizons 0-20 et 40-60 cm de deux faciès différents d'une même toposéquence. Cette dernière est située dans le bassin inférieur de la rivière La Coulée. Les faciès sont un faciès de piedmont présentant une pente de 15 % et un faciès de plaine. Ils ont été choisis en fonction de leur caractère arable, de leurs différences d'ordre physico-chimique et de leur représentativité à l'égard des sols de la région, d'après l'étude de Bourdon et Becquer (1992).

Environ 300 kg de sol de chaque horizon ont été prélevés sous végétation naturelle, en bordure de champ cultivé. Ils ont ensuite été tamisés à 6 mm, puis homogénéisés. Les techniques d'analyses employées sont décrites dans le chapitre 2.

Les principales caractéristiques physico-chimiques des quatre sols étudiés sont présentées dans le tableau 3.1.

Concernant l'étude de la mobilité du nickel dans ces sols, le Ni extractible par le DTPA 5 mM + CaCl<sub>2</sub> 0,01 M à pH 5,3 et celui extractible par le KCl 1 M ont été dosés sur chacun des quatre sols avant leur mise en pot. La solubilité du nickel dans ces sols a été déterminée par l'analyse de leur solution sur les vases de végétation avant le semis et à la récolte des plants. Les vases de végétation (volume de 4,7 litres) ont été remplis avec 5,1 kg de sol de plaine, ou 6,2 kg de sol de piedmont. Avant le remplissage des pots, pour lever leur carence en phosphore (Gourdon *et al.*, 1991), les sols ont été mélangés avec 2,3 g.kg<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (sous forme de superphosphate triple). Ils ont été mis et gardés ensuite à la capacité au champ, l'excès d'eau percolant étant remonté dans la cuvette d'irrigation tous les 2 à 3 jours. Trois jours avant chaque prélèvement des solutions de sol (à partir de la cuvette de réception des percolats ; Fig. 2.1), les volumes de percolats recyclés ont été ajustés précisément à 3 litres avec de l'eau déminéralisée. Trois prélèvements de solution ont été effectués dans ces conditions : le premier, 3 semaines après la mise à la capacité au champ, le second 8 jours après l'application des engrais liquides (cf. tableau 2.1), juste avant le semis, le troisième à la récolte des plants.

Le maïs (cv GH 5010) a été utilisé pour caractériser la biodisponibilité du nickel. A la récolte, outre les solutions de sol, les parties aériennes des plants et le nickel du sol extractible par le DTPA ont été analysés sur chaque pot. Le dispositif a été conçu de telle sorte que deux récoltes puissent être opérées, la première au 28<sup>ème</sup> jour de végétation, la seconde, étalée dans le temps mais réalisée au même stade de développement, lorsque les plants atteignaient 75 cm de hauteur à la ligule de la dernière feuille dégainée.

Pour simplifier l'écriture, le nickel extrait au DTPA 5 mM + CaCl<sub>2</sub> 0,01 M à pH 5,3 sera appelée Ni(DTPA). Il en sera de même avec Ni(KCl), représentant l'extraction au KCl 1 M, Ni(maïs) représentant les teneurs en Ni dans les parties aériennes du maïs après 28 jours de croissance, et Ni(solution) la concentration en Ni dans la solution du sol.

**Tableau 3.1. Principales caractéristiques physico-chimiques des sols ferrallitiques ferritiques de l'étude.** Pour chaque type de sol, les analyses ont été effectuées sur un échantillon moyen issu des 300 kg de sol tamisés à 6 mm et homogénéisés.

	Echantillon de sol Horizon (cm)	Plaine 0-20	Plaine 40-60	Piedmont 0-20	Piedmont 40-60
Granulométrie (%)	argile	21,3	17,6	24,1	17,0
	limon fin	39,7	43,8	40,0	45,4
	limon grossier	9,9	17,6	5,0	1,9
	sable fin	22,3	18,1	14,5	8,6
	sable grossier	6,8	2,8	16,3	27,1
Matière organique	totale (%)	3,6	2,5	3,2	0,7
	carbone (mg.g <sup>-1</sup> )	21,0	14,5	18,3	4,2
	azote (mg.g <sup>-1</sup> )	1,5	1,1	0,9	0,3
Eau du sol (%)	pF 2,5	41,0	40,7	28,1	19,8
	pF 4,2	22,7	23,5	18,0	13,6
pH	pH (H <sub>2</sub> O)	6,60	6,60	5,10	4,65
	pH (KCl)	6,20	6,20	5,70	6,05
Complexe d'échange (méq.100g <sup>-1</sup> )	Ca	2,42	1,13	0,31	0,04
	Mg	8,95	9,06	0,42	0,01
	K	0,45	0,16	0,13	0,03
	Na	0,22	0,13	0,13	0,03
	CEC	12,12	10,98	2,50	1,92
Phosphore (mg.g <sup>-1</sup> )	total	0,66	0,29	0,29	0,29
	assimilable	0,01	0,00	0,01	0,00
Eléments totaux (%)	perte au feu	14,04	13,00	13,64	12,25
	résidu	10,48	8,48	0,47	0,61
	SiO <sub>2</sub>	12,20	13,61	2,13	1,52
	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	7,60	7,52	7,16	7,68
	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	48,50	50,80	73,80	73,92
	MnO <sub>2</sub>	0,69	0,74	0,53	0,45
	TiO <sub>2</sub>	0,14	0,14	0,15	0,19
	CaO	0,14	0,09	0,02	0,01
	MgO	3,51	2,81	0,46	0,39
	K <sub>2</sub> O	0,01	0,01	0,00	0,00
	Na <sub>2</sub> O	0,01	0,01	0,00	0,00
	Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2,28	2,32	3,04	3,65
	CoO	0,10	0,10	0,06	0,05
	NiO	1,08	1,22	0,96	0,89
	(Ni en µg.g <sup>-1</sup> )	8490	9590	7540	7000

## 3.2. RÉSULTATS

### 3.2.1. Mobilité du nickel dans les sols ferrallitiques ferritiques

La mobilité d'un élément est son aptitude à passer dans les compartiments du sol où il est de moins en moins énergiquement retenu (Juste, 1988), le compartiment final étant la solution du sol. L'analyse de cette dernière doit par conséquent permettre de comparer les mobilités du nickel dans les différents sols de l'expérience.

Le tableau 3.2 présente les résultats des analyses effectuées avant le semis sur les solutions des quatre sols ferrallitiques étudiés, les échantillons ayant été prélevés avant et après application des engrais. La force ionique ( $\mu$ ) est calculée à partir des résultats de l'annexe 1, selon la formule  $\mu = (1/2) \cdot \sum C_i \cdot Z_i^2$ , où  $C_i$  est exprimé en mol.l<sup>-1</sup> (cf. annexe 6).

Pour le calcul du bilan (rapport de la quantité de Ni soluble sur la quantité totale de Ni dans 1 kg de sol), l'estimation de la quantité de Ni soluble par kg de sol a été réalisé de la manière suivante (3 étant le volume d'eau en litres dans la cuvette d'irrigation du pot) :

$$\begin{aligned} \text{Ni soluble (mg.kg}^{-1} \text{ de sol)} &= \text{Teneur Ni solution (mg.l}^{-1}) \times (\text{quantité de solution (l).kg}^{-1} \text{ de sol)} \\ &= \text{Teneur Ni solution (mg.l}^{-1}) \times (\text{pF}^{2,5}/100 + 3/\text{poids de sol par pot}) \end{aligned}$$

**Tableau 3.2. Solubilité du nickel dans les sols ferrallitiques ferritiques avant le semis.** Le nickel a été dosé dans la solution des sols, avant et après apport d'engrais. L'engrais est celui décrit dans le tableau 2.1.  $\mu$  est la force ionique de la solution du sol. Le bilan est le rapport de la quantité de Ni soluble sur la quantité totale de Ni dans 1 kg de sol. Les valeurs correspondent à des solutions issues de 12 vases de végétation et réunies entre elles.

Traitement		Plaine	Plaine	Piedmont	Piedmont
		0-20 cm	40-60 cm	0-20 cm	40-60 cm
avant engrais *	Ni (mg.l <sup>-1</sup> )	0,15	0,06	0,07	0,04
	$\mu$	0,013	0,008	0,019	0,031
	bilan (%)	0,0017	0,0006	0,0007	0,0004
après engrais	Ni (mg.l <sup>-1</sup> )	0,71	0,44	0,09	0,04
	$\mu$	0,067	0,061	0,030	0,047
	bilan (%)	0,0084	0,0046	0,0009	0,0004

\* hormis le superphosphate triple.

Avant l'apport d'engrais, on constate que le nickel est globalement très peu soluble (à la limite de la détection = 0,04 mg.l<sup>-1</sup>). Seul l'horizon de surface du sol de plaine libère du nickel dans la solution en quantité significative. Cette différence n'est pas due à une force ionique plus élevée de la solution (composition en annexe 1), qui aurait pu favoriser un déplacement du nickel du sol vers la solution par interactions ioniques. Il s'agit donc bien d'une caractéristique propre du sol.

Après l'apport d'engrais, par contre, une quantité importante de nickel est déplacée vers la solution, mais seulement dans le cas des sols de plaine. Par conséquent, le potentiel de mobilité du nickel paraît important en plaine, mais très faible en piedmont.

Il est intéressant de remarquer qu'en plaine, avec l'addition des engrais, les augmentations de  $\mu$  et de la concentration en Ni dans la solution sont du même ordre de grandeur. Ceci suggère qu'il existe une fraction relativement importante de nickel faiblement adsorbé dans les sols de plaine, pouvant être facilement déplacé vers la solution par l'addition de sels solubles. Par contre, dans les sols de piedmont, Ni serait sous des formes très peu solubles.

Les bilans du tableau 3.2 montrent qu'une fraction extrêmement faible du nickel présent dans ces sols est soluble (tableau 3.1).

Les résultats des extractions du nickel du sol par le KCl et le DTPA sont reportés dans le tableau 3.3. L'extraction au DTPA corrobore les différences observées au niveau de la solubilisation du nickel (cf. tableau 3.2) : le DTPA extrait beaucoup de Ni dans les sols de plaine, et très peu dans les sols de piedmont. La figure 3.1 met en évidence deux types de sols au comportement différent : les sols de piedmont libérant peu de Ni dans la solution et avec le DTPA, et les sols de plaine libérant beaucoup plus de Ni avec le DTPA et pouvant libérer des quantités relativement importantes de Ni dans la solution. Elle suggère aussi une relation entre Ni (DTPA) et Ni (solution). Une corrélation établie sur les deux nuages de points serait cependant hasardeuse. D'ailleurs, pour chaque horizon pris séparément, la quantité de Ni dans la solution semble pratiquement indépendante de la quantité de Ni(DTPA).

**Tableau 3.3. Quantité de nickel extrait par le KCl et le DTPA.** Les résultats, pour chaque type de sol, correspondent à un échantillon moyen issu des 300 kg de sol tamisé et homogénéisé. Le bilan est le rapport de la quantité de Ni extrait sur la quantité totale de Ni dans 1 kg de sol.

		Plaine 0-20 cm	Plaine 40-60 cm	Piedmont 0-20 cm	Piedmont 40-60 cm
Nickel (KCl)	( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )	8,4	7,1	9,2	2,7
	bilan (%)	0,0990	0,0750	0,1220	0,0386
Nickel (DTPA)	( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )	84,2	74,3	18,5	1,3
	bilan (%)	0,9918	0,7750	0,2453	0,0186

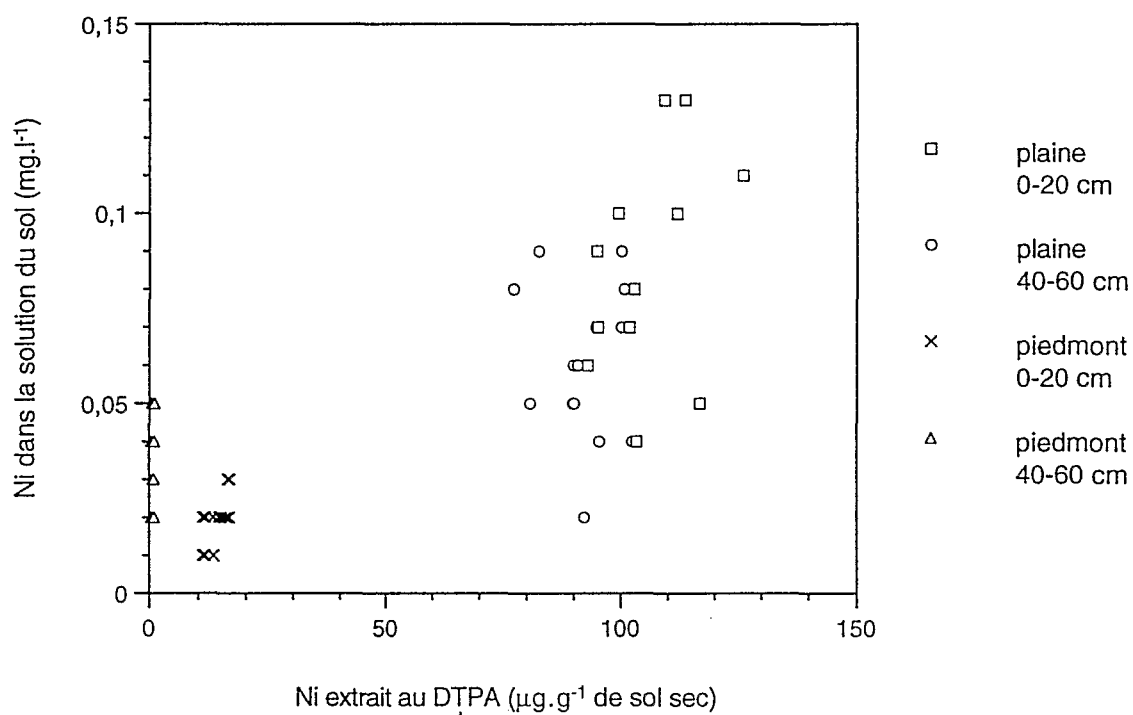
Par contre, le nickel extrait par le KCl montre peu de différences entre les sols, seul celui de piedmont 40-60 libérant peu de Ni (tableau 3.3). De plus, Ni(KCl) ne semble pas être étroitement lié avec Ni(solution) (avec engrais) ou avec Ni(DTPA) (tableaux 3.2 et 3.3). Le Ni(KCl) ne serait donc pas un bon indicateur de la mobilité du nickel. Cependant, on constate qu'il est corrélé avec la teneur en matière organique du sol ( $r = 0,968$ , significatif au seuil de 5 %, d'après les données des tableaux 3.1 et 3.3), et pourrait par conséquent représenter la fraction de Ni liée à la matière organique.

La littérature indiquant que Ni est associé aux oxydes de fer, une extraction du fer par le DTPA a été effectuée sur les sols de l'étude, afin de voir si les différences de mobilité du nickel constatées avec le DTPA pouvaient être liées à des différences de mobilité du fer. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.4. Ils montrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre le piedmont 0-20 cm et les sols de plaine, suggérant que les différences de mobilité de Ni entre la plaine et le piedmont ne sont pas dues à des différences de mobilité du fer.

**Tableau 3.4. Quantités de fer et de nickel extraits par la DTPA.** Les résultats, pour chaque type de sol, correspondent à un échantillon moyen issu des 300 kg de sol tamisé et homogénéisé.

	Plaine 0-20 cm	Plaine 40-60 cm	Piedmont 0-20 cm	Piedmont 40-60 cm
Fe (DTPA) ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )	119,7	92,4	117,6	27,3
Ni (DTPA) ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )	84,2	74,3	18,5	1,3

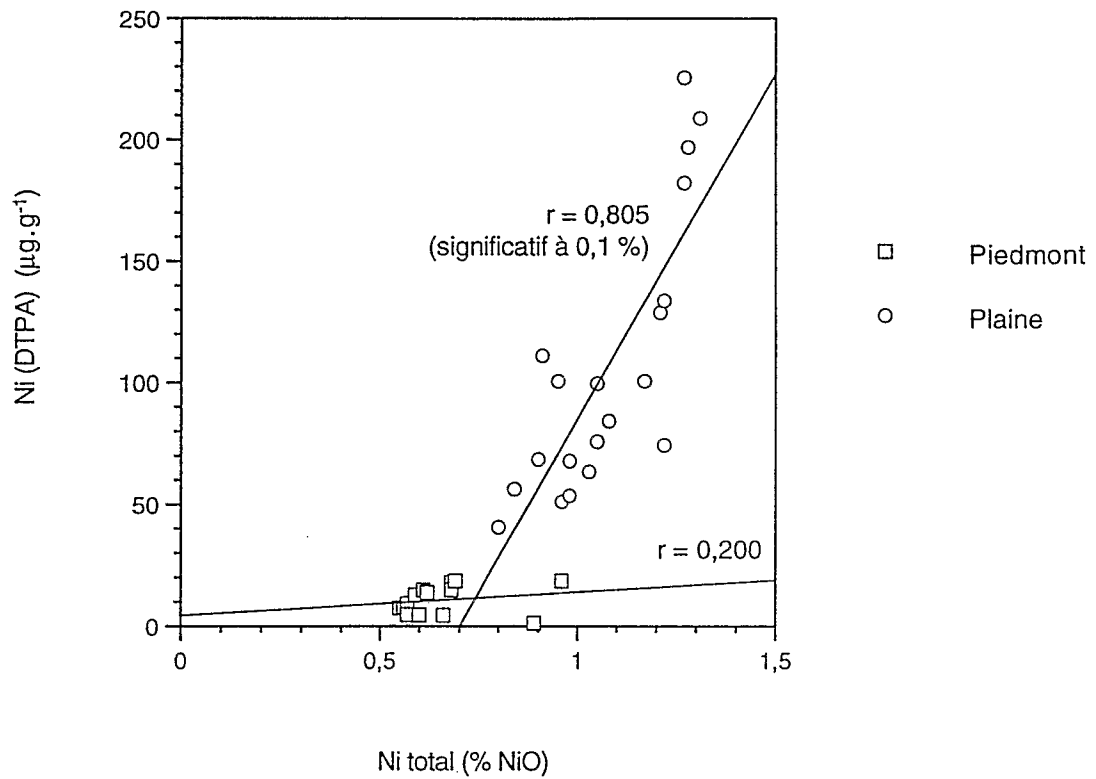
Le tableau 3.5 permet de comparer les teneurs totales en nickel avec les quantités de Ni extrait par le DTPA. D'une manière générale, on constate que les sols de piedmont ont moins de Ni total et libèrent moins de Ni avec le DTPA que les sols de plaine. La figure 3.2 montre cependant qu'il n'existe pas de corrélation au niveau des sols de piedmont : dans ce cas, il semble que le Ni total puisse varier sans que Ni(DTPA) ne varie, ce qui confirme la faible mobilité de Ni en piedmont. En plaine, par contre, la corrélation est élevée ( $r = 0,805$ , significatif au seuil de 0,1 %) : dans ce cas, les variations de teneurs en formes mobiles pourraient être liées aux variations de teneur totale en Ni.



**Fig. 3.1. Relation entre la concentration en Ni dans la solution du sol et la concentration en Ni extrait du sol par le DTPA.** Les analyses ont été faites à la fin de la culture du maïs (28 jours). Chaque point correspond à un couple de valeurs observées sur un pot.

**Tableau 3.5. Teneurs totales en Ni et quantités extraites par le DTPA dans différents sols ferrallitiques ferritiques du Sud de la Nouvelle-Calédonie. Les données figurant dans ce tableau proviennent de la présente étude (\*) et des travaux d'Edighoffer (1993) (horizon 0-20 cm).**

Position du sol	NiO total (%)	Ni (DTPA) ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
Piedmont	0,96 *	18,5 *
	0,89 *	1,3 *
	0,66	4,5
	0,68	17,9
	0,61	14,8
	0,68	14,9
	0,62	13,7
	0,69	18,5
	0,59	12,8
	Plaine	1,08 *
1,22 *		74,3 *
1,27		182,1
1,27		225,4
0,91		111,1
0,84		56,3
0,90		68,5
1,05		75,8
0,80		40,6
0,98		53,6
0,95		100,6
1,05		99,6
1,03		63,4
0,98		67,8
0,96		51,1
1,22		133,7
1,21		128,8
1,31	208,8	
1,28	196,8	
1,17	100,6	



**Fig. 3.2.** Corrélations entre la teneur totale en nickel et la teneur en nickel extrait par le DTPA dans les sols ferrallitiques ferritiques de piedmont et de plaine. Données provenant de la présente étude, et des travaux d'Edighoffer (1993).



### 3.2.2. Biodisponibilité du nickel dans les sols ferrallitiques ferritiques

La biodisponibilité d'un élément est son aptitude à être absorbé par un organisme vivant à partir d'un compartiment quelconque du sol (Juste, 1988). Pour caractériser celle du nickel dans les sols ferrallitiques ferritiques, nous avons donc utilisé le maïs comme plante-test. Pour mémoire (cf. § 3.1), deux récoltes ont été effectuées :

- sur des plants de même âge (28 jours) ;
- sur des plants ayant le même stade de développement, ceci afin de pallier une éventuelle relation inverse entre teneurs et stade de développement (les teneurs en nutriments diminuant régulièrement dans les parties aériennes au cours du développement).

Sur les plants de même âge, on constate tout d'abord que les racines et les parties aériennes ont une plus faible croissance sur les sols de plaine (0-20 cm et surtout 40-60 cm) que sur les sols de piedmont (Fig. 3.3a). Le poids de matière sèche des plants cultivés en plaine 40-60 cm est significativement différent de celui des plants cultivés sur les trois autres sols. L'analyse des parties aériennes révèle que les plants les plus petits ont les teneurs en nickel les plus élevées (Fig. 3.3b). Les différences de teneur en Ni sont toutes hautement significatives (à 1%).

Sur les plants récoltés au même stade de développement (Fig. 3.4), les analyses confirment que les plants cultivés en plaine absorbent le plus de nickel, surtout sur l'horizon 40-60 cm. Les teneurs en Ni sont toujours significativement différentes. Il semble donc bien exister une relation étroite entre la teneur en Ni dans les parties aériennes du maïs et la diminution de la croissance des parties aériennes et des racines, ce que tendent à confirmer les coefficients de corrélations hautement significatifs de la figure 3.5. Ceci suggère que le ralentissement de la croissance des plants cultivés sur l'horizon 40-60 cm de la plaine est dû à une intoxication par le nickel.

D'après la figure 3.6 a, il ne semble pas exister de corrélation entre les teneurs en Ni dans les parties aériennes des maïs et les concentrations en Ni dans les solutions des sols lors de la récolte des plants. Par contre, il pourrait exister une relation entre les teneurs en Ni du maïs et le nickel extrait au DTPA. En effet, la figure 3.6 b met nettement en évidence au moins deux types de sol au comportement différent : ceux de piedmont, où Ni est peu extrait au DTPA et peu absorbé par la plante, et ceux de plaine, où Ni est fortement extrait au DTPA et assez fortement absorbé (surtout plaine 40-60 cm). Toutefois, le sol de plaine 0-20 cm se distingue par une forte extraction au DTPA et une absorption modérée.

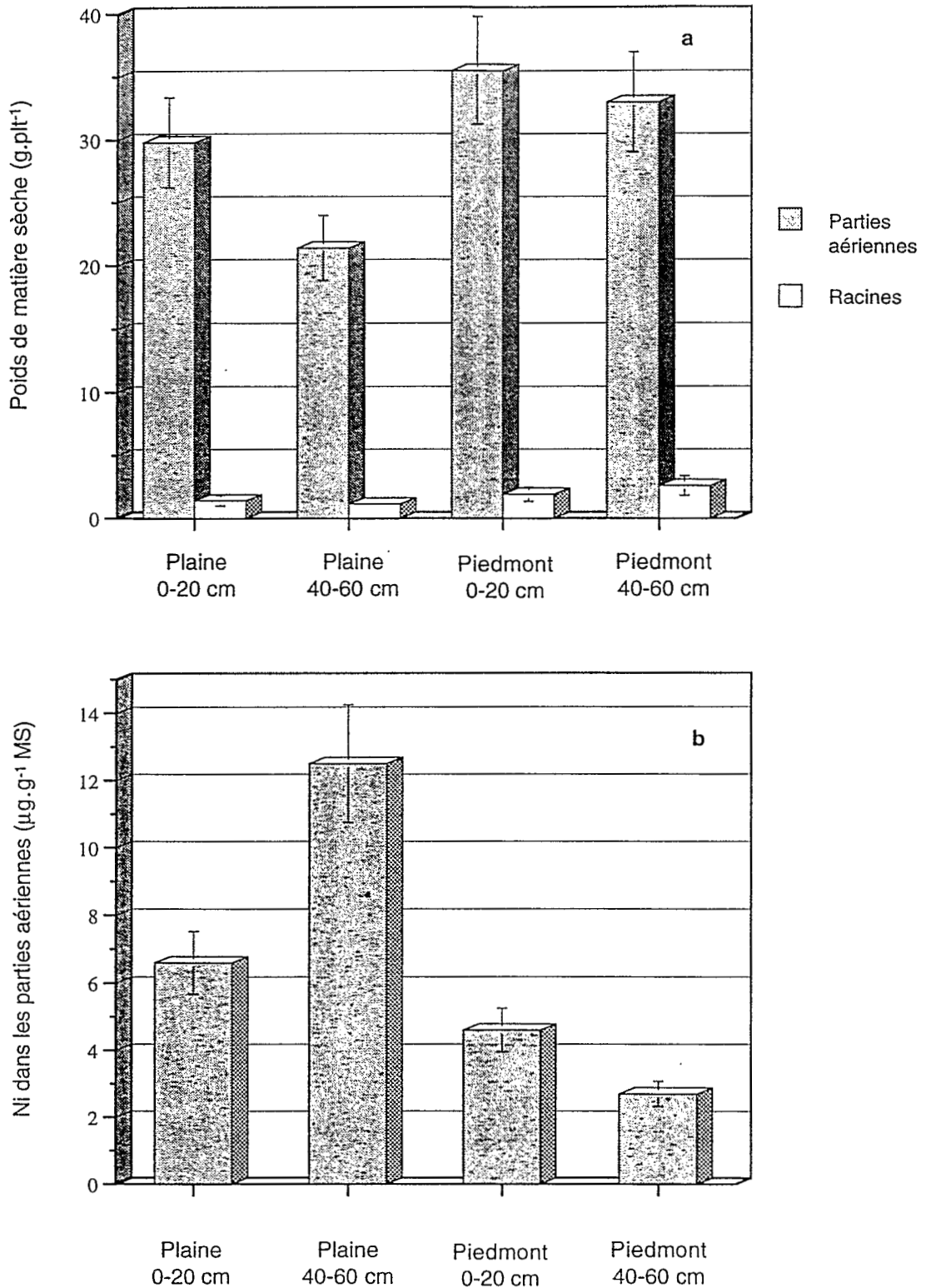


Fig. 3.3. Poids de matière sèche des parties aériennes et des racines (a), et teneurs en nickel des parties aériennes (b) du maïs cultivé pendant 28 jours sur les quatre sols ferrallitiques ferritiques de l'étude. Les barres verticales représentent le double de l'écart-type mesuré sur 10 répétitions.

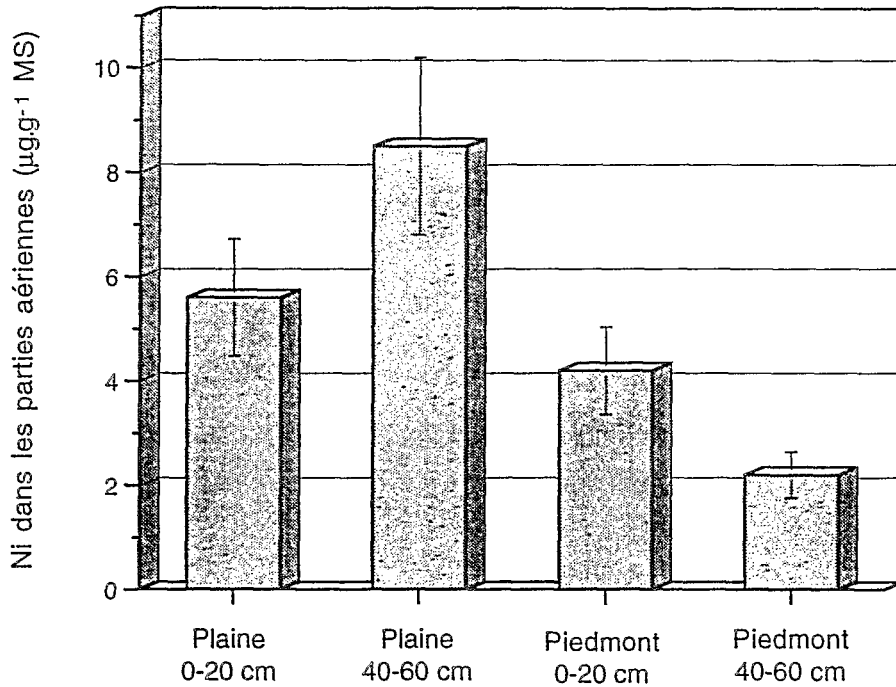


Fig. 3.4. Teneurs en nickel des parties aériennes des plants de maïs cultivés sur les quatre sols ferrallitiques ferritiques de l'étude, et récoltés au même stade de développement. Les plants ont été récoltés au stade 75 cm de haut au niveau de la ligule de la dernière feuille dégainée. Les barres verticales représentent le double de l'écart-type mesuré sur 10 répétitions.

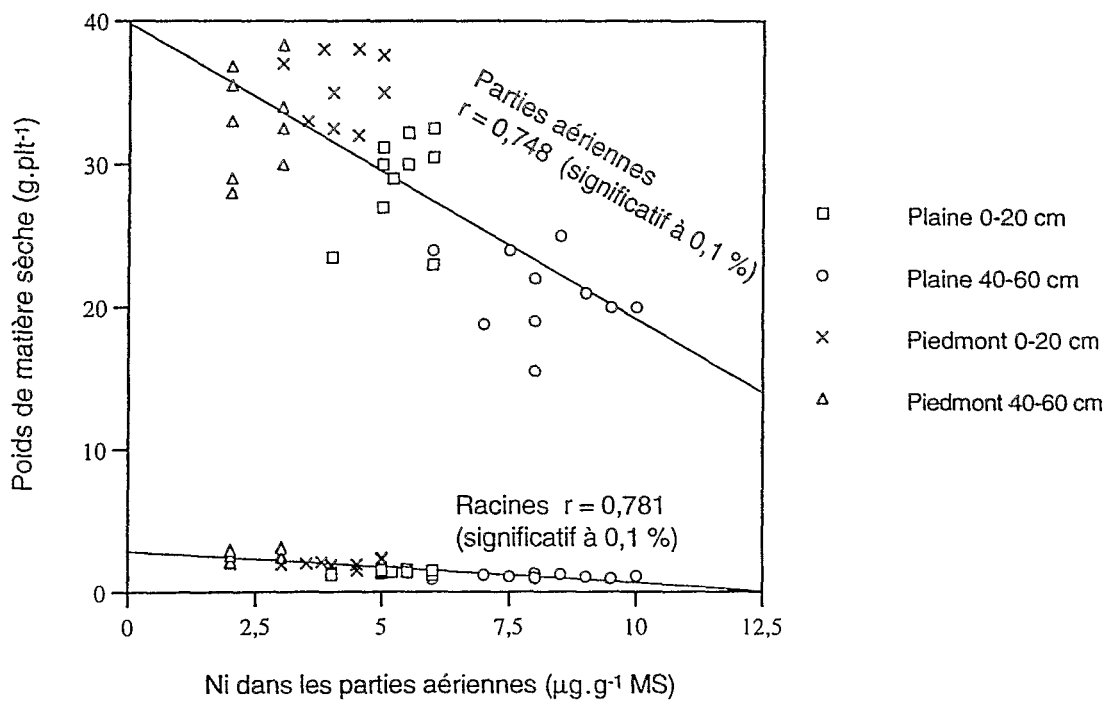


Fig. 3.5. Corrélations entre les poids de matière sèche au 28ème jour des parties aériennes d'une part, des racines d'autre part, et les teneurs en Ni dans les parties aériennes du maïs récolté au même stade de développement. Chaque point correspond à un couple de valeurs observées sur un pot.

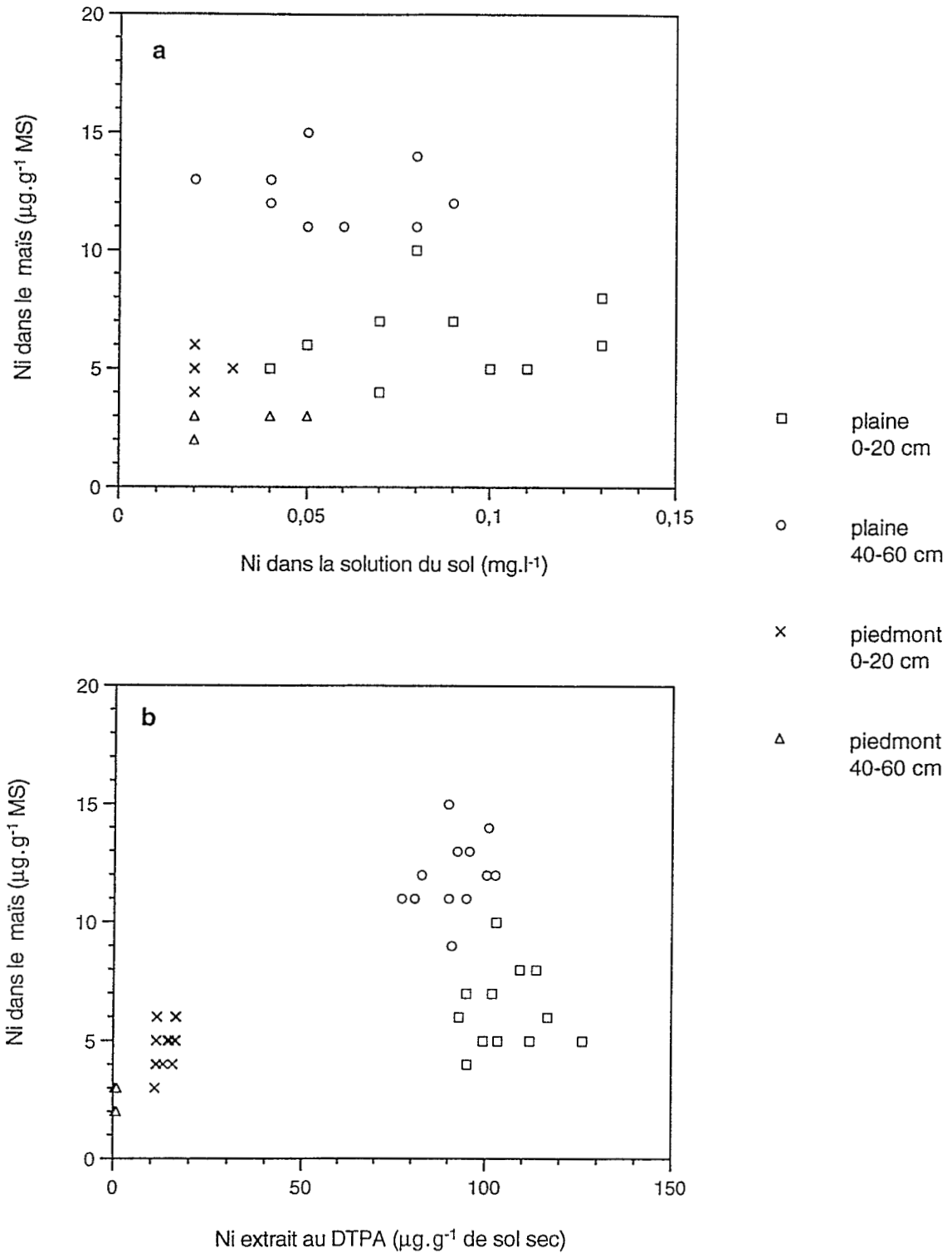


Fig. 3.6. Relations, au 28<sup>ème</sup> jour, entre la teneur en Ni dans les parties aériennes du maïs et la concentration en Ni dans la solution du sol (a), ou la concentration en Ni extrait du sol par le DTPA (b). Le maïs a été cultivé en serre sur les quatre sols ferrallitiques ferritiques de l'étude. Chaque point correspond à un couple de valeurs observées sur un pot.

**Tableau 3.6. Constantes de stabilité de quelques complexes formés avec Ni. Données par le logiciel Geochem, à pH 6,0.**

Complexant	Log K
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,4
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	2,3
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	8,4
Citrate	6,6
Malate	3,8
Acétate	1,2
Oxalate	5,2
Acide fulvique	2,5 à 4,2
EDTA	20,1
DTPA	22,3

### 3.3. DISCUSSION ET CONCLUSION

Cette étude montre l'existence de variations importantes de mobilité et de biodisponibilité du nickel entre les sols ferrallitiques ferritiques de plaine et ceux de piedmont d'une part, entre leurs horizons de surface et de profondeur d'autre part.

En piedmont, le nickel est très faiblement soluble, très peu mobile et peu assimilable (tableaux 3.2 et 3.3; Fig. 3.3). Les formes de nickel présentes dans les horizons de profondeur (40-60 cm) sont certainement les formes les plus stables pouvant être rencontrées sur les sols ferrallitiques ferritiques. En effet, alors que le DTPA est un extractant beaucoup plus puissant que le KCl, tous deux extraient très peu de Ni. En surface (0-20 cm), l'augmentation de l'extraction par le KCl, de même que l'augmentation de l'absorption par le maïs, sont vraisemblablement liées à l'augmentation de la teneur en matière organique (tableau 3.1). Le KCl 1 M permet en effet l'évaluation des formes échangeables (Roth *et al.*, 1971; Sauerbeck et Hein, 1991). Or, en piedmont, seule une différence de matière organique peut expliquer une différence de capacité d'échange, des études (Latham *et al.*, 1978) ayant montré l'absence d'argiles minéralogiques (celles notées dans le tableau 3.1 sont en fait des particules fines de la taille des argiles). Le  $\Delta pH$  négatif ( $pH_{H_2O} - pH_{KCl}$ ), surtout en profondeur, suggère même l'existence d'une capacité d'échange nette anionique (Falavier, 1985; Faivre, 1988). Ainsi, les seules formes de nickel biodisponibles en piedmont sont apparemment liées à la matière organique, et représentent seulement 0,04 à 0,12 % du nickel total (tableau 3.3).

En plaine, le nickel est plus soluble, plus mobile et plus disponible pour la plante qu'en piedmont (tableaux 3.2 et 3.3; Fig. 3.3). En effet, une faible augmentation de la force ionique de la solution par un apport d'engrais classique favorise la mise en solution du nickel. Cette solubilisation de Ni ne semble pas due à la formation de complexes de grande stabilité avec les sels ajoutés par le traitement ( $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$  en particulier), car les constantes de stabilité de ces derniers sont faibles (tableau 3.6). Il existerait donc sur ce faciès des formes de nickel facilement échangeables avec la solution du sol. Par contre, alors que le maïs absorbe beaucoup de Ni en plaine, le KCl n'en extrait pas plus en plaine qu'en piedmont 0-20 cm. Au regard de l'augmentation de la CEC en plaine, il est tentant de suspecter ce paramètre comme étant responsable de l'augmentation de l'absorption de Ni. Mais l'extraction par le KCl aurait alors dû augmenter également, ce qui n'est pas le cas. Ceci suggère finalement que les formes biodisponibles en plaine ne sont pas liées à la CEC, mais à d'autres modes de liaison, non affectées par le KCl 1M. Il est possible que le DTPA puisse extraire de telles formes, étant données les fortes quantités de nickel extraites en plaine par rapport au piedmont (Fig. 3.6b). D'après la littérature, le DTPA pourrait extraire une partie des métaux liés aux oxydes de fer ou de manganèse (Juste, 1988). Noble et Hughes (1991) ont montré que l'EDTA, un extractant très proche du DTPA, extrait le nickel lié aux oxydes de fer sur des

sols développés sur serpentinite. Cette hypothèse est plausible dans la mesure où de nombreux auteurs ont montré l'existence d'associations entre le nickel et les oxydes de fer dans les sols ferrallitiques ferritiques de Nouvelle-Calédonie (Nalovic et Quantin, 1972; Trescase, 1975; Schwertmann et Latham, 1986). Ainsi, il existerait des formes de nickel biodisponibles liées à des oxydes de fer. Si l'extraction par le DTPA représente effectivement cette fraction, alors elle représente 0,8 à 1 % du nickel total en plaine (tableau 3.3).

Se pose alors la question de savoir pourquoi le DTPA extrait davantage de Ni en plaine qu'en piedmont, alors que les sols de piedmont contiennent davantage d'oxydes de fer. Trois explications semblent possibles, qui ne s'excluent pas :

(1) les sols de plaine sont plus riches en nickel total que ceux de piedmont (tableau 3.5). D'autres études confirment ce résultat (Bourdon et Becquer, 1992; Edighoffer, 1993). De plus, la figure 3.2 suggère que les variations de la teneur totale en plaine sont liées à des variations de la teneur en formes mobiles extractibles par le DTPA. Cet enrichissement en nickel extractible pourrait provenir soit d'une lixiviation amont-aval (Trescase (1975) a montré que Ni est plus mobile que Fe au cours de l'altération de la péridotite), soit de l'apport par alluvionnement ou colluvionnement de matériaux frais encore peu altérés ;

(2) les sols de plaine sont moins riches en oxydes de fer (tableau 3.1) susceptibles de fixer fortement Ni. Le nickel pourrait alors être lié à d'autres matériaux en plaine (apportés par alluvionnement) sous des formes moins stables ;

(3) il existe plusieurs types d'oxydes de fer ayant des affinités différentes pour Ni. En effet, les sols ferrallitiques ferritiques de Nouvelle-Calédonie en contiennent principalement deux types : la goethite (oxyde de fer hydraté :  $\text{FeO}_2\text{H}$ ) et l'hématite ( $\alpha \text{Fe}_2\text{O}_3$ ). Schwertmann et Latham (1986) ont montré sur ces sols que la goethite contient plus de nickel que l'hématite (0,6 à 2 % contre 0,2 à 1 % de Ni extrait par le citrate-bicarbonate-dithionite) et, d'autre part, que les sols de plaine ne contiennent pratiquement que de la goethite, alors que les sols de piedmont contiennent les deux types d'oxydes de fer avec une augmentation du taux d'hématite vers la surface. Par ailleurs, les surfaces spécifiques de la goethite sont supérieures à celles de l'hématite (57 à 139 contre 62 à 82  $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ ) (Schwertmann et Latham, 1986), suggérant l'existence d'échanges plus intenses entre la solution et la goethite. Cette troisième explication est préférable aux deux premières dans la mesure où elle permet de rendre compte des différences de biodisponibilité de Ni entre les deux horizons de plaine (Fig. 3.3), l'horizon de profondeur étant probablement plus riche en oxydes de fer hydratés (comme la goethite), car des études ont montré l'existence d'une hydromorphie temporaire à ce niveau (Bourdon et Becquer, 1992). Par conséquent, ces derniers résultats, associés à ceux de cette étude, suggèrent que le nickel associé à la goethite est en partie biodisponible, alors que le nickel associé à l'hématite ne l'est quasiment pas.

Les teneurs en Ni dans le maïs ne sont pas corrélées avec les concentrations en Ni dans les solutions des sols ferrallitiques ferritiques lors de la récolte des plants (Fig. 3.6a). La relation pourrait avoir été biaisée par un épuisement progressif du Ni dans la solution par le maïs. Mais les concentrations reportées dans le tableau 3.2 (avant culture) et la figure 3.6a (après culture) ne semblent pas indiquer un tel épuisement. Par contre, les quantités extraites par le DTPA semblent liées avec les teneurs en Ni dans la solution et dans les parties aériennes du maïs (Fig. 3.1 et 3.6b), ce qui suggère que ce réactif est relativement efficace pour évaluer la mobilité et la biodisponibilité du nickel dans les différents types de sols ferrallitiques ferritiques. L'intérêt du test au DTPA, mis au point par Lindsay et Norvell (1978), a été confirmé par d'autres études (McLean et Dekker, 1978; Sauerbeck et Hein, 1991; Juste et Tauzin, 1992; Elkhatab, 1994). Cependant, le DTPA ne montre pas les différences de biodisponibilité du Ni observées avec le maïs entre les horizons 0-20 cm et 40-60 cm de la plaine. Il est possible que le temps d'extraction soit trop court (1 heure), et que certaines réactions (réductions, ...) pouvant apparaître sur des temps plus longs ne soient pas mises en jeu lors de l'extraction.

Concernant les niveaux atteints dans la solution des sols ferrallitiques ferritiques et dans les parties aériennes du maïs, ceux obtenus sur les sols de piedmont ne sont probablement pas toxiques, alors que ceux obtenus sur les sols de plaine, et surtout sur l'horizon 40-60 cm, sont susceptibles d'être toxiques étant donné le ralentissement significatif de la croissance du maïs.

La littérature fournit peu d'informations sur des teneurs en nickel toxiques dans la solution du sol. Il semble que les concentrations normales se situent aux environs de  $0,02 \text{ mg.l}^{-1}$ , et que des concentrations supérieures à  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  soient toxiques pour les végétaux (Uren, 1992). D'après le tableau 3.2, les solutions des sols de piedmont sont dans une gamme non toxique. Par contre, les solutions des sols de plaine ont largement plus de  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  de Ni avec l'apport d'engrais et seraient par conséquent toxiques. De plus, il est probable que les solutions des sols ferrallitiques ferritiques soient plus concentrées en plein champ, le rapport sol / solution du sol étant plus élevé dans ces conditions que sur le vase de végétation, du fait de la réserve d'eau de ce dernier. Toutefois, ce seuil de  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  est à prendre avec précaution étant donné les grandes différences d'ordre physico-chimiques existant entre les différents sols cités dans la littérature et pouvant modifier fortement l'activité du nickel en solution.

S'agissant de la plante, la définition d'un seuil toxique est probablement plus aisée, car elle dépend principalement du génotype, du stade de développement et de l'organe analysé. Ainsi, d'après Chang *et al.* (1992),  $3 \mu\text{g Ni.g}^{-1}$  MS dans les feuilles suffiraient à induire un ralentissement de la croissance du maïs de 50 %. D'après Wallace (1989a),  $8,4 \mu\text{g.g}^{-1}$  MS dans les parties aériennes du maïs âgé de 18 jours induisent un ralentissement de la croissance de 6 %. Par conséquent, il apparaît que le maïs cultivé en plaine (horizon 40-60 cm) sur les



sols ferrallitiques ferritiques est intoxiqué par le nickel, puisque la teneur en Ni dans ses parties aériennes est de  $12,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MS. Toutefois, ce résultat mérite d'être précisé dans la mesure où les plants n'ont pas été récoltés au même stade de développement que ceux cités dans la littérature. Il semble néanmoins que les risques de phytotoxicité soient élevés en plaine sur ces types de sols, car l'étude d'Edighoffer (1993) montre que de nombreux végétaux cultivés en plaine ont des teneurs en Ni supérieures à  $50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MS, teneurs considérées comme toxiques pour la plupart des végétaux (Vanselow, 1966). De plus, les analyses minérales des parties aériennes des maïs (annexe 2) suggèrent qu'il n'y a aucun élément qui puisse expliquer la faible croissance des plants sur les sols de plaine par rapport au piedmont. Une concentration excessive en Ni dans le maïs pourrait donc bien être la cause majeure de la faible croissance observée en plaine.

S'agissant des quantités extraites par le DTPA, trop peu d'informations sont encore disponibles sur les sols ferrallitiques ferritiques pour pouvoir associer un niveau d'extraction à un niveau de phytotoxicité. D'après cette étude, il est probable que  $20 \mu\text{g Ni}\cdot\text{g}^{-1}$  extrait avec le DTPA en piedmont correspondent à un faible risque de toxicité, alors que  $80 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  extrait en plaine 40-60 cm correspondent à un niveau toxique pour le maïs. De plus, certains sols de plaine possèdent plus de  $200 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de Ni extractibles par le DTPA (Edighoffer, 1993).

Par ailleurs, la comparaison des teneurs totales dans les sols ferrallitiques ferritiques de Nouvelle-Calédonie avec la norme AFNOR NFU 44-041 (AFNOR, 1985) est assez surprenante. En effet, cette dernière préconise que les boues d'épuration ne doivent pas être épandues sur les sols dont les teneurs totales en Ni dépassent  $50 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Or les sols de piedmont dans cette étude ont plus de  $7000 \text{mg Ni}\cdot\text{kg}^{-1}$  (parmi les plus fortes au monde), sans risques apparents de phytotoxicité. Par conséquent, la norme AFNOR apparaît imprécise, et il serait souhaitable qu'elle soit redéfinie, comme cela a déjà été proposé (Ademe, 1994; Buatier, 1994), en tenant compte du potentiel de biodisponibilité du nickel du sol, ou au moins de certaines de ses caractéristiques physico-chimiques.

En conclusion, il ressort que sur les sols ferrallitiques ferritiques de piedmont, la fraction de nickel biodisponible serait lié uniquement à la matière organique. Cette fraction est très faible, ce qui explique la faible absorption par le maïs. On peut donc estimer que les risques de phytotoxicité sont faibles en piedmont.

En plaine, la fraction de nickel biodisponible est probablement sous deux formes : Ni lié à la matière organique, et Ni lié à des oxydes de fer hydraté (goethite). La première fraction semble de faible importance, alors que la seconde serait relativement élevée et potentiellement mobile, expliquant la forte absorption par le maïs. Les risques de phytotoxicité sont certainement élevés en plaine. On peut noter que le pH est proche de la neutralité, et il serait intéressant de vérifier que sa diminution peut augmenter l'absorption du nickel par les végétaux, comme cela a souvent été signalé (Mizuno, 1968; Allinson et Dzialo,

1981; Lübben et Sauerbeck, 1991; Sauerbeck et Hein, 1991). Il serait également nécessaire de préciser les différences de biodisponibilité du nickel en relation avec les types d'oxydes de fer en présence.

L'extraction du nickel des sols ferrallitiques ferritiques par le DTPA est relativement efficace pour comparer la mobilité de Ni entre les différents faciès de sols, et pour évaluer sa biodisponibilité dans les sols ferrallitiques ferritiques cultivables. Cependant, la plante constitue encore le meilleur indicateur de la biodisponibilité du nickel dans ces sols.

Les concentrations en nickel dans la solution des sols ferrallitiques ferritiques et dans les parties aériennes du maïs semblent être toxiques en plaine, surtout sur l'horizon 40-60 cm. La détermination du seuil de toxicité du nickel pour le maïs, à la fois dans ses parties aériennes et dans la solution devrait nous permettre de statuer précisément sur les niveaux atteints sur les sols ferrallitiques ferritiques. Ce travail est présenté dans le chapitre suivant.



## RÉSUMÉ

L'étude de la mobilité et de la biodisponibilité du nickel dans les sols ferrallitiques ferritiques de Nouvelle-Calédonie révèle des variations très importantes de ces paramètres suivant la position du sol dans le paysage et suivant l'horizon.

Dans les sols de piedmont, le nickel présent est très peu mobile et très peu disponible pour la plante, que ce soit en surface ou en profondeur. Seule une très faible fraction échangeable existe dans les horizons de surface, liée à la présence de matière organique. Dans ces conditions, les risques de phytotoxicité sont certainement très faibles.

Dans les sols de plaine, par contre, la fraction de Ni biodisponible n'est pas négligeable, comme en témoigne l'absorption importante de Ni par le maïs, surtout dans les horizons de profondeur (40-60 cm). Cette fraction serait constituée de nickel lié à de la matière organique et de nickel lié à de la goethite. La faible croissance des plants, associée à des teneurs en Ni dans les parties aériennes probablement toxiques montre que, dans ces conditions, les risques de phytotoxicité sont élevés.

L'extraction du nickel des sols par le DTPA 5 mM + CaCl<sub>2</sub> 0,01 M à pH 5,3 corrobore assez bien les différences de mobilité et de biodisponibilité constatées précédemment entre les sols de piedmont et de plaine. Ce réactif est donc susceptible de permettre un diagnostic précoce des risques de phytotoxicité encourus. Toutefois, les différences de biodisponibilité en plaine entre l'horizon de surface et celui de profondeur n'ont pas été retrouvées avec cette technique. Par conséquent, la plante constitue encore le meilleur indicateur de la biodisponibilité du nickel dans les sols ferrallitiques ferritiques de Nouvelle-Calédonie.



CHAPITRE 4

---

**EFFETS TOXIQUES DU NICKEL  
SUR LE DÉVELOPPEMENT  
ET LA NUTRITION DU MAÏS**

---



## 4

---

**EFFETS TOXIQUES DU NICKEL  
SUR LE DÉVELOPPEMENT  
ET LA NUTRITION DU MAÏS**

Le chapitre précédent a montré que la biodisponibilité du nickel dans les sols ferrallitiques ferritiques de plaine est relativement élevée, atteignant probablement un niveau toxique pour le maïs. Mais un manque d'informations existe dans la littérature concernant les seuils de phytotoxicité du nickel, qui nous empêche d'affirmer avec certitude que le maïs cultivé en plaine est intoxiqué. Le premier objectif des travaux relatés dans ce chapitre est, par suite, de préciser les concentrations limites en nickel dans la plante et dans la solution au-delà desquelles la croissance du maïs est ralentie. Nous avons également caractérisé les effets de concentrations élevées en nickel sur la croissance, le développement complet, et la nutrition du maïs.

#### 4.1. CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Plusieurs expériences, conduites sur solution nutritive et sur vase de végétation, ont été nécessaires pour cerner progressivement les problèmes. L'hybride double de maïs GH 5010 (cv GH 5010) a été utilisé systématiquement comme plante test de référence. Le nickel a été utilisé sous forme de  $\text{NiSO}_4$  pour les expériences sur vase de végétation. Sur solution, Ni a été utilisé sous forme  $\text{NiCl}_2$ , l'anion  $\text{Cl}^-$  étant probablement plus neutre et des tests sur solution n'ayant montré aucune différence de réponse de croissance du maïs entre le  $\text{NiSO}_4$  et le  $\text{NiCl}_2$ .

Sur solution, les plantules de maïs ont été cultivées pendant 4 à 12 jours dans les conditions définies au paragraphe 2.1.3.  $\text{NiCl}_2$  a été introduit dès le premier jour de culture. Les autres cultivars de maïs - des hybrides doubles plus précisément - et les autres espèces végétales ont été cultivées dans les mêmes conditions.

Sur vases de végétation en serre, les plants de maïs ont été cultivés sur le sol alluvial équilibré (cf. tableau 2.3), dans les conditions définies au paragraphe 2.1.2. Le temps de végétation variait de 28 à 108 jours (plants arrivés en fin de cycle végétatif). Le nickel, sous forme  $\text{NiSO}_4$ , a été mélangé au sol avant sa mise en pot.



## 4.2. EFFETS DU NICKEL SUR LA CROISSANCE ET LE DÉVELOPPEMENT DU MAÏS

### 4.2.1. Résultats

#### *Modifications morphologiques*

Les photographies de la figure 4.1 illustrent les effets de concentrations toxiques en nickel sur le maïs.

Sur les jeunes plants de maïs cultivés sur solution de Hoagland diluée au quart, les premières différenciations morphologiques apparaissent à partir de 20  $\mu\text{M}$  de Ni en solution, après 5 à 6 jours de culture (Fig. 4.1 A-C). La première se manifeste par un ralentissement de la croissance, sans déformation, ni chlorose, nécrose ou coloration particulière sur les racines ou les feuilles. À partir de 50  $\mu\text{M}$  Ni, des nécroses au bout et au bord des limbes apparaissent (A, B). De plus, la longueur de la radicule et des racines latérales diminue fortement. La densité des racines latérales diminue également et un brunissement des apex racinaires apparaît au bout de 7 à 8 jours (C).

Sur des plants de maïs plus âgés cultivés sur sol en vase de végétation (Fig. 4.1 D-G), les mêmes symptômes apparaissent : ralentissement de la croissance en premier lieu, puis nécroses au bout et au bord des limbes, avec une légère chlorose longitudinale (E et G). Cependant, il n'y a toujours pas de déformations ou de colorations particulières. On constate par ailleurs que la tenue du plant est très fragile et qu'il nécessite d'être étayé (E). Ce problème est dû au faible développement des racines coronaires d'ancrage (F).

Des plants cultivés sur solution pendant un temps assez long (20 jours) montrent de fortes chloroses longitudinales, entre les nervures du limbe de toutes les feuilles (H-J). Ce symptôme a été peu observé en culture sur sol.

#### *Effets du nickel sur la croissance et le développement du maïs*

La figure 4.2 montre les effets du nickel sur la croissance de plantules de maïs cultivées sur solution pendant 10 jours. La croissance en longueur des parties aériennes et des racines (déterminée par la radicule, qui est la racine la plus longue sur les jeunes plants) ralentit rapidement au-delà de 40  $\mu\text{M}$  Ni en solution, mais de manière plus lente pour les parties aériennes. Le nickel paraît ainsi agir davantage sur le système racinaire que sur les parties aériennes (Fig. 4.2 b). Les poids de matière sèche confirment ce résultat (Fig. 4.2 c, d). Par ailleurs, il semble que la croissance des racines soit légèrement stimulée aux faibles concentrations en nickel dans la solution (inférieures à 20  $\mu\text{M}$ ).

La figure 4.3 montre les effets du nickel sur la croissance de plants de maïs cultivés pendant 36 jours sur le sol alluvial équilibré mélangé avec des quantités croissantes de NiSO<sub>4</sub>. Les paramètres suivants ont été mesurés : la transpiration (différence entre évapotranspiration du vase de végétation complet et évaporation d'un vase témoin sans plante), la croissance en hauteur \*, et le poids de matière sèche des parties aériennes et des racines à la récolte.

On constate que les valeurs observées sur ces trois paramètres diminuent à partir de la première dose de nickel ajouté au sol (40 mg Ni.kg<sup>-1</sup>). La transpiration est réduite significativement à partir du 16<sup>ème</sup> jour de végétation, et la hauteur à partir du 19<sup>ème</sup> jour (annexe 3). Les écarts entre le témoin et les plants intoxiqués, au niveau de ces 2 paramètres, s'accroissent avec le temps et aboutissent à une forte diminution du poids de la matière sèche des plants à la récolte (au 36<sup>e</sup> jour) (Fig. 4.3c).

Les effets de doses toxiques de nickel dans le sol sur le développement complet du maïs sont présentés dans le tableau 4.1. Au regard de la taille des plants à maturité (108 jours en serre), le maïs ne semble pas intoxiqué. Cependant, la croissance en hauteur est ralentie de manière significative jusqu'au 37<sup>e</sup> jour (- 25 % avec 125 mg Ni.kg<sup>-1</sup> de sol) et, à la récolte, le poids des grains diminue fortement : - 19 % avec 62,5 mg Ni.kg<sup>-1</sup> de sol, et - 42 % avec 125 mg Ni.kg<sup>-1</sup> de sol. Cette baisse de rendement en grains est essentiellement due à une diminution du nombre de grains par épi (- 43 % avec 125 mg.kg<sup>-1</sup> de sol), bien que le poids spécifique des grains ("poids sec de 1000 grains") ait tendance à diminuer également.

**Tableau 4.1. Effets du nickel sur le développement du maïs GH 5010.** Les plants ont été cultivés pendant 108 jours sur le sol alluvial équilibré, mélangé avec des quantités croissantes de NiSO<sub>4</sub>. Les valeurs sont les moyennes calculées sur 12 répétitions par traitement.

Paramètres	PPDS	Doses de Ni (mg.kg <sup>-1</sup> de sol)			
		0	62,5	125	
Hauteurs * (cm) au :	14 <sup>e</sup> jour	1,1	13,7	13,6	12,0
	28 <sup>e</sup> jour	2,8	33,5	29,1	22,9
	37 <sup>e</sup> jour	11,3	72,1	61,3	54,4
	52 <sup>e</sup> jour	44,5	193,7	175,0	160,7
	108 <sup>e</sup> jour	20,9	258,4	249,2	260,3
Hauteur totale (cm) au 108 <sup>e</sup> jour	22,7	310,6	301,7	306,8	
Matière sèche des parties aériennes au 108 <sup>e</sup> jour, sans l'épi (g.plt <sup>-1</sup> )	28,4	168,6	147,2	134,2	
Poids sec des grains (g.plt <sup>-1</sup> )	33,2	104,7	84,9	60,4	
Nombre de grains par épi	164,2	426,5	389,7	245,2	
Poids sec de 1000 grains	68,6	257,1	241,6	213,7	

\* hauteurs à la ligule de la dernière feuille dégainée.



**Fig. 4.1. Symptômes d'intoxication du maïs par le nickel.**

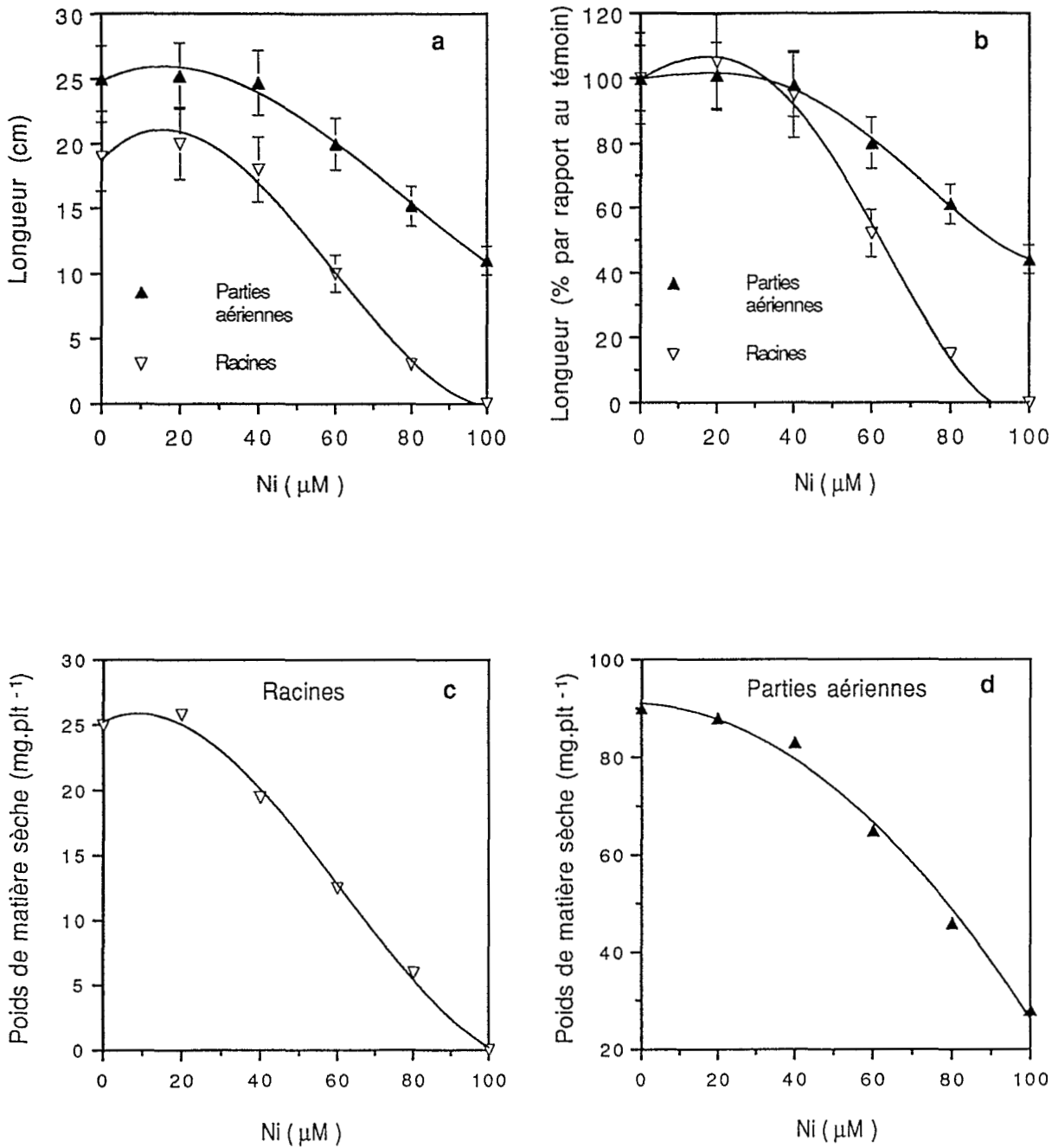
**A-C** : plants de maïs (cv GH 5010) cultivés sur solution de Hoagland 1/4 contenant différentes concentrations de  $\text{NiCl}_2$ . **A** : plants de 11 jours (de gauche à droite) : témoin, plants exposés à  $50 \mu\text{M}$ , et à  $65 \mu\text{M}$  Ni. **B** : feuilles d'un plant de 11 jours exposé à  $65 \mu\text{M}$  de Ni. **C** : racines de plants de 7 jours : témoin et plant exposé à  $65 \mu\text{M}$  Ni. Noter la croissance réduite des parties aériennes et des racines des plants intoxiqués, les nécroses au bout et au bord des limbes, le petit nombre et la faible longueur des racines latérales, et le début de brunissement de l'apex de la racicule.

**D-G** : plants de maïs (cv GH 5010) âgés de 28 jours, cultivés sur le sol alluvial équilibré mélangé à différentes quantités de  $\text{NiSO}_4$ . **D** : témoin. **E, F** : plant exposé à  $320 \text{ mg Ni.kg}^{-1}$ . Noter la réduction de la croissance (poids total de matière sèche diminué de 65 %), les nécroses au bout des feuilles, et la faible croissance en longueur des racines coronaires nécessitant l'étayage du plant. **G** : plant exposé à  $40 \text{ mg Ni.kg}^{-1}$ . Noter les chloroses inter-nervaires et les nécroses au bord du limbe.

**H-J** : plants de maïs de 20 jours, cultivés sur solution de Hoagland 1/4. 4<sup>ème</sup> feuille. **H** : témoin. **I, J** : plants exposés à 40 et  $80 \mu\text{M}$  de Ni. Noter l'augmentation de la chlorose inter-nervaire.



Fig 4.1. (suite)



**Fig. 4.2. Effets du nickel sur la croissance des parties aériennes et des racines de maïs GH 5010 cultivé sur solution.** Les plants ont été cultivés pendant 10 jours sur solution de Hoagland diluée au quart contenant différentes concentrations de chlorure de nickel. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  leurs écarts-types calculés sur 12 répétitions par traitement (pour a et b), ou les mesures effectuées sur des échantillons de 12 plants réunis (pour c et d). **a** : longueur; **b** : longueur relative (par rapport au témoin); **c** : poids de matière sèche des racines; **d** : poids de matière sèche des parties aériennes.

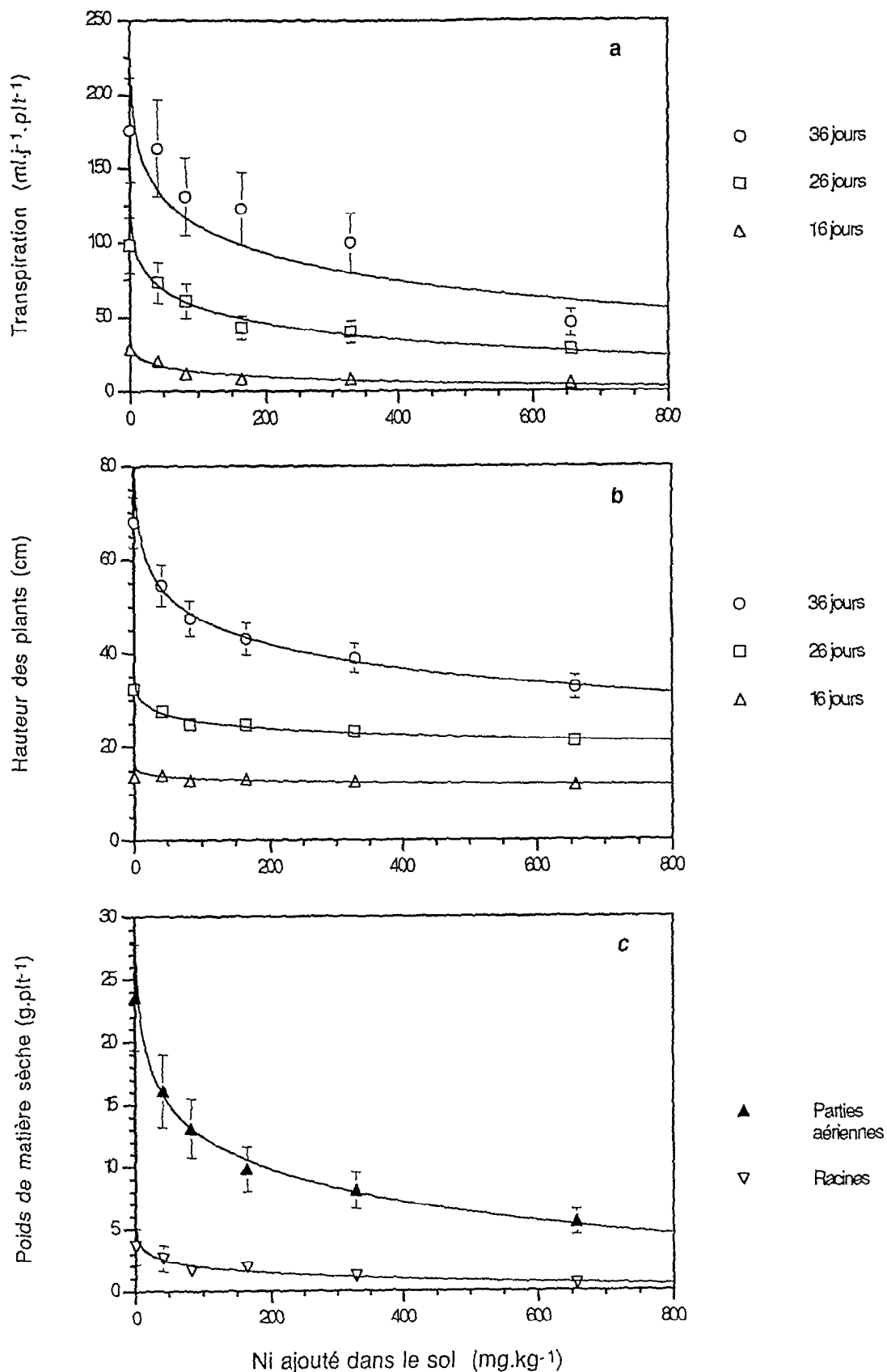


Fig. 4.3. Effets du nickel sur la croissance du maïs GH 5010 cultivé sur sol. Les plants ont été cultivés pendant 36 jours sur le sol alluvial équilibré, mélangé avec des quantités croissantes de sulfate de nickel. La transpiration et la hauteur des plants (à la ligule de la dernière feuille dégainée) ont été mesurées après 16, 26, et 36 jours de croissance. Les poids de matière sèche ont été déterminés après 36 jours de croissance. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  leurs écarts-types calculés sur 12 répétitions.



#### 4.2.2. Discussion

Avec des concentrations en nickel modérément toxiques, dans la solution ou dans le sol, le maïs ne montre pas de symptômes particuliers d'intoxication. Seule une diminution de la croissance des parties aériennes et, surtout, des racines est observée (Fig. 4.1 et 4.2). Avec des concentrations élevées, des nécroses au bout et au bord des limbes apparaissent, ainsi que des chloroses longitudinales sur tous les limbes, entre les nervures (Fig. 4.1). Ces observations semblent être généralisables à la plupart des végétaux (Vanselow, 1966). Un brunissement au niveau des apex racinaires apparaît également après 7 à 8 jours de culture sur solution.

Concernant les chloroses, celles-ci semblent se développer essentiellement en culture sur solution après deux semaines de végétation environ. Leur apparition, dans ces conditions, pourrait être due à la forme du fer apporté en solution (Fe-EDTA). Römheld (1987) a en effet montré que les graminées n'absorbent que faiblement le fer lorsqu'il est apporté sous forme Fe-EDDHA. Ceci serait lié au mécanisme spécifique d'absorption du fer des graminées qui l'absorbent sous forme  $Fe^{3+}$  associé à des complexants qu'elles excrètent dans la rhizosphère, appelés phytosidérophores (tel que l'acide muginéique), contrairement aux dicotylédones et aux monocotylédones non-graminées qui l'absorbent sous forme réduite  $Fe^{2+}$  (Römheld, 1987; Ma et Nomoto, 1993). Le fait que les chloroses n'apparaissent qu'après deux semaines de culture sur solution provient vraisemblablement de l'apport de fer par la graine aux premiers jours de croissance (l'analyse de la graine montre en effet la présence de teneurs en fer non négligeables; cf. annexe 4). Les faibles chloroses observées en culture sur sol pourraient provenir de la présence de formes de  $Fe^{3+}$  plus disponibles. Ce mécanisme n'a malheureusement été suspecté qu'à la fin de cette étude, si bien qu'aucune correction n'a été effectuée ultérieurement sur la solution.

Mis à part l'avoine qui manifeste des symptômes de toxicité particuliers (chloroses en bandes transversales, associées à des chloroses inter-nervaires; Anderson *et al.*, 1973, 1979), il semble que les chloroses inter-nervaires induites par des excès de nickel soient communes à toutes les graminées (Hunter et Vergnano, 1952; Croke et Knight, 1955; Soane et Saunder, 1959; Khalid et Tinsley 1980), ainsi qu'aux dicotylédones (Hunter et Vergnano, 1952).

S'agissant de la croissance, le nickel inhibe davantage celle des racines que celle des parties aériennes (Fig. 4.1 et 4.2). D'autres auteurs ont observé le même résultat sur d'autres plantes (Rauser, 1978; Piccini et Malavolta, 1992; Moya *et al.*, 1993; Rubio *et al.*, 1994). Il semble que cette action soit commune à la plupart des métaux lourds (Barceló et Poschenrieder, 1990). Toutefois, à l'inverse de Ni, Cd inhibe surtout la croissance des parties aériennes (Khan *et al.*, 1984; Nmila, 1992; Rubio *et al.*, 1994). Il est donc possible que le principal site d'action du nickel se situe au niveau des racines, et probablement au niveau des apex, comme en témoigne leur brunissement aux fortes concentrations en Ni en solution.



Sur un cycle complet, les plants de maïs intoxiqués par Ni finissent par combler leur retard de croissance pour atteindre la taille des témoins (tableau 4.1). Cependant, la production de grains est fortement réduite (- 42 % avec 125 mg Ni.kg<sup>-1</sup> de sol), causée essentiellement par une diminution du nombre de grains par épi (- 43 %), suggérant un problème de fécondation. Setia *et al.* (1988) ont également observé une diminution du nombre d'épillets chez le blé intoxiqué par Ni, mais il semble que leur poids soit davantage réduit. Ni pourrait donc diminuer également le remplissage des grains, c'est à dire le transfert des nutriments (sucres et acides aminés) à partir des feuilles et des tiges vers les grains, comme le suggère aussi le tableau 4.1.

La diminution de rendement de la plante induite par des excès de nickel a été signalée par plusieurs auteurs. En culture sur sable, Setia *et al.* (1988) constatent que l'apport de 300 mg.l<sup>-1</sup> de NiCl<sub>2</sub> (5,1 mM) dans l'eau d'irrigation diminue le poids sec des épis de blé de 27 %. En culture sur sol (sable + sol brun), la production de fruits par l'aubergine est diminuée de 30,5 % (en poids de matière sèche) avec 5 mg.l<sup>-1</sup> de Ni dans l'eau d'irrigation (Salim *et al.*, 1988). En culture sur solution de Hoagland, la production de grains par le haricot est réduite de 60 % avec 17 µM de Ni (Piccini et Malavolta, 1992).

D'une manière générale, ces résultats montrent que le ralentissement de la croissance du jeune plant aboutit apparemment toujours à une diminution de la production utile (grains, fruits, ...) de la plante. De plus, la production de grains par le maïs paraît davantage réduite que la croissance (tableau 4.1).

D'autre part, il est possible que l'augmentation apparente de la croissance des racines aux faibles concentrations en Ni (Fig 4.2) ne soit pas un artefact. En effet, plusieurs études tendent à montrer que Ni est un élément essentiel (cf. chapitre 1, § 1.2.5).

Pour ce qui est des niveaux toxiques, il ressort que la croissance du maïs diminue à des concentrations en Ni supérieures à 40 µM (1,17 mg.l<sup>-1</sup>) en solution de Hoagland diluée au quart, et 40 mg.kg<sup>-1</sup> dans le sol alluvial quand il est ajouté sous forme de sel. Toutefois, ce dernier niveau ne constitue pas un seuil, car le nickel apporté sous forme de sel est beaucoup plus disponible que celui présent naturellement dans le sol. En effet, il a été montré au chapitre précédent que les 7000 mg de Ni.kg<sup>-1</sup> présents naturellement dans les sols ferrallitiques ferritiques de piedmont en Nouvelle-Calédonie n'étaient pas toxiques.

En solution, les niveaux toxiques semblent varier beaucoup en fonction de l'espèce végétale, mais également en fonction de la composition de la solution nutritive (tableau 4.2). Cette dernière pourrait intervenir sur l'activité du nickel en solution : ainsi, dans l'eau, de faibles concentrations sont toxiques et correspondent à de fortes activités, alors que dans une solution complète, la concentration doit être plus forte pour être toxique (cf. tableau 4.2). Le degré d'intoxication dépend également du temps pendant lequel la plante est exposée au nickel, et a tendance à augmenter avec son âge (Fig. 4.3).

**Tableau 4.2. Concentrations toxiques du nickel en culture sur solution et effets sur la plante.**

Plante	Type de solution	Ni en solution ( $\mu\text{M}$ )	Effet	Référence
Maïs ( <i>Zea mays</i> )	eau	0,5 1,7	IR 10 % en 2 jours IR 50 % en 2 jours	Robertson (1985)
Maïs ( <i>Zea mays</i> )	solution complète	17	IPA 35 % et IR 30 % en 28 jours	Gerzabek et Ullah (1990)
Maïs ( <i>Zea mays</i> )	solution complète	85	IP 50%	Juste <i>et al.</i> (1989)
Riz ( <i>Oriza sativa</i> )	solution complète	100	IR 41 %, IPA 30 % en 10 jours	Moya <i>et al.</i> (1993)
Riz ( <i>Oriza sativa</i> )	solution complète	500	IR 50 % en 10 jours	Rubio <i>et al.</i> (1994)
Haricot ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	Hoagland diluée 2 fois	15	IR 15 % en 4 jours	Rauser (1978)
Haricot ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	Hoagland	17	IR 43 % en 75 jours	Piccini et Malavolta (1992)
Laitue ( <i>Lactuca sativa</i> )	Hoagland diluée 10 fois	10	IR 10 % en 5 jours	Heikal <i>et al.</i> (1989b)
Piment doux ( <i>Capsicum annum</i> )	Hoagland	102 204	IR 0 %, IPA 0 % IR 80 %, IPA 85 % (à maturité)	Estañ <i>et al.</i> (1988)
<i>Brachystegia spiciformis</i>	eau	0,27	IR 14 % en 3 jours	Robertson et Meakin (1980)
<i>Leucaena leucocephala</i>	Street	1,7	début de IR en 21 jours	Verlière et Heller (1981)

IR : inhibition de la croissance racinaire; IPA : inhibition de la croissance des parties aériennes; IP : inhibition de la croissance du plant.

Si on compare ces résultats avec ceux du tableau 3.2 (chapitre précédent), on constate que les concentrations en Ni dans la solution des sols ferrallitiques ferritiques de plaine, lorsqu'ils sont fertilisés (0,44 à 0,71 mg.l<sup>-1</sup>, soit 7,5 à 12  $\mu\text{M}$ ), pourraient se situer dans une gamme de concentrations toxiques pour les végétaux cultivés.

Cependant, il semble que seul un calcul de l'activité de Ni en solution, c'est à dire la prise en compte de la concentration du nickel dans la solution et des caractéristiques de la solution (composition minérale, pH, ...), est susceptible de permettre de statuer sur la toxicité de Ni en solution. Par ailleurs, selon Beckett et Davis (1977), l'approche la plus précise dans la définition d'un seuil toxique est la détermination de la concentration limite de l'élément dans la plante au-delà de laquelle la croissance est ralentie, car cette concentration serait indépendante des conditions de culture.

L'objectif du paragraphe suivant est la définition de tels seuils de toxicité.

### 4.3. SEUILS DE TOXICITÉ DU NICKEL POUR LE MAÏS

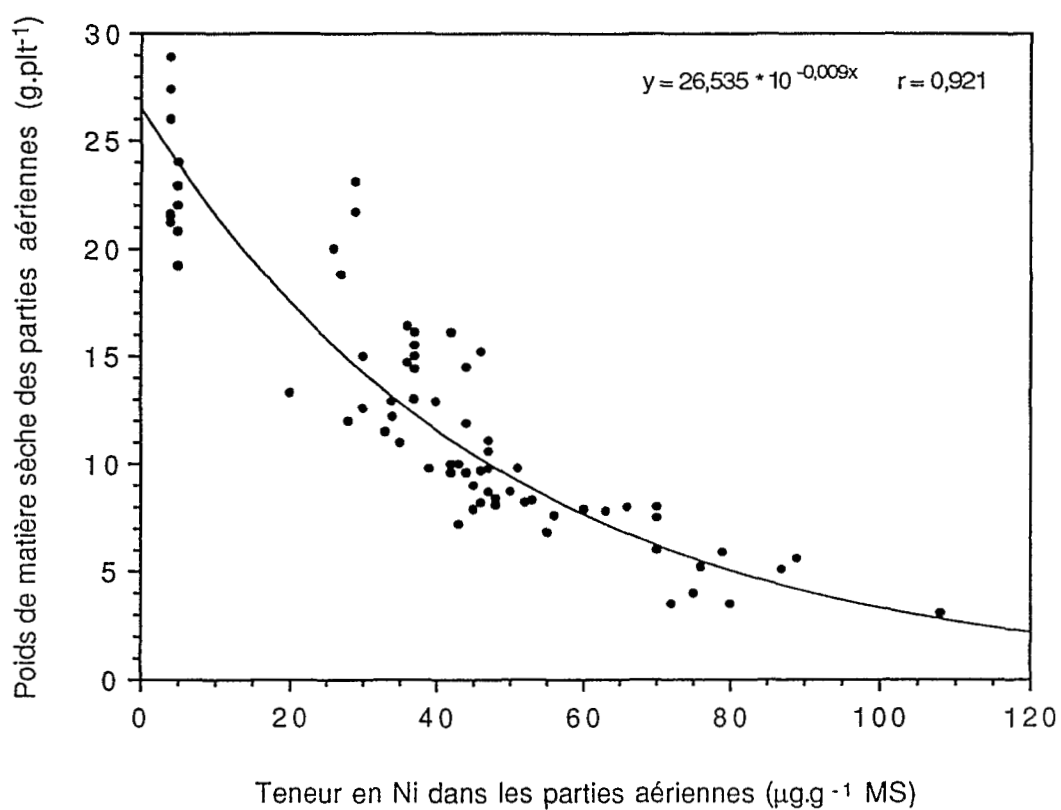
#### 4.3.1. Résultats

##### *Seuil de toxicité de Ni dans les parties aériennes du maïs*

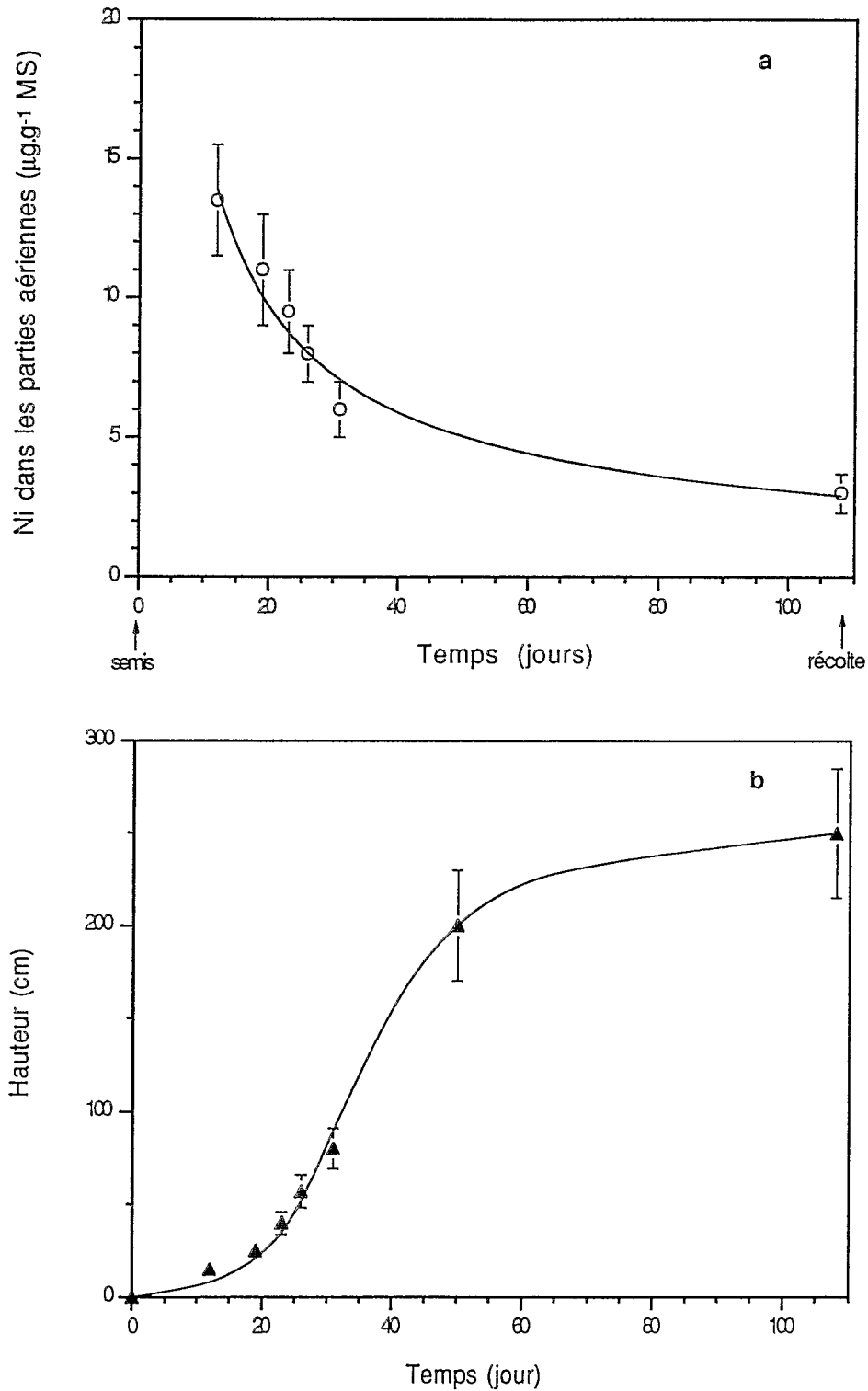
Les premières analyses de teneur en Ni ont porté sur les plants de maïs cultivés pendant 36 jours sur le sol alluvial mélangé avec différentes quantités de  $\text{NiSO}_4$  (dont les effets sur la croissance a été présentée sur la figure 4.3). On constate (Fig. 4.4) que le poids de matière sèche des parties aériennes diminue rapidement quand leur teneur en Ni dépasse  $5 \mu\text{g.g}^{-1}$  MS. Une diminution de 20 % du poids de matière sèche de parties aériennes correspond environ à une teneur de  $10 \pm 3 \mu\text{g.g}^{-1}$  MS. Toutefois, la partie de la courbe située entre 5 et  $20 \mu\text{g Ni.g}^{-1}$  pourrait ne pas représenter la réalité (la figure 4.2 a montré que Ni semblait activer la croissance à de faibles concentrations). Par conséquent, il est préférable de considérer que le seuil toxique se situe entre les teneurs moyennes des deux premiers traitements (témoin et  $31 \text{ mg Ni.kg}^{-1}$  de sol), c'est à dire entre 5 et  $30 \mu\text{g Ni.g}^{-1}$  MS dans les parties aériennes, pour un maïs de 36 jours (témoin mesurant 176 cm de hauteur totale, cf. annexe 3).

Cependant, il est possible que la teneur en nickel diminue au cours du développement de la plante, tel que cela est établi pour la plupart des éléments majeurs. Nous avons alors entrepris de caractériser l'évolution de la teneur en Ni dans les parties aériennes du maïs au cours de son développement. Pour cela, les plants ont tous été cultivés sur le sol alluvial équilibré mélangé avec  $125 \text{ mg Ni.kg}^{-1}$ , puis récoltés à différents stades de développement. Les résultats sont présentés sur la figure 4.5a. On constate que la teneur en Ni diminue effectivement très rapidement au cours des premiers jours de croissance, puis lentement après 1 mois environ. Il apparaît que la diminution de la teneur est inversement liée à l'augmentation de la taille du plant (Fig. 4.5b). Ainsi, le seuil de toxicité de Ni dans les parties aériennes du maïs dépend fortement du stade de développement de la plante.

L'analyse des teneurs en Ni des plants adultes (tableau 4.3) confirme ce résultat, puisque le plant adulte intoxiqué par la première dose de Ni dans le sol ( $62,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) contient seulement  $2,2 \mu\text{g Ni.g}^{-1}$  MS dans ses parties aériennes (sans l'épi). La prise en compte du stade de développement apparaît donc comme essentielle.



**Fig. 4.4. Relation entre la teneur en nickel dans les parties aériennes et le poids de matière sèche des parties aériennes du maïs GH 5010.** Les plants ont été cultivés en serre pendant 36 jours sur le sol alluvial équilibré, mélangé avec des quantités croissantes de NiSO<sub>4</sub> (celles de la figure 4.3). Les résultats obtenus pour les plantes de chaque pot sont représentés.



**Fig. 4.5.** Evolution de la teneur en Ni dans les parties aériennes (a), et de la hauteur (b) du maïs GH 5010 au cours de son développement. Les plants ont été cultivés en serre sur le sol alluvial équilibré, mélangé avec 125 mg Ni.kg<sup>-1</sup> de sol sous forme de NiSO<sub>4</sub>. Pour les analyses, les plants ont été récoltés à six stades de développement différents (nombre de feuilles dégainées entre parenthèses) : 15 cm (4), 25 cm (6), 40 cm (7), 60 cm (8), 80 cm (9), et 250 cm (15) (stade adulte) de haut au niveau de la ligule de la dernière feuille dégainée. Les valeurs sont les moyennes ± leurs écarts-types calculés sur 12 répétitions par traitement.

**Tableau 4.3. Teneurs toxiques en Ni dans les parties aériennes du maïs GH 5010 adulte.** Les plants ont été cultivés pendant 108 jours sur le sol alluvial équilibré, mélangé à des quantités croissantes de NiSO<sub>4</sub>. Les teneurs dans les tiges et feuilles correspondent à l'ensemble des parties aériennes moins l'épi. Les valeurs sont les moyennes calculées sur 12 répétitions par traitement. (entre parenthèses la différence par rapport au témoin).

	PPDS	— Ni ajouté (mg.kg <sup>-1</sup> sol) —		
		0	62,5	125
Ni dans les tiges et feuilles (µg.g <sup>-1</sup> MS)	0,7	2,0	2,2	3,0
Hauteur au 28 <sup>e</sup> jour (cm)	2,8	33,5	29,1 (- 13 %)	22,9 (- 32 %)
Poids de grains secs (g.plt <sup>-1</sup> )	33,2	104,7	84,9 (- 19 %)	60,4 (- 42 %)

Afin de préciser le seuil de toxicité du nickel dans les parties aériennes du maïs, des plants ont alors été cultivés en serre sur le sol alluvial équilibré contenant des quantités de NiSO<sub>4</sub> plus faibles que celles utilisées précédemment (cf. Fig. 4.3), et ont tous été récoltés au même stade de développement : stade 9 feuilles dégainées, plus précisément à 75 cm de haut au niveau de l'emplacement de la ligule de la dernière feuille dégainée (cf. Fig. 2.3). Les résultats sont présentés dans le tableau 4.4. Ils montrent que pour la première dose toxique de Ni dans le sol (31,3 mg.kg<sup>-1</sup> induisant un retard de croissance en hauteur significatif de 14 % en 34 jours), la teneur en Ni dans les parties aériennes du maïs au stade décrit ci-dessus est de 12 ± 3 µg.g<sup>-1</sup> MS. Cette concentration constitue le seuil de toxicité dans la plante le plus précis établi dans cette étude, au moins pour le cultivar de maïs considéré.

**Tableau 4.4. Seuil de toxicité du nickel dans les parties aériennes du maïs GH 5010 récolté à un stade de développement déterminé.** Les plants ont été cultivés sur le sol alluvial équilibré, additionné de quantités croissantes de NiSO<sub>4</sub>, et récoltés au même stade de développement : 75 cm de haut au niveau de la ligule de la dernière feuille dégainée. Les valeurs sont les moyennes calculées sur 12 répétitions par traitement.

Paramètres	PPDS	———— Doses de Ni (mg.kg <sup>-1</sup> de sol) ————				
		0	31,3	62,5	93,8	125
TNiPA75 (µg.g <sup>-1</sup> MS)	9,2	2,7 a	12,2 b	14,5 b	19,5 b	29,2 c
Hauteur* (cm) au :						
14 <sup>e</sup> jour	0,9	13,9 a	13,5 a	13,7 a	12,6 b	12,0 b
20 <sup>e</sup> jour	1,0	20,2 a	18,7 b	18,5 b	16,9 c	15,8 d
27 <sup>e</sup> jour	3,2	33,1 a	28,8 b	29,0 b	25,2 c	23,2 c
34 <sup>e</sup> jour	7,5	58,6 a	50,6 b	49,8 b	41,6 c	37,5 c

TNiPA75 : teneur en Ni dans les parties aériennes à 75 cm à la ligule de la dernière feuille dégainée.

\* hauteur au niveau de la ligule de la dernière feuille dégainée.

Les valeurs sur la même ligne non suivies par la même lettre sont significativement différentes au seuil de 5 %.

*Seuil de toxicité de Ni dans la solution*

L'objectif de cette l'étude est de tenter de définir un seuil de toxicité du nickel en solution pour le maïs cultivé en hydroponie. La littérature indiquant que la toxicité de Ni en solution dépend beaucoup de la composition minérale de cette dernière (Sela *et al.*, 1989), nous avons cultivé des plantules de maïs sur des solutions de Hoagland à diverses dilutions, contenant différentes concentrations de NiCl<sub>2</sub>. Les résultats sont présentés sur la figure 4.6. On constate que la toxicité du nickel s'exprime d'autant plus que la solution nutritive est diluée : le seuil toxique dans l'eau est environ de 2 µM, tandis qu'il est de 40 µM sur solution de Hoagland diluée 2 fois.

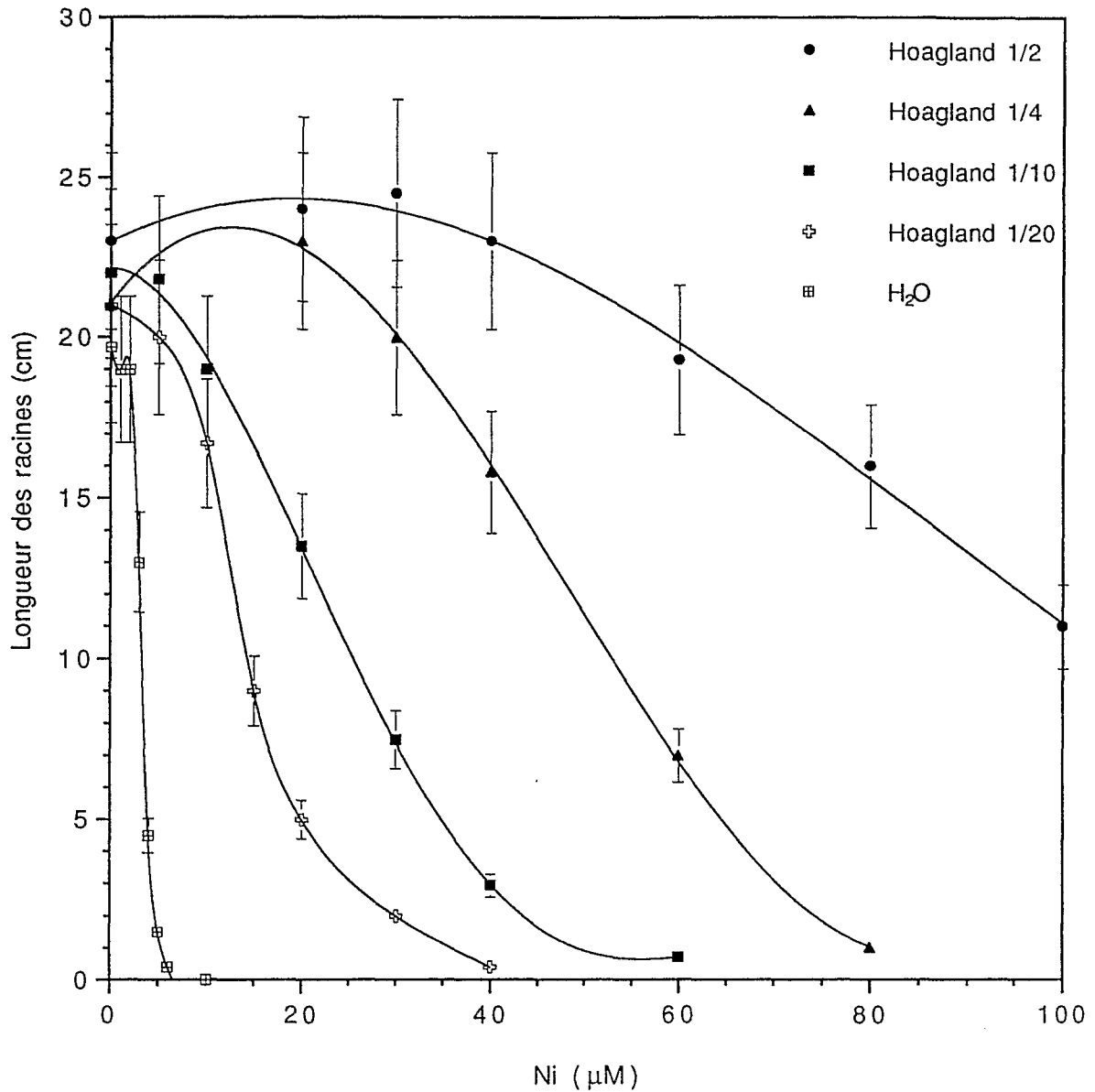
À partir des résultats de cette figure, nous avons reporté les concentrations en Ni correspondant à 10 % et à 50 % d'inhibition de la croissance en longueur des racines pour les différents milieux. Ces concentrations ont ensuite été converties en terme d'activités à l'aide du logiciel GEOCHEM v. 2.0 (Sposito et Mattigod, 1980 ; cf. annexe 6 pour les calculs). Les résultats sont présentés dans le tableau 4.5. On constate que pour un seuil d'intoxication donné (10 ou 50 %), l'activité de Ni en solution varie en fonction de la solution utilisée. Il ne semble donc pas possible d'établir un seuil de toxicité de Ni en solution simplement en terme d'activité.

Nous avons alors testé la validité d'un indice de toxicité, inspiré de travaux effectués sur l'aluminium (Becquer *et al.*, 1992). Sa formule est la suivante, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> et Ni<sup>2+</sup> étant exprimés en terme d'activités :

$$I_{\text{tox}} = \frac{\{Ni^{2+}\}}{\{Ca^{2+}\} + \{Mg^{2+}\}} \times 100$$

**Tableau 4.5. Proposition d'un indice de toxicité  $I_{\text{tox}}$ .** La concentration toxique de Ni en solution (culture hydroponique) a été déterminée à partir de la figure 4.6. Les activités de Ni<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> ont été calculées par le logiciel Geochem. Les écarts-types des concentrations en Ni dérivent des écarts-types des longueurs des racines (Fig. 4.6).

	<i>Inhibition racinaire (%)</i>	Solution nutritive de Hoagland (cf. tableau 2.2)			
		diluée 2 fois	diluée 4 fois	diluée 10 fois	diluée 20 fois
Concentration toxique de Ni en solution (µM)	(- 10) (- 50)	55 98	32 53	10 24	6,5 12,5
Activité de Ni en solution : {Ni <sup>2+</sup> } (µM)	(- 10) (- 50)	33,0 58,7	22,1 36,6	7,9 18,9	5,5 10,5
{Ca <sup>2+</sup> } (µM)		1220	700	320	170
{Mg <sup>2+</sup> } (µM)		310	180	80	40
$I_{\text{tox}}$	(- 10) (- 50)	<b>2,15</b> <b>3,87</b>	<b>2,50</b> <b>4,20</b>	<b>2,00</b> <b>4,72</b>	<b>2,60</b> <b>5,00</b>



**Fig. 4.6. Influence de la composition minérale du milieu de culture sur l'effet toxique du nickel sur la croissance des racines de maïs GH 5010.** Les plants ont été cultivés pendant 8 jours sur eau ou sur solution de Hoagland diluée 2, 4, 10 ou 20 fois (en abrégé 1/2, 1/4, 1/10, 1/20), contenant différentes concentrations de NiCl<sub>2</sub>. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  leurs écarts-types calculés sur 12 répétitions par traitement.



On constate que l'indice de toxicité  $I_{tox}$  semble relativement stable, quel que soit la dilution de la solution de Hoagland : il est égal à  $2,3 \pm 0,3$  pour une inhibition de la croissance racinaire de 10 % en 8 jours, et à  $4,4 \pm 0,6$  pour une inhibition de 50 %.

#### 4.3.2. Discussion

La figure 4.4 a montré que Ni est toxique pour le maïs à des teneurs comprises entre 5 et  $30 \mu\text{g.g}^{-1}$  MS dans les parties aériennes, pour des plants de 36 jours (témoin mesurant 176 cm de hauteur totale), le seuil se situant probablement vers  $10 \mu\text{g.g}^{-1}$  MS. Mais cette valeur provient d'une interpolation, et le stade de développement de la plante pour une telle concentration n'est pas défini. Or, il est indispensable de préciser le stade de développement du plant correspondant à l'analyse, la teneur en Ni diminuant rapidement au cours de la phase de croissance rapide du maïs (Fig. 4.5). Ainsi, au cours d'une expérience sur le sol alluvial contenant des quantités de  $\text{NiSO}_4$  plus faibles que celles de la figure 4.4, un seuil de toxicité a pu être affiné et défini rigoureusement pour le cultivar GH 5010 :  $12 \pm 3 \mu\text{g Ni.g}^{-1}$  MS dans les parties aériennes du maïs, au stade 9 feuilles dégainées et mesurant 75 cm de haut au niveau de la ligule de la dernière feuille dégainée (cf. Fig. 2.3 pour cette mesure). A cette teneur correspond un retard de croissance en hauteur de 14 % en 34 jours (significatif au seuil de 1 %). Il est possible cependant qu'une teneur inférieure à  $12 \mu\text{g.g}^{-1}$  MS puisse induire un retard de croissance significatif.

Le choix de ce stade de développement relativement précoce pour l'analyse nous semble intéressant, car il laisse le temps à la toxicité de s'exprimer, tout en correspondant à des teneurs en Ni encore assez élevées (Fig. 4.5a) permettant de les différencier facilement de celles d'un plant témoin sans nickel. De plus, ce stade précoce permettrait un traitement curatif sur la culture, dans la mesure où, bien sûr, un tel traitement existerait. En effet, l'organe le plus souvent analysé lors d'un diagnostic foliaire sur maïs est la feuille de l'épi au stade floraison femelle (Taureau *et al.*, 1989). Or, le repérage de cet organe ne peut se faire qu'à un stade tardif. Lubet et Taureau (1990) recommandent également le diagnostic foliaire précoce sur le maïs.

S'agissant du seuil dans les tissus du maïs, Chang *et al.* (1992) ont montré qu'il existait une lacune dans la détermination de seuils de phytotoxicité de Ni. En effet, selon les auteurs, sur 284 références traitant des effets phytotoxiques des métaux (Zn, Cu, Cr et Ni), seules deux étaient appropriées pour établir un seuil de toxicité de Ni sur le maïs : Wallace *et al.* (1977), et Metwally et Rabie (1989). Ils ont déterminé, à l'aide de ces références, que seulement  $3 \mu\text{g.g}^{-1}$  MS dans les feuilles suffisent à induire un retard de croissance de 50 % chez le maïs. Cependant, cette valeur est extrapolé à partir des données de ces 2 références, et les auteurs suggèrent qu'elle est probablement imprécise et trop faible. En effet, plusieurs résultats dans la littérature suggèrent que le seuil paraît plus élevé que  $3 \mu\text{g.g}^{-1}$  MS (tableau 4.6). Celui établi dans cette étude semble être en accord avec les résultats cités.

**Tableau 4.6. Teneurs en nickel toxiques dans le maïs.**

Variété	Stade	Teneur ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS)	Effets	Référence
ns	ns	19 (F)	chloroses et RC	Soane et Saunder (1959)
Golden Cross	18 j.	8,4 (PA)	- 6 % MS PA	Wallace (1989a)
Golden Cross	20 j.	4,7 (PA)	rien	Wallace (1989b)
ns	plantule	196 (PA)	- 50 % MF plant	Juste <i>et al.</i> (1989)
LG 3	28 j.	30 (PA)	- 35 % MS PA	Gerzabek et Ullah (1990)
INRA 260	12 F émergées	17 (6 <sup>e</sup> F)	- 50 % MS grains	Mench <i>et al.</i> (1992)
ns	ns	3 (F)	- 50 % MS PA	Chang <i>et al.</i> (1992)
GH 5010	9 F dégainées (75 cm à la ligule dernière F dégainée)	12 (PA)	- 14 % hauteur en 34 j.	cette étude

F : feuilles; PA : parties aériennes; MF, MS : matière fraîche, matière sèche; RC : ralentissement de la croissance.

ns : non spécifié.

S'agissant du seuil de toxicité du nickel dans la solution en culture hydroponique, les résultats montrent qu'il dépend fortement non seulement de l'espèce végétale, mais également de la nature de la solution nutritive (cf. tableau 4.2 et Fig. 4.6). L'expression des concentrations de Ni en terme d'activité ne semble pas permettre la définition d'un tel seuil (tableau 4.5). Par contre, la prise en compte de l'activité de Ni, de Ca et de Mg dans la solution permet d'approcher un seuil de toxicité. En effet, Ca et Mg sont connus pour être des ions antagonistes puissants de l'absorption de beaucoup de métaux lourds, dont Ni (Proctor et McGowan, 1976; Gabbrielli et Pandolfini, 1984; Robertson, 1985; Le Bot *et al.*, 1990; Brady *et al.*, 1993). Ainsi, nous proposons l'indice de toxicité suivant :

$$I_{\text{tox}} = \frac{\{\text{Ni}^{2+}\}}{\{\text{Ca}^{2+}\} + \{\text{Mg}^{2+}\}} \times 100$$

Cet indice de toxicité semble être relativement stable, quelle que soit la dilution de la solution de Hoagland : il est égal à  $2,3 \pm 0,3$  pour une inhibition de la croissance racinaire de 10 % en 8 jours, et à  $4,4 \pm 0,6$  pour une inhibition de 50 % (tableau 4.5). Si on considère que le seuil de toxicité se situe juste avant les 10 % d'inhibition, on peut faire l'estimation de l'échelle suivante :

- $I_{\text{tox}} < 2$  : pas de toxicité sur le maïs ;
- $I_{\text{tox}} = 2,3$  : 10 % d'inhibition de la croissance racinaire du maïs en 8 jours ;
- $I_{\text{tox}} = 4,4$  : 50 % d'inhibition de la croissance racinaire du maïs en 8 jours.

Il serait intéressant de comparer ces résultats obtenus sur maïs avec ceux que l'on obtiendrait sur d'autres espèces végétales, et sur d'autres types de solutions.

Cet indice donne des valeurs très différentes pour les solutions de sols. En effet, le tableau 4.7 montre qu'une forte toxicité apparaît déjà à partir de  $I_{tox} = 0,49$ . Ceci pourrait provenir du fait que la solution du sol, où les racines puisent préférentiellement les éléments, est alimentée par du nickel lié au complexe d'échange, lui-même pouvant être alimenté par des fractions plus stables (Uren, 1992). Des études complémentaires méritent d'être réalisées pour expérimenter cet indice sur différentes solutions de sols.

**Tableau 4.7. Calcul de  $I_{tox}$  à partir des analyses de la solution des sols.** Les calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel Geochem, à partir des concentrations de l'annexe 5, correspondant à l'expérimentation en serre de la figure 4.3. Les valeurs sont les moyennes calculées sur 12 répétitions.

	Ni ajouté au sol (mg.kg <sup>-1</sup> )					
	0	185	370	740	1480	2960
Réduction de la croissance*	0	- 31 %	- 46 %	- 56 %	- 65 %	- 77 %
Concentration de Ni en solution (µM)	2,1	64,9	100	383	699	1030
Activité Ni (µM)	0,84	23,48	36,30	130,70	235,70	326,10
Activité Ca (µM)	1550	2150	2310	2380	2590	3250
Activité Mg (µM)	1910	2660	2870	2940	3300	4090
$I_{tox}$	0,02	0,49	0,70	2,46	4,00	4,44

\* par rapport à la matière sèche du témoin.

#### 4.4. DIFFÉRENCES DE SENSIBILITÉ AU Ni ENTRE ESPÈCES ET ENTRE CULTIVARS DE MAÏS

##### 4.4.1. Résultats

Le tableau 4.8 présente la sensibilité au nickel de différentes espèces. En observant l'inhibition de la croissance totale, il apparaît l'ordre de sensibilité décroissant suivant :

tomate ≈ squash > haricot > sorgho > maïs

Le tableau 4.9 présente la sensibilité au nickel de différents cultivars de maïs. Des différences significatives apparaissent : Hycorn 80 est le moins sensible des cultivars testés avec 65 % d'inhibition de la croissance racinaire par 4 µM de Ni dans l'eau, XL 94 le plus sensible avec environ 94 % d'inhibition.

Les figures 4.7 et 4.8 précisent les différences entre ces deux cultivars. Ainsi, sur solution de Hoagland diluée au quart, la croissance des racines et des parties aériennes de XL 94 diminue rapidement au-delà de 20  $\mu\text{M}$  de Ni, alors que celle de Hycorn 80 diminue au-delà de 50  $\mu\text{M}$ .

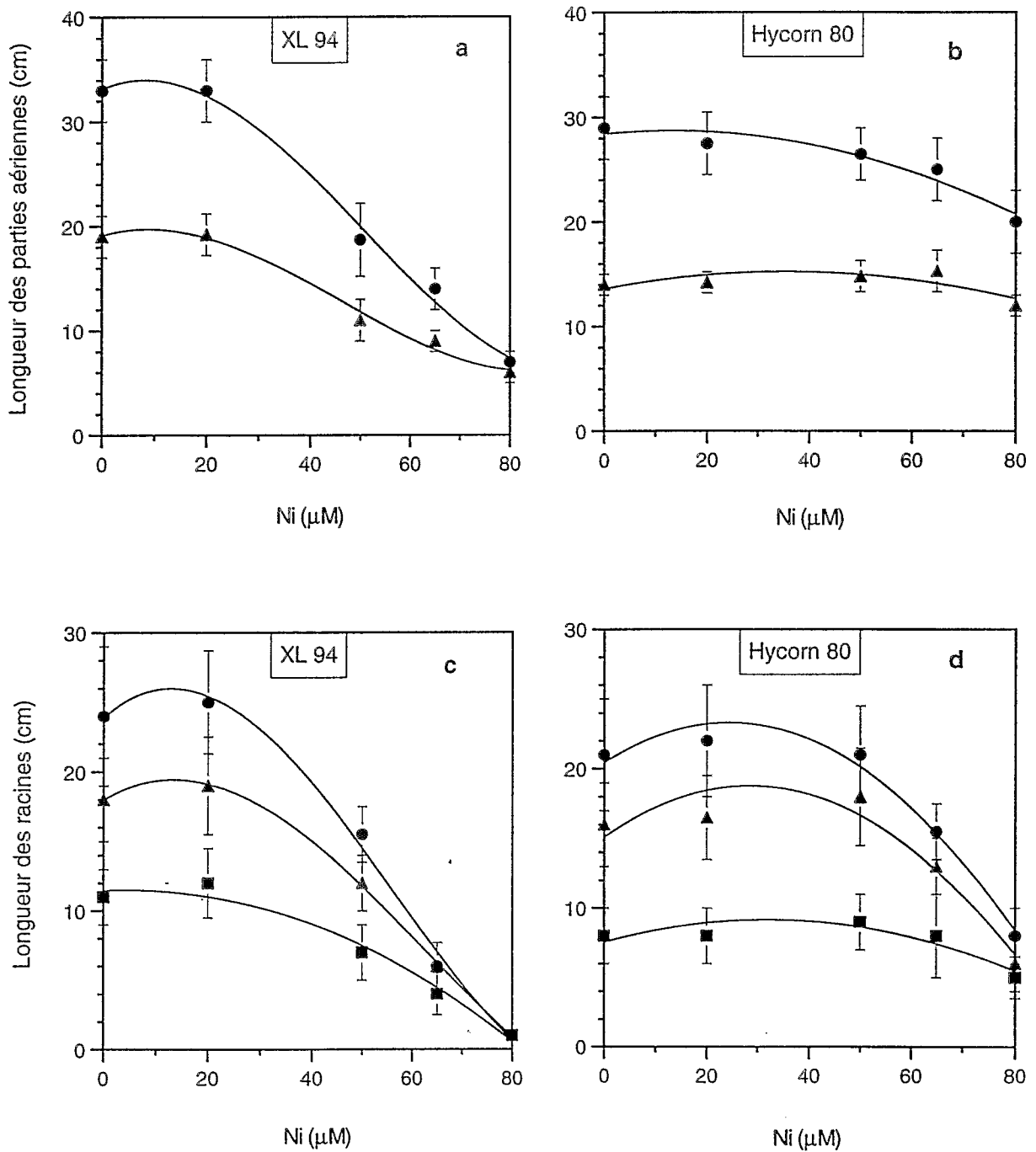
**Tableau 4.8. Comparaison de la sensibilité au nickel de différentes espèces.** Les plants ont été cultivés pendant 8 jours sur solution de Hoagland diluée 4 fois, sans nickel ou avec 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{NiCl}_2$ . Les mesures ont été faites sur des lots de plants réunis entre eux : 16 pour le squash, 40 pour la tomate, 32 pour le haricot, 20 pour le sorgho, et 12 pour le maïs. (cf. § 2.1 pour les cultivars utilisés).

Espèce	Poids de matière sèche des racines ( $\text{mg.plt}^{-1}$ )			Poids de matière sèche des parties aériennes ( $\text{mg.plt}^{-1}$ )			Réduction totale (%) *
	Témoin	50 $\mu\text{M}$ Ni	RC (%)	Témoin	50 $\mu\text{M}$ Ni	RC (%)	
Haricot	107	2,8	97	287	165	43	57
Squash	50	2	96	242	44	82	84
Tomate	1,8	0,2	89	14,2	2,0	86	86
Sorgho	12,3	3,1	75	28,3	20,4	28	42
Maïs (cv GH 5010)	19,2	12,7	34	69	55	20	23

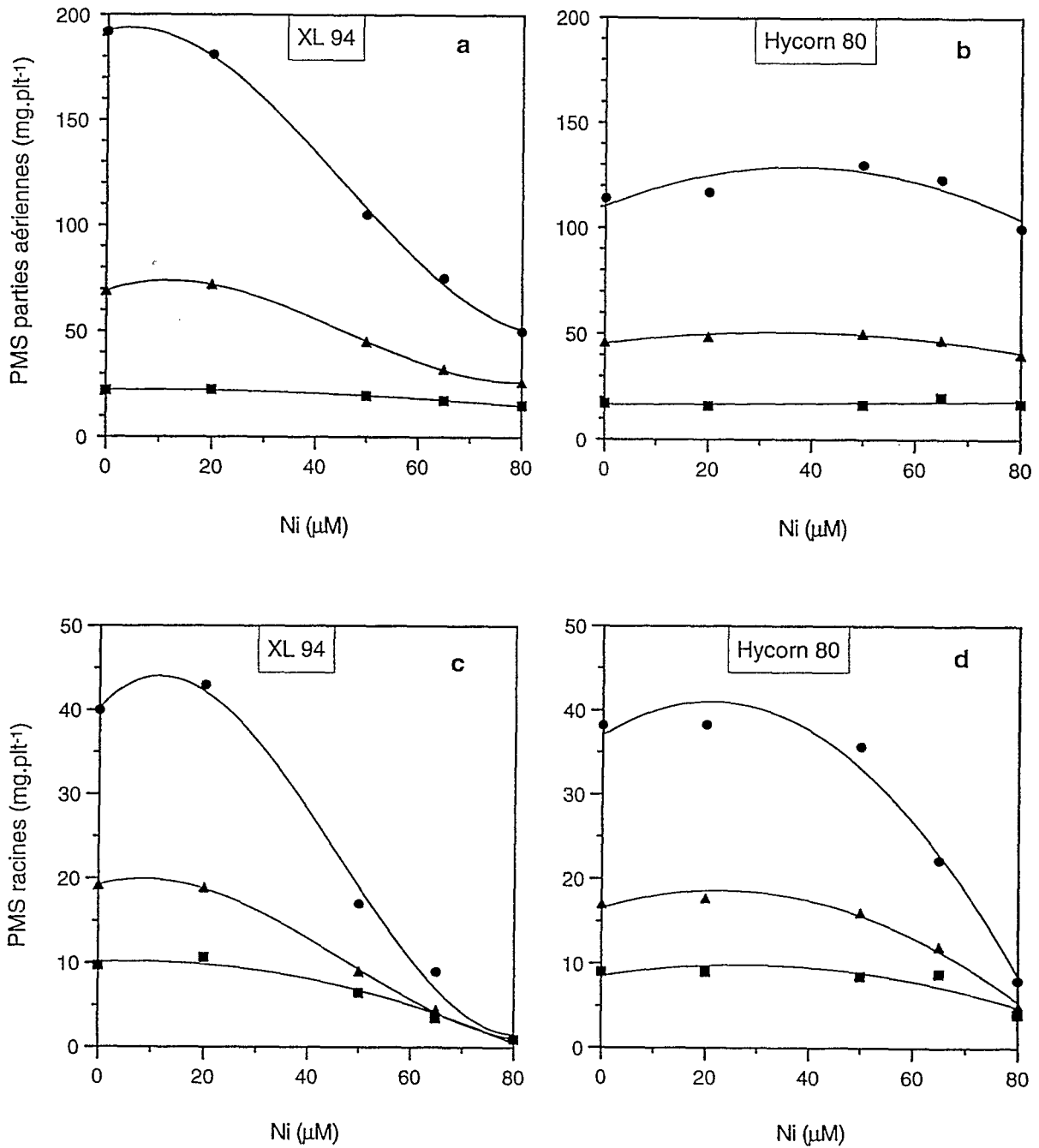
RC : réduction de la croissance. \* (racines + parties aériennes).

**Tableau 4.9. Comparaison de la sensibilité au nickel de différents cultivars de maïs.** Les plants ont été cultivés sur solution aqueuse pendant 5 jours, sans nickel ou avec 4  $\mu\text{M}$  de  $\text{NiCl}_2$ . Les longueurs des racines correspondent à l'allongement de la racine depuis la mise en solution. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  leurs écarts-types calculés sur 12 répétitions.

Cultivar	Longueur des racines (cm)		Réduction de la croissance (%)
	témoin	4 $\mu\text{M}$ Ni	
GH 5010	31,9 $\pm$ 4,1	8,2 $\pm$ 1,4	74,3 $\pm$ 7,8
Hycorn 9	18,7 $\pm$ 2,5	4,0 $\pm$ 0,8	78,6 $\pm$ 7,3
<b>Hycorn 80</b>	22,4 $\pm$ 3,0	7,8 $\pm$ 1,3	<b>65,2 <math>\pm</math> 10,5</b>
XL 77 A	23,1 $\pm$ 3,3	3,5 $\pm$ 0,5	84,8 $\pm$ 4,4
XL 80	31,3 $\pm$ 3,7	3,4 $\pm$ 0,7	89,2 $\pm$ 3,6
<b>XL 94</b>	17,7 $\pm$ 2,8	1,1 $\pm$ 0,5	<b>93,8 <math>\pm</math> 3,3</b>
DK 529	20,7 $\pm$ 2,1	3,4 $\pm$ 0,6	83,6 $\pm$ 4,6
DK 581	23,0 $\pm$ 2,2	4,1 $\pm$ 0,4	82,2 $\pm$ 3,5
DK 747	25,7 $\pm$ 3,2	4,5 $\pm$ 0,6	82,5 $\pm$ 4,6
DK 764	20,6 $\pm$ 2,4	3,0 $\pm$ 0,7	85,4 $\pm$ 5,2



**Fig. 4.7. Effets du nickel sur la croissance en longueur des parties aériennes et des racines de maïs XL 94 et Hycorn 80.** Les plants ont été cultivés pendant 4 (■), 8 (▲) et 12 (●) jours, sur solution de Hoagland diluée au quart, avec différentes concentrations de  $\text{NiCl}_2$ . Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  leurs écarts-types calculés sur 10 répétitions par traitement. **a** et **b** : parties aériennes de XL 94 et Hycorn 80; **c** et **d** : racines de XL 94 et Hycorn 80.



**Fig. 4.8.** Effet du nickel sur le poids de matière sèche des parties aériennes et des racines de maïs XL 94 et Hycorn 80. Les plants ont été cultivés pendant 4 (■), 8 (▲) et 12 (●) jours, sur solution de Hoagland diluée au quart, avec différentes concentrations de NiCl<sub>2</sub>. Les mesures ont porté sur des échantillons moyens de 10 plants.

a et b : parties aériennes de XL 94 et Hycorn 80; c et d : racines de XL 94 et Hycorn 80.

#### 4.4.2. Discussion

Le tableau 4.9 montre qu'il existe des différences de sensibilité au nickel importantes entre les cultivars de maïs. En effet, deux des cultivars testés se différencient nettement : Hycorn 80 et XL 94, avec 65 % et 94 % d'inhibition de la croissance racinaire respectivement. Sur solution de Hoagland diluée au quart, la croissance de XL 94 est rapidement inhibée au-delà de 20  $\mu\text{M}$  de Ni, alors que celle de Hycorn 80 est ralentie au-delà de 50  $\mu\text{M}$  (Fig. 4.7 et 4.8). Piccini et Malavolta (1992) ont également constaté une différence de sensibilité importante entre deux cultivars de haricot : la matière sèche totale de IAPAR-14 était diminuée de 4 % avec 34  $\mu\text{M}$  de Ni en solution, et celui de Carioca de 60 %.

S'agissant des espèces, les différences de sensibilité sont encore plus importantes (tableau 4.8). En effet, en considérant l'inhibition de la croissance totale du plant (racines + parties aériennes), il apparaît l'ordre de sensibilité suivant (inhibition entre parenthèses):

Tomate (-86 %) = Squash (-84 %) > Haricot (-57 %) > Sorgho (-42 %) > Maïs (-23 %)

Pour le haricot, l'inhibition de la croissance affecte essentiellement les racines (- 97 %). Il est alors possible que les réserves importantes du cotylédon soient mobilisées en totalité pour la croissance des parties aériennes, comme le montre leur inhibition modérée. Cependant, on imagine aisément que leur croissance, au-delà des 8 jours de l'expérience, aurait nécessairement diminué par suite de la forte déficience du système racinaire.

Ces résultats suggèrent également que les dicotylédones sont plus sensibles au nickel que les monocotylédones. Cependant, rien n'indique dans la littérature que les dicotylédones soient effectivement plus sensibles. Dans une étude où plusieurs espèces ont été cultivées sur un sol riche en nickel, Hunter et Vergnano (1952) ont constaté l'ordre suivant : (1) l'orge était la plante la moins affectée, (2) le blé, le haricot et l'ivraie étaient peu affectés, (3) l'avoine, la pomme de terre, le navet, et le chou étaient fortement affectés, (4) la betterave était la plante la plus affectée. De leur côté, Sauerbeck et Hein (1991) ont distingué quatre types de plantes : (1) celles qui absorbent peu de Ni et qui ne manifestent pas de toxicité : blé de printemps, orge, moutarde et colza, (2) celles qui absorbent des quantités intermédiaires de Ni et qui manifestent parfois une toxicité : épinard, laitue, carotte et avoine, (3) celles qui absorbent beaucoup de Ni et qui sont sévèrement intoxiquées : haricot, radis et maïs doux, (4) celles qui absorbent beaucoup de Ni sans manifester de toxicité : ivraie. Ces résultats n'indiquent pas de différences nettes entre les monocotylédones et les dicotylédones, bien que l'orge, le blé, et l'ivraie semblent peu sensibles au nickel, tandis que le haricot et la betterave seraient très sensibles. Cependant, les résultats présentés dans ces articles sont à considérer avec précaution, leurs protocoles expérimentaux étant très peu détaillés.

La culture sur solution apparaît comme un outil efficace, par sa précision et sa facilité de mise en oeuvre, pour comparer la sensibilité au nickel de différentes espèces ou cultivars. Elle devrait permettre notamment d'alléger les essais comparatifs inter-spécifiques et inter-variétaux en plein champ destinés à sélectionner les espèces et les cultivars les moins sensibles au nickel.

#### 4.5. EFFETS DES CONCENTRATIONS TOXIQUES EN Ni SUR LA NUTRITION MINÉRALE DU MAÏS

##### 4.5.1. Résultats

Les premières analyses ont porté sur des plants cultivés en serre pendant 36 jours sur le sol alluvial équilibré mélangé avec des quantités croissantes de NiSO<sub>4</sub> (plants dont la croissance est présentée sur la figure 4.3). Les résultats, reportés dans le tableau 4.10, montrent des variations significatives dans les teneurs de plusieurs éléments :

- ⇒ celles en Si, K, Ca et Mg augmentent (sans compter Ni) ;
- ⇒ celles en P et Mn diminuent.

**Tableau 4.10. Effets du nickel sur la composition minérale au 36<sup>e</sup> jour des parties aériennes de maïs GH 5010.** Les plants ont été cultivés en serre sur le sol alluvial équilibré, additionné de quantités croissantes de NiSO<sub>4</sub>. Les valeurs, exprimées par rapport à la matière sèche, sont les moyennes calculées sur 12 répétitions par traitement.

Paramètre	PPDS	Doses de Ni (mg.kg <sup>-1</sup> de sol)					
		0	40	80	160	320	640
PPA (g.plt <sup>-1</sup> )***	4,00	23,57	16,08	13,07	9,87	8,14	5,57
Si (%) ***	0,45	2,31	2,79	3,06	3,00	3,03	2,81
N -	0,30	3,48	3,56	3,69	3,65	3,58	3,60
P - ***	0,03	0,26	0,23	0,23	0,21	0,19	0,20
K - ***	0,68	3,31	4,26	4,83	4,83	5,28	5,53
Ca - ***	0,05	0,37	0,41	0,44	0,47	0,48	0,49
Mg - **	0,06	0,44	0,40	0,41	0,45	0,47	0,49
Na (µg.g <sup>-1</sup> )	11,2	26,6	33,3	31,6	33,3	35,0	31,6
Fe - *	21,8	109,2	103,5	107,8	124,6	117,0	96,9
Mn - ***	9,3	83,8	70,8	68,5	58,6	49,0	31,7
Cu -	1,0	7,3	7,3	7,0	7,0	6,9	6,3
Zn -	12,3	49,3	46,0	50,5	47,5	49,0	48,6
Ni - ***	30,2	4,5	30,8	42,2	43,6	58,6	87,9

\*\*\*, \*\*, \* : effets significatifs à 0,1 %, 1%, et 5 %.

PPA : poids de matière sèche des parties aériennes.



Des analyses minérales ont également porté sur des plantules de maïs cultivés sur solution contenant différentes concentrations de NiSO<sub>4</sub> (tableau 4.11). On constate que :

- ⇒ les teneurs en Ca, Mg et Mn ont une nette tendance à diminuer dans les parties aériennes et les racines ;
- ⇒ les teneurs en P et K augmentent dans les racines (sans compter Ni) ;
- ⇒ les teneurs en Ni sont beaucoup plus élevées dans les racines que les parties aériennes.

**Tableau 4.11. Effets du nickel sur la composition minérale de plantules de maïs GH 5010.** Les plants ont été cultivés pendant 14 jours sur solution de Hoagland diluée au quart, contenant différentes quantités de NiSO<sub>4</sub>. Les résultats, exprimés par rapport à la matière sèche, correspondent à des analyses effectuées sur des échantillons de 12 plants réunis.

	Ni ( $\mu\text{M}$ )	Matière sèche ( $\text{mg.plt}^{-1}$ )	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	Na (%)	Fe —	Mn ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )	Ni —
Parties aériennes	0	167	0,71	2,31	0,64	0,84	0,007	80	118	3
	2,5	163	0,69	2,10	0,60	0,79	0,005	85	98	9
	5	147	0,76	2,36	0,59	0,81	0,005	68	107	28
	10	165	0,74	2,07	0,56	0,75	0,006	118	87	31
	20	152	0,74	2,04	0,52	0,71	0,005	59	86	154
	30	132	0,72	2,72	0,44	0,65	0,008	79	74	393
	40	130	0,69	2,71	0,32	0,49	0,012	85	61	444
	60	102	0,70	2,86	0,33	0,51	0,019	118	98	803
	80	93	0,71	2,13	0,19	0,36	0,008	81	60	679
	100	80	0,72	1,98	0,10	0,28	0,005	100	46	609
Racines	0	94	0,39	1,21	0,32	1,10	0,14	83	333	13
	2,5	98	0,38	1,14	0,32	1,14	0,09	68	245	169
	5	89	0,46	1,23	0,29	1,07	0,10	63	285	430
	10	90	0,51	1,22	0,38	0,96	0,14	52	162	554
	20	77	0,62	1,45	0,27	0,76	0,11	57	245	1159
	30	39	0,74	2,05	0,27	0,90	0,10	110	240	1985
	40	29	0,82	1,95	0,23	0,84	0,05	76	231	2503
	60	17	1,05	3,01	0,16	0,47	0,09	72	261	1995
	80	10	1,24	2,92	0,11	0,43	0,05	72	143	1933
	100	5	1,10	2,69	0,13	0,40	0,07	72	130	1790

L'azote n'a pu être analysé par manque de matériel végétal.

On constate que les résultats de ces deux tableaux ne concordent que partiellement, sauf pour le manganèse. Toutefois, il est difficile de comparer des effets sur des plants n'ayant pas le même âge physiologique - entre les deux expériences et au sein même de chacune d'elle - et se développant dans des conditions différentes.

Ceci renforce la nécessité, pour comparer de façon rigoureuse la composition minérale des plants exposés au nickel, d'effectuer les analyses sur des plants ayant le même stade de développement. Le tableau 4.12 présente les résultats d'analyses effectuées dans de telles conditions. On constate ainsi que Ni ne modifie pratiquement pas la composition minérale des parties aériennes du maïs, que ce soit celle des plants modérément ou fortement intoxiqués (cf. H34 sur le tableau 4.12). Seules les deux doses de nickel les plus fortes (93,8 et 125 mg.kg<sup>-1</sup>) induisent des baisses sensibles des teneurs en Si, N, P, Fe et Mn.

**Tableau 4.12. Effets du nickel sur la composition minérale des parties aériennes de maïs GH 5010 récoltés au même stade de développement.** Les plants ont été cultivés en serre sur le sol alluvial équilibré, additionné de quantités croissantes de NiSO<sub>4</sub>. Les plants ont été récoltés au stade 75 cm de haut à la ligule de la dernière feuille dégainée. Les résultats, exprimés par rapport à la matière sèche, sont les moyennes calculées sur 12 répétitions par traitement.

Paramètre	PPDS	Doses de Ni (mg.kg <sup>-1</sup> de sol)				
		0	31,3	62,5	93,8	125
H34 (cm)	7,4	58,6 a	50,6 b	49,8 b	41,6 c	37,5 c
Si (%)	0,39	1,84 a	1,92 a	1,73 a	1,71 a	1,67 a
N (%)	0,53	2,15 a	2,21 a	2,12 a	1,77 a	1,85 a
P (%)	0,07	0,22 a	0,24 a	0,22 a	0,18 a	0,19 a
K (%)	0,60	2,84 a	3,06 a	2,79 a	2,54 a	2,66 a
Ca (%)	0,08	0,29 a	0,33 a	0,29 a	0,27 a	0,30 a
Mg (%)	0,11	0,43 a	0,42 a	0,38 a	0,33 a	0,39 a
Na (µg.g <sup>-1</sup> )	8,9	28,3 a	33,3 a	31,6 a	30,0 a	31,6 a
Fe (µg.g <sup>-1</sup> ) **	17,5	93,0 a	90,2 a	92,0 a	73,3 b	74,7 b
Mn (µg.g <sup>-1</sup> ) **	6,1	36,7 a	31,0 a	33,2 a	32,2 a	26,0 b
Cu (µg.g <sup>-1</sup> )	1,1	4,5 a	4,7 a	4,0 a	3,8 a	4,0 a
Zn (µg.g <sup>-1</sup> )	9,8	26,0 a	29,2 a	31,7 a	25,7 a	30,0 a
Ni (µg.g <sup>-1</sup> ) ***	9,2	2,7 a	12,2 b	14,5 b	19,5 b	29,2 c

Les valeurs sur la même ligne non suivies par la même lettre sont significativement différentes au seuil de 5 %.

H34 : hauteur des plants au 34<sup>e</sup> jour, au niveau de la ligule de la dernière feuille dégainée.

\*\*, \*\*\* : effets significatifs à 1 % et 0,1 %.

#### 4.5.2. Discussion

Les analyses de plantules de maïs cultivées pendant 12 jours sur solution nutritive contenant différentes concentrations de nickel montrent des variations importantes dans la composition minérale de leurs tissus. On constate ainsi une augmentation des teneurs en P et en K dans les racines (tableau 4.11). Cependant, il est probable que cet effet soit dû à des différences dans le stade de développement entre les différents plants exposés au nickel. Il est en effet établi que, en règle générale, les teneurs en éléments (en particulier N, P, et K) diminuent au cours de la croissance (Bonzon et Maury, 1982; Heller *et al.*, 1989). Par contre, les teneurs en Ca, Mg et Mn dans les racines et les parties aériennes des plantules de maïs ont tendance à diminuer (tableau 4.11), et ceci pourrait être attribué à une action du nickel. Plusieurs études ont en effet montré que Ca et Mg sont des ions antagonistes de l'absorption de Ni (Proctor et Mc Gowan, 1976; Robertson, 1985; Heikal *et al.*, 1989a). Ni diminuerait également l'absorption de Ca et Mg chez le riz (Rubio *et al.*, 1994). S'agissant de Mn, Taylor et Stadt (1990) ont montré l'existence d'un antagonisme avec Ni chez le blé. Hewitt (1953) a observé des symptômes de déficience en manganèse sur les feuilles de tomate et de pomme de terre exposées au nickel, et Estañ *et al.* (1988) ont constaté, sur le piment doux, une diminution des teneurs en Mn dans les feuilles et dans les racines. Il est par conséquent possible que Ni puisse diminuer l'absorption de Ca, Mg et Mn par le maïs en culture sur solution.

En culture sur sol, il semble que l'effet de Ni sur l'absorption des éléments soit différent (tableau 4.10). En effet, les analyses des parties aériennes de maïs, cultivés en serre pendant 36 jours sur le sol alluvial équilibré mélangé avec des quantités croissantes de NiSO<sub>4</sub>, montrent que les teneurs en Si, K, Ca et Mg augmentent de manière significative, mais cet effet est probablement dû, à nouveau, aux différences de stade de développement des plants, et à l'augmentation de la concentration en Ca et en Mg dans la solution du sol (annexe 5), ces éléments ayant probablement été déplacés vers la solution par l'apport de NiSO<sub>4</sub>. Par contre, les teneurs en P, et surtout en Mn diminuent fortement (significatif à 0,1 % pour Mn; tableau 4.10). S'agissant de P, l'annexe 5 montre une diminution de sa concentration dans la solution du sol avec l'apport de NiSO<sub>4</sub>, suggérant fortement une précipitation sous forme Ni<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O ou/et Ni<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·2NiHPO<sub>4</sub>, composés très peu solubles (Bolt et Bruggenwert, 1978). La diminution de la teneur en P dans les parties aériennes serait donc un effet indirect du nickel. Par contre, la diminution de la teneur en Mn, également observée sur les plantules cultivées sur solution, pourrait être attribuée à un antagonisme entre l'absorption de Ni et celle de Mn. Les résultats de Metwally et Rabie (1989) sont en accord avec cette hypothèse.

L'analyse de plants de maïs récoltés au même stade de développement apparaît ainsi comme la seule méthode pour éviter les problèmes d'interprétation liés aux différences de

développement. Ainsi, l'analyse des parties aériennes de plants de maïs, cultivés en serre sur le sol alluvial équilibré mélangé avec différentes quantités de  $\text{NiSO}_4$ , et récoltés à 75 cm de haut au niveau de la ligule de la dernière feuille dégainée, montrent que seules les teneurs en fer et en manganèse diminuent significativement (tableau 4.12). Mais l'effet reste faible, et la forte diminution de la teneur en Mn observée précédemment est probablement due à l'intoxication par Ni beaucoup plus forte (cf. tableau 4.10 et 4.12). Par conséquent, une absorption excessive de Ni modifie peu la composition minérale des parties aériennes du maïs, hormis pour les doses élevées qui semblent entraîner une légère diminution de Si, N, P, et surtout Fe et Mn. En outre, la comparaison de ces teneurs avec les normes établies pour le maïs montre que même les plus faibles teneurs en Fe et Mn ne semblent pas déficientes (taureau *et al.*, 1989; Lubet et taureau, 1990).

On peut noter que la diminution de la teneur en fer reste faible alors que cet effet est souvent rapporté comme un fait majeur de la toxicité du nickel (Forster, 1954; Roth *et al.*, 1971). Cependant, Wallace *et al.* (1977) ont constaté aussi que Ni modifiait peu la teneur en fer chez le maïs. Par ailleurs, les chloroses observées aux fortes intoxications (cf. § 4.2) pourraient être dues non pas à une carence en fer comme cela est souvent proposé (Hewitt, 1948; Vergnano et Hunter, 1953), mais à une carence en manganèse qui se manifeste par des chloroses inter-nervaires chez le maïs (taureau *et al.*, 1989).

En conclusion, il apparaît qu'aux premiers stades de l'intoxication du maïs par le nickel, le ralentissement de la croissance n'est pas dû à une carence minérale. Par conséquent, Ni serait toxique par lui-même.

#### 4.6. CONCLUSION

Le suivi du développement du maïs exposé artificiellement à des excès de nickel montre qu'aucun symptôme particulier n'apparaît, hormis à des concentrations extrêmement toxiques. Seul un ralentissement de la croissance est observé, essentiellement au niveau des racines. À des concentrations plus élevées, des chloroses se développent entre les nervures des limbes, ainsi que des nécroses au bord des limbes et un brunissement au niveau des apex racinaires. Les chloroses apparaissent surtout en culture sur solution après épuisement des réserves de la graine, et pourraient être la conséquence d'une faible absorption de fer, liée au mécanisme spécifique d'absorption de cet élément par les graminées et à sa forme apportée (Fe-EDTA).

Sur un cycle complet de végétation, le ralentissement de la croissance, même modéré, aboutit à une diminution significative de la production du maïs, essentiellement par une diminution du nombre de grains par épi. Le nickel pourrait alors perturber la fécondation, voire le transfert des sucres et/ou des acides aminés à partir des feuilles et des tiges vers les grains, ce qui serait en accord avec les résultats de Setia *et al.* (1988) sur le blé.

Aucun symptôme spécifique ne se manifestant, il apparaît que le moyen le plus sûr de diagnostiquer une phytotoxicité due au nickel est l'analyse foliaire. La courbe de réponse du maïs à des doses croissantes de  $\text{NiSO}_4$  mélangées au sol a permis, en effet, de mettre en évidence clairement un seuil de toxicité du nickel pour le maïs GH 5010 :  $12 \pm 3 \mu\text{g.g}^{-1}$  MS dans les parties aériennes du maïs, au stade 9 feuilles dégainées et mesurant 75 cm de haut au niveau de la ligule de la dernière feuille dégainée. Cette teneur correspond à un retard de croissance en hauteur de 14 % en 34 jours (significatif au seuil de 1 %). Mais il est possible, dans le cas présent, qu'une concentration inférieure à  $12 \mu\text{g Ni.g}^{-1}$  MS puisse induire un retard de croissance significatif. De plus, la production de grains paraît plus affectée que la croissance. Le seuil toxique de Ni pourrait donc être plus bas si on tient compte de la production de la plante comme critère d'intoxication et non de sa croissance. Des seuils de toxicité comparables avaient déjà été mis en évidence, ou approchés, par divers auteurs (Wallace, 1989a; Mench *et al.*, 1992), mais aucun n'avait été défini de façon rigoureuse, car ne tenant pas compte du stade de développement de la plante, ou ne comparant pas la croissance du plant exposé au nickel avec celle d'un témoin. La prise en compte du stade de développement est indispensable du fait de la diminution rapide de la teneur en Ni au cours de la phase de croissance rapide du maïs.

En culture sur solution de Hoagland diluée au quart, la croissance du maïs est ralentie au-delà de  $20 \mu\text{M}$  de Ni. Cependant, ce seuil dépend de la composition minérale de la solution nutritive. Pour s'affranchir de ce facteur de variation, il est possible cependant de calculer un indice de toxicité  $I_{\text{tox}}$ , de formule  $100 \times \{\text{Ni}^{2+}\} / (\{\text{Ca}^{2+}\} + \{\text{Mg}^{2+}\})$  dans laquelle chaque élément est exprimé en terme d'activité. Pour le maïs GH 5010, cet indice a permis d'établir, sur quatre types de solution de Hoagland de dilutions différentes, l'échelle suivante :

- $I_{\text{tox}} < 2$  : pas de toxicité sur le maïs GH 5010;
- $I_{\text{tox}} = 2,3$  : 10 % d'inhibition de la croissance racinaire en 8 jours ;
- $I_{\text{tox}} = 4,4$  : 50 % d'inhibition de la croissance racinaire en 8 jours.

À notre connaissance, ces résultats sont les premiers qui montrent la possibilité de définir un seuil de toxicité du nickel en solution qui fasse abstraction des variations de la composition minérale du milieu de culture. Il serait intéressant d'expérimenter cet indice pour d'autres types de solutions nutritives. Toutefois, on peut regretter que cette échelle ne concorde pas avec celle des solutions de sols, pour lesquelles une échelle différente pourrait sans doute être définie à partir de la même formule. Si tel était le cas, nous disposerions alors d'une méthode intéressante pour diagnostiquer un risque de toxicité avant mise en culture d'un sol.

D'autre part, les seuils de toxicité définis dans la plante et dans la solution dépendent certainement du type de cultivar de maïs, car des différences de sensibilité significatives ont été mises en évidence sur dix cultivars testés : Hycorn 80 se montre le moins sensible avec

65 % d'inhibition de la croissance racinaire par 4  $\mu\text{M}$  de Ni dans l'eau, XL 94 étant le plus sensible avec 94 % d'inhibition. Il est par conséquent vraisemblable que les seuils de toxicité définis plus haut soient spécifiques du cultivar utilisé (GH 5010).

Des différences encore plus importantes ont été observées entre des espèces : la croissance racinaire du haricot, de la tomate et du squash est inhibée à plus de 90 % par 50  $\mu\text{M}$  Ni en solution de Hoagland diluée au quart, celle du sorgho est inhibée à 75 %, et celle du maïs GH 5010 à 34 %. En l'occurrence, il semble que le maïs soit une espèce modérément sensible au nickel, et que plusieurs espèces soient beaucoup plus sensibles.

La méthode de culture sur solution permettrait ainsi la présélection d'espèces, voire de cultivars, peu sensibles au nickel et, par suite, d'accélérer la mise au point d'une agriculture productive sur les sols où la biodisponibilité du nickel est élevée.

L'analyse de la composition minérale des parties aériennes du maïs modérément intoxiqué montre que Ni n'induit aucune carence minérale, même si les teneurs en fer et en manganèse diminuent sensiblement. Par conséquent, il semble que Ni, une fois absorbé, puisse agir sur le métabolisme de la plante. L'étude du mode d'action du nickel sur la physiologie du maïs s'impose. Il constitue l'objectif majeur des études relatées dans les deux chapitres suivants.



## RÉSUMÉ

Le maïs exposé à des excès modérés de nickel ne manifeste pas de symptômes spécifiques d'intoxication. Seules des chloroses et des nécroses au niveau des limbes, ainsi qu'un brunissement des apex racinaires se développent dans les cas extrêmes.

À des concentrations modérément toxiques, la croissance des parties aériennes, et surtout des racines, est ralentie. Ce ralentissement de la croissance, même limité, aboutit à une diminution significative de la production du maïs.

L'analyse des parties aériennes du maïs intoxiqué montre que Ni modifie peu leur composition minérale. Le ralentissement de la croissance induite par des excès de Ni n'est donc pas dû à une carence minérale. Par conséquent, Ni serait toxique par lui-même.

Un seuil de toxicité a été déterminé de façon rigoureuse dans la plante cultivée sur sol. Ainsi, avec  $12 \pm 3 \mu\text{g.g}^{-1}$  MS dans les parties aériennes du maïs GH 5010, au stade 9 feuilles dégainées et mesurant 75 cm de haut au niveau de l'emplacement de la ligule de la dernière feuille dégainée, la croissance en hauteur est diminuée de 14 % en 34 jours.

Un seuil a également été déterminé dans la solution en culture hydroponique, applicable à plusieurs types de milieux, grâce au calcul d'un indice de toxicité basé sur les activités de Ni, Ca et Mg dans la solution.

Ces seuils sont spécifiques du maïs, et probablement même du cultivar utilisé, des différences de sensibilité au nickel importantes ayant été mises en évidence entre espèces, et même entre cultivars de maïs.





# CHAPITRE 5

---

## LOCALISATION DU NICKEL DANS LE MAÏS

---



# 5

---

## LOCALISATION DU NICKEL DANS LE MAÏS

Le chapitre précédent a permis de montrer que le nickel est toxique à des teneurs très faibles dans les tissus du maïs,  $12 \mu\text{g.g}^{-1}$  MS dans les parties aériennes induisant un retard significatif de la croissance. L'analyse de la composition minérale du maïs a montré que Ni n'induit pas de carence : il est donc toxique par lui-même.

Il est probable que le nickel n'est pas réparti uniformément dans la plante, mais qu'il est, au contraire, concentré à certains niveaux où il pourrait alors agir préférentiellement.

Le but des recherches rapportées dans ce chapitre est de préciser la répartition du nickel dans le maïs, et de le localiser d'un point de vue histologique et cytologique. En outre, l'étude a porté sur les deux cultivars de maïs de sensibilité à Ni différente (XL 94 et Hycorn 80) afin de chercher à mettre en évidence des différences dans la localisation du nickel.

### 5.1. CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

La première série d'expériences avait pour objectif la définition de la répartition de Ni à l'échelle de la plante entière, à différents stades de développement. Pour cela, les analyses ont d'abord porté sur des plantules de maïs GH 5010 cultivés pendant 4 à 12 jours sur solution de Hoagland diluée au quart contenant différentes concentrations de  $\text{NiCl}_2$ . Les racines (rincées à l'eau déminéralisée) et les parties aériennes ont été analysées en spectrométrie d'absorption atomique. Étant donné le faible poids de matière sèche du matériel à la récolte (10 à 100 mg/plant), les analyses ont été effectuées sur des échantillons de 10 à 20 plants.

Les analyses ont ensuite porté sur les organes de plants plus âgés. Pour cette étude, les plants de maïs GH 5010 ont été cultivés sur vase de végétation en serre, pendant 24 à 108 jours, sur le sol alluvial équilibré (cf. tableau 2.3) préalablement mélangé avec 62,5 ou 125 mg de Ni (sous forme de sulfate) par kg de sol. Les analyses, en spectrométrie d'absorption atomique, ont porté sur les racines, chaque feuille, chaque entre-noeud, les grains, le rachis et la panicule (inflorescence mâle).

La seconde série d'expériences avait pour but de préciser la localisation du nickel à l'échelle histologique et cytologique. Pour cela, différentes techniques ont été utilisées (détaillées au paragraphe 2.9) : coloration des tissus par le diméthylglyoxime, révélation par la méthode au sulfure d'argent, autoradiographie, et analyse des rayons-X à la microsonde électronique couplée à la microscopie électronique à balayage ou à transmission. Les expériences ont porté sur les plants de maïs XL 94 (Ni-sensible) et Hycorn 80 (Ni-tolérant), cultivés pendant 8 jours sur solution de Hoagland diluée au quart et contenant différentes concentrations de  $\text{NiCl}_2$ .

## 5.2. RÉSULTATS

### 5.2.1. Répartition du nickel à l'échelle de la plante

Chez de jeunes plants de maïs cultivés pendant 8 jours sur solution, on constate (tableau 5.1) que les racines des plants exposés au nickel ont des teneurs en Ni beaucoup plus élevées que les parties aériennes, quelle que soit la concentration en Ni dans la solution de culture, et qu'elles contiennent 70 à 80 % du nickel immobilisé par la plante.

**Tableau 5.1. Répartition du nickel dans la plantule de maïs GH 5010.** Les plants ont été cultivés pendant 8 jours sur solution de Hoagland diluée au quart, contenant différentes concentrations en  $\text{NiCl}_2$ . Les analyses ont porté sur des lots de 15 à 20 plants réunis. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  leurs écarts-types calculés sur 3 répétitions (3 lots). (entre parenthèses le % de Ni immobilisé).

Organes	Ni ( $\mu\text{M}$ )	Poids total de matière sèche ( $\text{mg.plt}^{-1}$ )	Teneurs ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ MS)	Immobilisations moyennes ( $\mu\text{g.plant}^{-1}$ )
Parties aériennes	0	$56,7 \pm 7,3$	$3 \pm 1$	0,17 (43 %)
	20	$57,2 \pm 9,1$	$70 \pm 12$	4,00 (21 %)
	40	$54,6 \pm 6,7$	$105 \pm 14$	5,73 (20 %)
	60	$43,6 \pm 6,1$	$127 \pm 21$	5,54 (30 %)
Racines	0	$16,4 \pm 2,8$	$14 \pm 3$	0,23 (57 %)
	20	$17,2 \pm 2,2$	$889 \pm 105$	15,31 (79 %)
	40	$12,5 \pm 1,9$	$1785 \pm 157$	22,25 (80 %)
	60	$7,2 \pm 1,2$	$1810 \pm 210$	12,95 (70 %)

Chez des plants de maïs adultes exposés au nickel, les racines accumulent toujours beaucoup plus de Ni (plus de 90 %) que les parties aériennes (tableau 5.2). Au niveau de ces dernières, les feuilles ont des teneurs et des immobilisations en Ni plus élevées que les tiges. Les organes reproducteurs semblent faire partie des organes les plus riches au sein des parties aériennes : les grains ont à peu près autant de Ni que les feuilles, et la panicule paraît avoir les teneurs les plus élevées.

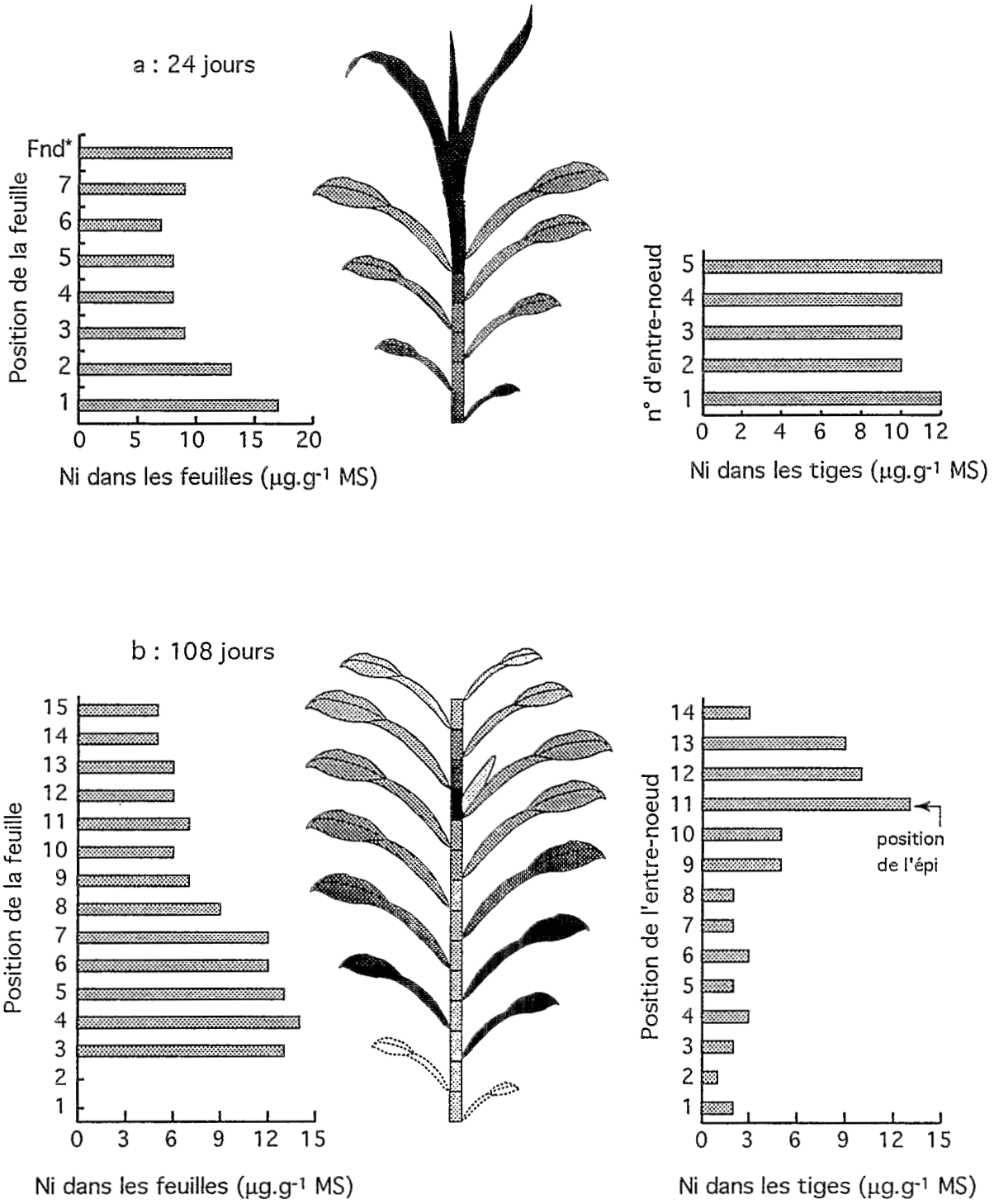
**Tableau 5.2. Répartition du nickel chez le plant de maïs GH 5010 adulte.** Les plants ont été cultivés en serre pendant 108 jours sur le sol alluvial équilibré, mélangé avec des quantités croissantes de NiSO<sub>4</sub>. Les résultats sont les moyennes calculées sur 4 répétitions (pour les racines), 6 répétitions (pour les feuilles et les tiges), ou 12 répétitions (pour les grains). Pour les autres organes, les analyses ont porté sur des échantillons de 12 plants. (entre parenthèses le % de Ni immobilisé).

		—— Ni ajouté dans le sol (mg.kg <sup>-1</sup> ) ——			
Organes		PPDS	0	62,5	125
Teneurs (µg Ni.g <sup>-1</sup> MS)	Panicule	-	2	4	12
	Grains	1,8	0,7 a	3,8 b	6,2 c
	Rachis	-	< 1	2,0	3,0
	Spathes	-	< 1	2,2	3,1
	Feuilles	2,1	1,7 a	3,9 b	8,1 c
	Tiges	1,1	0,4 a	1,2 a	3,1 b
	Racines	165	45 a	306 b	404 b
Immobilisations (µg Ni.plt <sup>-1</sup> )	Panicule	-	6,3 (0,3 %)	13,2 (0,1 %)	32,4 (0,2 %)
	Grains	-	73,3 (3,6 %)	322,6 (2,8 %)	374,5 (2,8 %)
	Rachis	-	< 1	23,4 (0,2 %)	60,3 (0,5 %)
	Spathes	-	< 1	31,5 (0,3 %)	49,6 (0,4 %)
	Feuilles	-	81,8 (4,1 %)	187,1 (1,6 %)	407,5 (3,1 %)
	Tiges	-	20,0 (1 %)	50,6 (0,5 %)	143,3 (1,0 %)
	Racines	-	1820 (91 %)	10750 (94,5 %)	12200 (92 %)

Les valeurs sur la même ligne non suivies par la même lettre sont significativement différentes au seuil de 5 %.

La répartition du nickel entre les différentes feuilles et les différents entre-noeuds du jeune plant et du plant adulte varie également de façon importante. Ainsi, chez le jeune plant (Fig. 5.1a), les feuilles les plus riches semblent être les feuilles supérieures et inférieures, tandis que celles situées entre ces deux niveaux ont des teneurs sensiblement plus faibles.

Chez le plant de maïs adulte (Fig. 5.1b), les feuilles de la partie inférieure semblent contenir nettement plus de Ni que les feuilles du haut. Au niveau des entre-noeuds, il y a manifestement une accumulation relative de nickel dans l'entre-noeud qui porte l'épi.



**Fig. 5.1. Répartition du nickel dans les parties aériennes du jeune plant de maïs (a) et du maïs GH 5010 adulte (b).** Les plants ont été cultivés en serre pendant 24 jours (a) ou 108 jours (b) (jusqu'à maturité) sur le sol alluvial équilibré, mélangé avec 125 mg de Ni par kg de sol (sous forme de  $\text{NiSO}_4$ ). A la récolte, chaque feuille et chaque entre-noeud ont été analysés (sauf les deux premières feuilles pour (b), abîmées). Les analyses ont été faites sur des échantillons moyens issus de 6 plants (a) ou de 4 plants (b). \*Fnd : feuilles non dégainées.

### 5.2.2. Localisation histologique du nickel

Sur de jeunes maïs de 8 jours cultivés sur solution, des coupes de différents organes (milieu du limbe de la deuxième feuille, gaine foliaire, base de la racicule (à 1 cm du collet), zone d'élongation et zone méristématique de la racicule) ont été effectuées puis analysées à la microsonde couplée à la microscopie électronique à balayage. La tige n'a pu être analysée, celle-ci étant constituée à ce stade de développement par un emboîtement de gaines et de feuilles en cours d'émission. Rappelons que les tirs sont dirigés sur les parois, l'intégrité du cytoplasme n'étant pas conservée lors de la déshydratation de la coupe.

La limite de détection de la technique étant environ de  $500 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MS, l'analyse a porté uniquement sur les plants exposés au nickel. Les résultats ont permis de différencier des zones d'accumulation de Ni au niveau de différents organes des deux cultivars de maïs. Le nickel semble ainsi se localiser préférentiellement au niveau de la base de la racicule chez le maïs XL 94, plus précisément au niveau de l'endoderme, du péricycle, du xylème et du phloème, ainsi que modérément au niveau du cortex (Fig. 5.2 et tableau 5.3). On constate la même répartition dans les tissus de la zone d'élongation, mais à des teneurs plus faibles (tableau 5.3). Chez le cultivar Hycorn 80, la base de la racicule est également l'organe d'accumulation privilégié : Ni y est localisé principalement au niveau de l'endoderme, et modérément au niveau du cortex (tableau 5.4). Les tissus de la zone d'élongation présentent la même localisation avec des teneurs moindres. Les spectres RX correspondant à l'analyse de la base de la racicule (Fig. 5.3) mettent nettement en évidence, entre les deux cultivars, les différences de localisation de Ni décrites ci-dessus. Par contre, aucune teneur significative n'est détectée au niveau du limbe, de la gaine foliaire ou de l'apex racinaire (tableaux 5.3 et 5.4).

Les analyses à la microsonde montrent par ailleurs que les teneurs élevées en Ni semblent être associées à de fortes teneurs en soufre. La corrélation entre ces deux éléments est en effet hautement significative ( $r = 0,749$ , significatif à 0,1 %, Fig. 5.4). Ceci ne paraît pas être un artefact, car Ni est apporté dans la solution sous forme  $\text{NiCl}_2$ , et non  $\text{NiSO}_4$ .

La coloration des racines par le diméthylglyoxime, colorant spécifiquement le nickel en rouge, corrobore en partie les résultats obtenus à la microsonde. En effet, on constate la présence de quantités importantes de nickel au niveau de la stèle de la base de la racicule et de celles des racines latérales de maïs XL 94 (Fig. 5.5 D). La technique ne permet cependant pas de préciser à quel niveau de la stèle est localisé Ni. On constate également une coloration importante au niveau de l'apex de la racicule du plant exposé au nickel, surtout chez le cultivar XL 94 (Fig. 5.5 A-C). L'apex est coloré sur environ 0,5 à 1 mm de longueur dans le sens axial, suggérant la présence de Ni au niveau du méristème ou/et au niveau de la coiffe. Au regard de la gamme de coloration (Fig. 5.6), les quantités présentes au niveau de l'apex du cultivar XL 94 pourraient être élevées.



Les autoradiographies de plants (cv XL 94) exposés au nickel radioactif ( $1,3 \mu\text{g } ^{63}\text{Ni.l}^{-1}$ , soit  $740 \text{ kBq.l}^{-1}$ ) montrent que l'apex de la racicule et ceux des racines latérales contiennent davantage de nickel que les autres tissus (Fig. 5.7). Les parties aériennes ne sont pas marquées, même après 8 jours d'absorption sur une solution contenant le double de  $^{63}\text{Ni}$  ( $1480 \text{ kBq.l}^{-1}$ ).

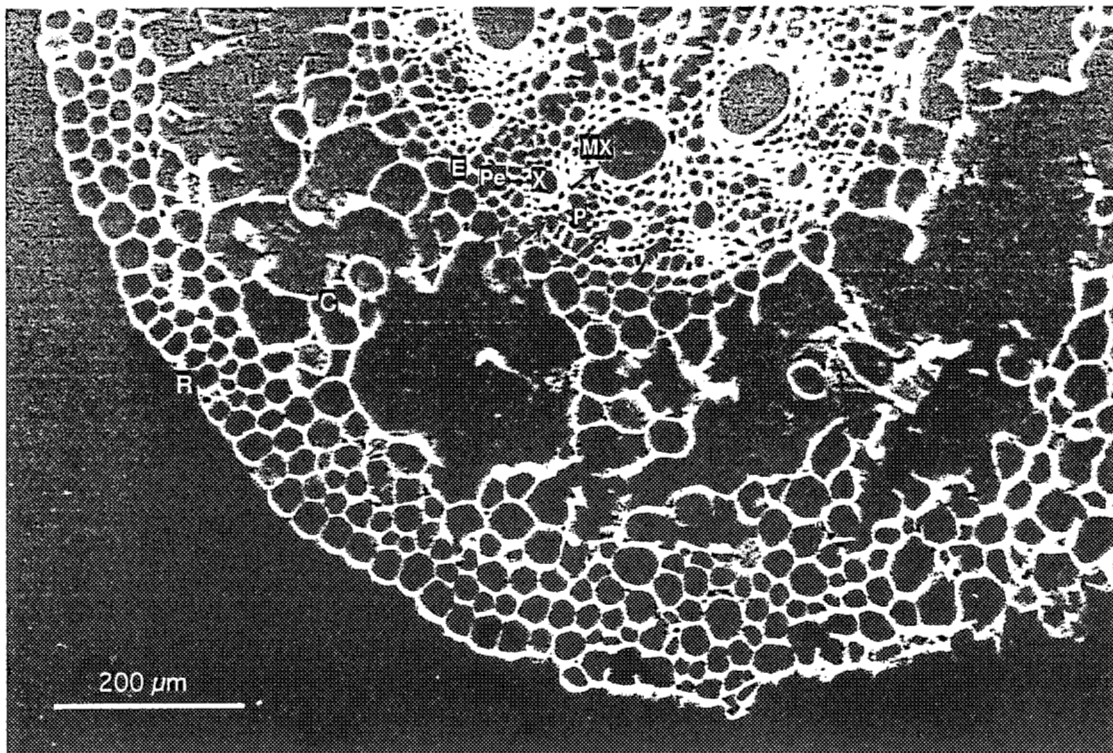
La localisation du nickel a également été mise en évidence par la méthode au sulfure d'argent sur des coupes transversales de tissus observées en microscopie optique (Fig. 5.8). Pour mémoire, les colorations blanches (en fond noir) ou noires (en lumière blanche) sont des ions argent réduits et fixés à l'emplacement des métaux lourds.

Au niveau de l'apex de la racicule, on constate chez XL 94 exposé au nickel une coloration importante, au niveau pariétal et cytoplasmique, dans le centre de la coupe correspondant probablement au méristème (Fig. 5.8 A et B). Cette coloration n'apparaissant pas chez le témoin suggère la présence de nickel dans ces zones.

La coloration de la base de la racicule de maïs XL 94 révèle la présence de Ni principalement sur les parois du xylème et du métaxylème, et modérément sur celles de l'endoderme (Fig. 5.8 C et D). Les cellules du parenchyme cortical sont également légèrement colorées au niveau pariétal et cytoplasmique.

S'agissant des limbes, la figure 5.8 F suggère la présence de nickel au niveau des chloroplastes des gaines périvasculaires du maïs XL 94.

Aucune différence significative de coloration n'a été observée entre les deux cultivars avec la méthode au sulfure d'argent, hormis sur les limbes, lesquels sont moins colorés chez Hycorn 80 que chez XL 94 (Fig. 5.8 F et G).



**Fig. 5.2.** Localisation du nickel par la microsonde électronique couplée à la microscopie électronique à balayage au niveau de la base de la racine du maïs XL 94. Les plants ont été cultivés pendant 8 jours sur solution de Hoagland 1/4 avec  $60 \mu\text{M}$  de  $\text{NiCl}_2$ . La racine a ensuite été coupée transversalement au cryomicrotome à 1 cm du collet. Les lettres indiquent les endroits où ont été effectués les tirs. Les lacunes au niveau du cortex sont des aérénchymes se développant chez les plants cultivés sur solution. Les flèches indiquent les zones riches en nickel.

C : Cortex, E : Endoderme, MX : Métaxylème, P : Phloème, Pe : Péricycle, R : Rhizoderme, X : Xylème.

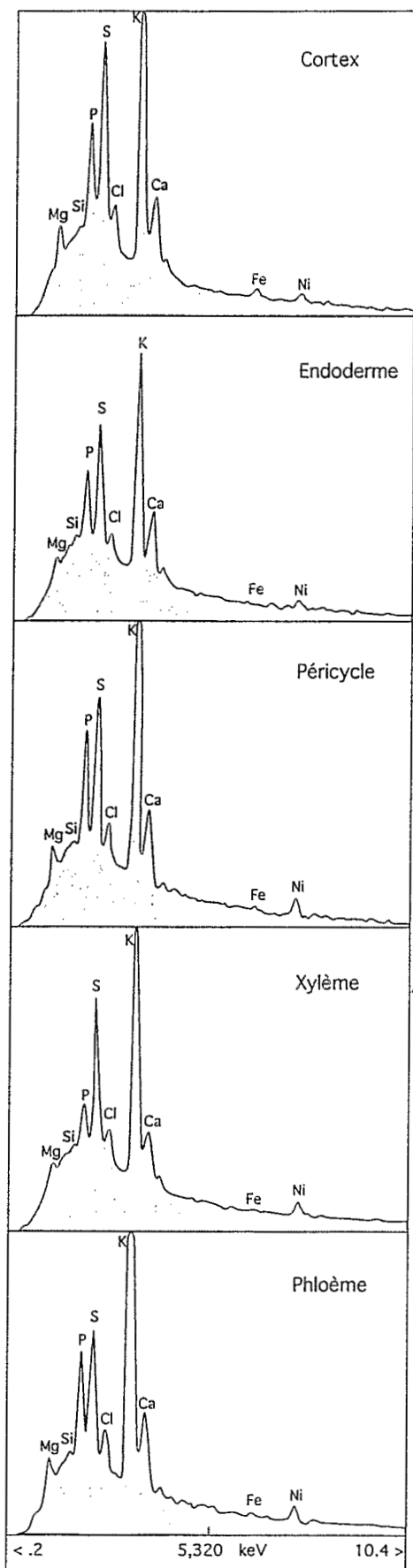
**Tableau 5.3. Répartition du nickel et des autres éléments dans les tissus du maïs XL 94.** Les plants ont été cultivés pendant 8 jours sur solution de Hoagland diluée 4 fois, à 60  $\mu\text{M}$  de Ni. L'analyse a été faite à la microsonde électronique en microscopie à balayage, sur des coupes transversales de tissus. Les valeurs sont les concentrations apparentes moyennes sur 4 à 6 tirs, exprimées par rapport à la matière sèche. L'écart-type est reporté pour Ni : seules les moyennes supérieures au double de l'écart-type sont significatives.

	Mg	P	S	K	Ca	Fe	Ni
	————— (%) —————				————— ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) —————		
<b>LIMBE :</b>							
épiderme	0,28	0,16	0,26	2,38	1,20	260	560 $\pm$ 420
mésophylle	0,21	0,24	0,23	1,48	0,91	40	200 $\pm$ 400
tissus vasculaires	0,20	0,54	0,45	2,41	0,92	230	480 $\pm$ 430
<b>GAINÉ FOLIAIRE:</b>							
épiderme	0,24	0,45	0,13	3,08	0,85	50	280 $\pm$ 450
parenchyme	0,11	0,60	0,13	1,70	0,56	300	40 $\pm$ 450
xylème	0,37	0,68	0,19	2,47	0,62	30	330 $\pm$ 460
<b>BASE DE LA RADICULE :</b>							
épiderme	0,07	0,60	0,35	0,82	0,20	4350	560 $\pm$ 420
cortex	0,36	0,94	1,17	2,29	0,54	100	1230 $\pm$ 500
endoderme	0,19	0,61	0,75	1,37	0,46	70	1780 $\pm$ 580
péricycle	0,22	0,88	0,85	2,22	0,37	150	3180 $\pm$ 840
xylème	0,25	0,35	0,92	1,99	0,24	130	2200 $\pm$ 710
phloème	0,18	0,85	0,76	2,53	0,38	550	2750 $\pm$ 980
parenchyme vasculaire	0,20	1,20	0,68	1,80	0,38	220	1740 $\pm$ 890
<b>ZONE D'ÉLONGATION RACINAIRE :</b>							
épiderme	0,05	0,44	0,21	0,63	0,01	1230	110 $\pm$ 430
cortex	0,09	0,90	0,48	1,24	0,08	170	150 $\pm$ 410
endoderme	0,20	1,56	0,68	2,03	0,08	20	1370 $\pm$ 580
péricycle	0,19	1,94	0,59	2,17	0,09	190	1770 $\pm$ 710
xylème	0,17	1,27	0,43	2,23	0,08	270	1510 $\pm$ 650
phloème	0,17	1,42	0,45	3,17	0,14	100	1210 $\pm$ 570
<b>APEX RACINAIRE :</b>							
épiderme	0,10	0,98	0,21	1,02	0,03	80	730 $\pm$ 460
méristème	0,22	3,00	0,59	1,38	0,10	20	580 $\pm$ 450

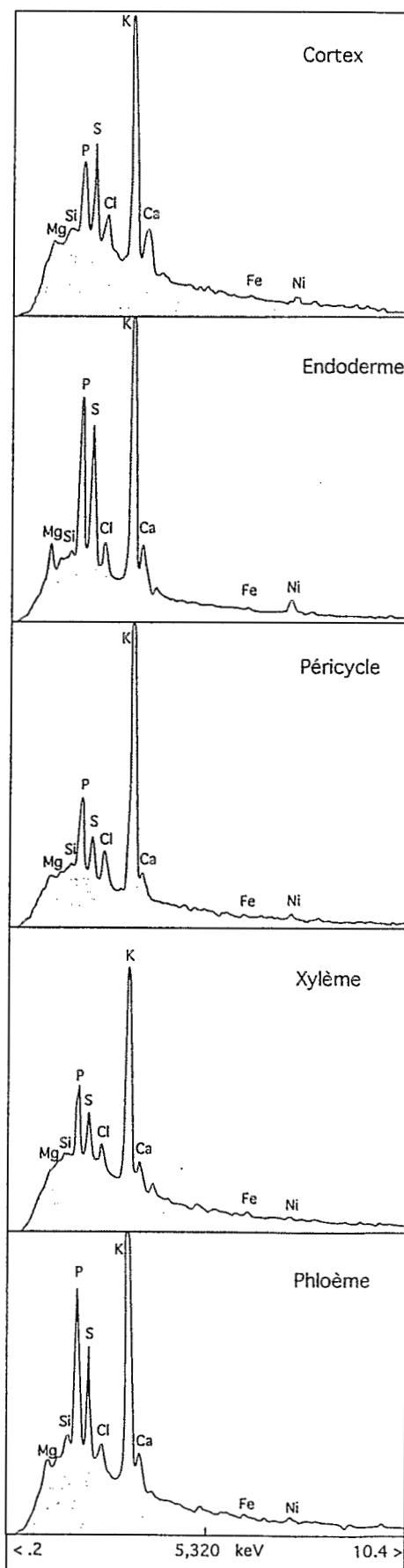
**Tableau 5.4. Répartition du nickel et des autres éléments dans les tissus du maïs Hycorn 80.** Les plants ont été cultivés pendant 8 jours sur solution de Hoagland diluée 4 fois, à 60  $\mu\text{M}$  de Ni. L'analyse a été faite à la microsonde électronique en microscopie à balayage, sur des coupes transversales de tissus. Les valeurs sont les concentrations apparentes moyennes sur 4 à 6 tirs, exprimées par rapport à la matière sèche. L'écart-type est reporté pour Ni : seules les moyennes supérieures au double de l'écart-type sont significatives.

	Mg	P	S	K	Ca	Fe	Ni
	————— (%) —————					— ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) —	
<b>FEUILLE :</b>							
épiderme	0,24	1,12	0,59	3,49	2,09	310	380 $\pm$ 590
mésophylle	0,85	1,82	0,25	2,15	1,81	100	770 $\pm$ 650
tissus vasculaires	0,37	1,34	0,27	3,34	0,87	280	1060 $\pm$ 570
<b>GAINÉ FOLIAIRE :</b>							
épiderme	0,16	0,55	0,23	3,30	0,68	160	110 $\pm$ 550
xylème	0,30	0,85	0,35	3,87	0,47	380	420 $\pm$ 590
<b>BASE DE LA RADICULE :</b>							
épiderme	0,17	0,68	0,69	1,14	0,12	1230	390 $\pm$ 550
cortex	0,34	0,87	1,76	3,11	0,38	80	<b>1490</b> $\pm$ 620
endoderme	0,46	1,55	1,62	2,14	0,20	180	<b>2880</b> $\pm$ 910
péricycle	0,29	1,81	0,69	3,26	0,18	150	670 $\pm$ 620
xylème	0,22	1,54	1,16	3,05	0,37	260	390 $\pm$ 600
phloème	0,33	1,69	1,88	4,21	0,33	170	1050 $\pm$ 680
parenchyme vasculaire	0,31	2,10	1,12	2,73	0,29	205	510 $\pm$ 560
<b>ZONE D'ÉLONGATION RACINAIRE :</b>							
épiderme	0,14	0,34	0,15	0,77	0,02	590	70 $\pm$ 530
cortex	0,26	1,70	0,62	2,33	0,17	210	<b>1270</b> $\pm$ 540
endoderme	0,13	0,83	0,38	1,92	0,09	380	<b>1460</b> $\pm$ 760
péricycle	0,17	0,97	0,55	2,45	0,13	430	550 $\pm$ 470
xylème	0,08	0,44	0,15	2,89	0,04	400	650 $\pm$ 540
phloème	0,16	1,14	0,43	2,93	0,18	250	880 $\pm$ 450
<b>APEX RACINAIRE :</b>							
épiderme	0,27	1,35	0,51	1,52	0,14	310	1230 $\pm$ 750
méristème	0,38	3,13	0,76	1,39	0,26	120	320 $\pm$ 610

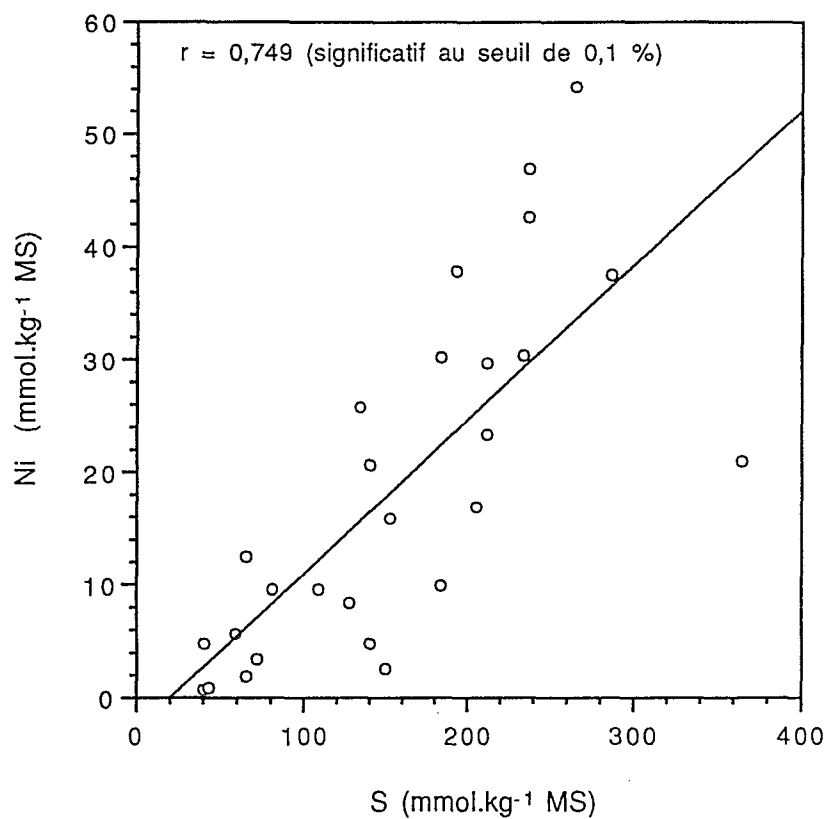
XL 94



Hycorn 80

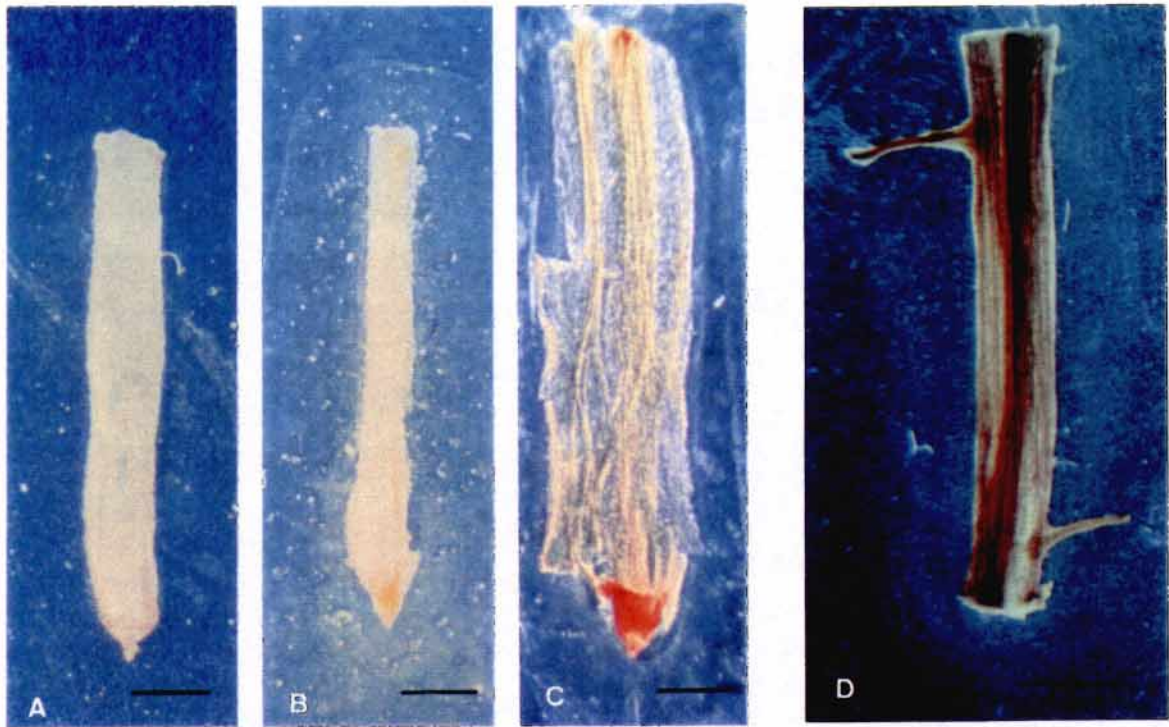


**Fig. 5.3. Spectres RX résultant de l'analyse à la microsonde électronique de la base de la racine des maïs XL 94 et Hycorn 80.** Les plants ont été cultivés pendant 8 jours sur solution de Hoagland diluée au quart et contenant  $60 \mu\text{M}$  de  $\text{NiCl}_2$ . Noter les différences de concentrations en Ni entre les deux cultivars de maïs au niveau du péricycle, du xylème et du phloème.



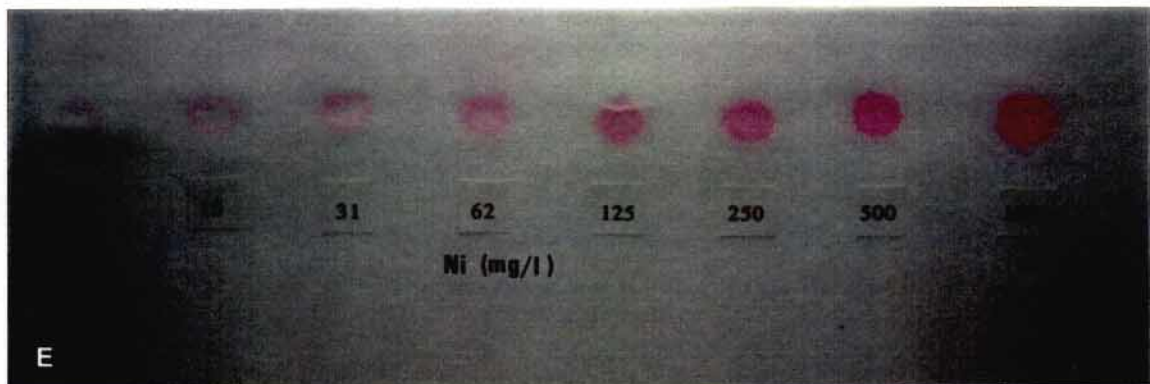
**Fig. 5.4.** Corrélation entre la teneur en nickel et la teneur en soufre dans les tissus du maïs. L'analyse a été effectuée à la microsonde en microscopie électronique à balayage. La zone analysée est la base de la racine. A chaque point correspond une analyse.





**Fig. 5.5. Révélation du nickel par le diméthylglyoxime au niveau des racines de maïs Hycorn 80 et XL 94.** Les plants ont été cultivés pendant 4 jours sur solution de Hoagland diluée au quart contenant différentes concentrations de  $\text{NiCl}_2$ . Les racines fraîches essorées ont été ensuite légèrement écrasées entre deux lames, mises en contact avec une goutte de diméthylglyoxime à 0,1 %, puis séchées à l'air. Les photos sont faites à la loupe binoculaire, avec rétro-éclairage en fond noir.

A : apex de la racine du témoin sans Ni. B : apex de Hycorn 80 exposé à  $50 \mu\text{M}$  de Ni. C : apex de XL 94 exposé à  $50 \mu\text{M}$  de Ni. Noter la forte coloration rouge au niveau de l'apex. D : base de la racine de XL 94 exposé à  $50 \mu\text{M}$  de Ni. Noter la coloration au niveau de la stèle. Barres = 1 mm.



**Fig. 5.6. Gamme de coloration du nickel avec le diméthylglyoxime.** Une goutte de solution de  $\text{NiCl}_2$  de concentration croissante a été déposée sur un papier buvard avec une goutte de diméthylglyoxime à 0,1 %.



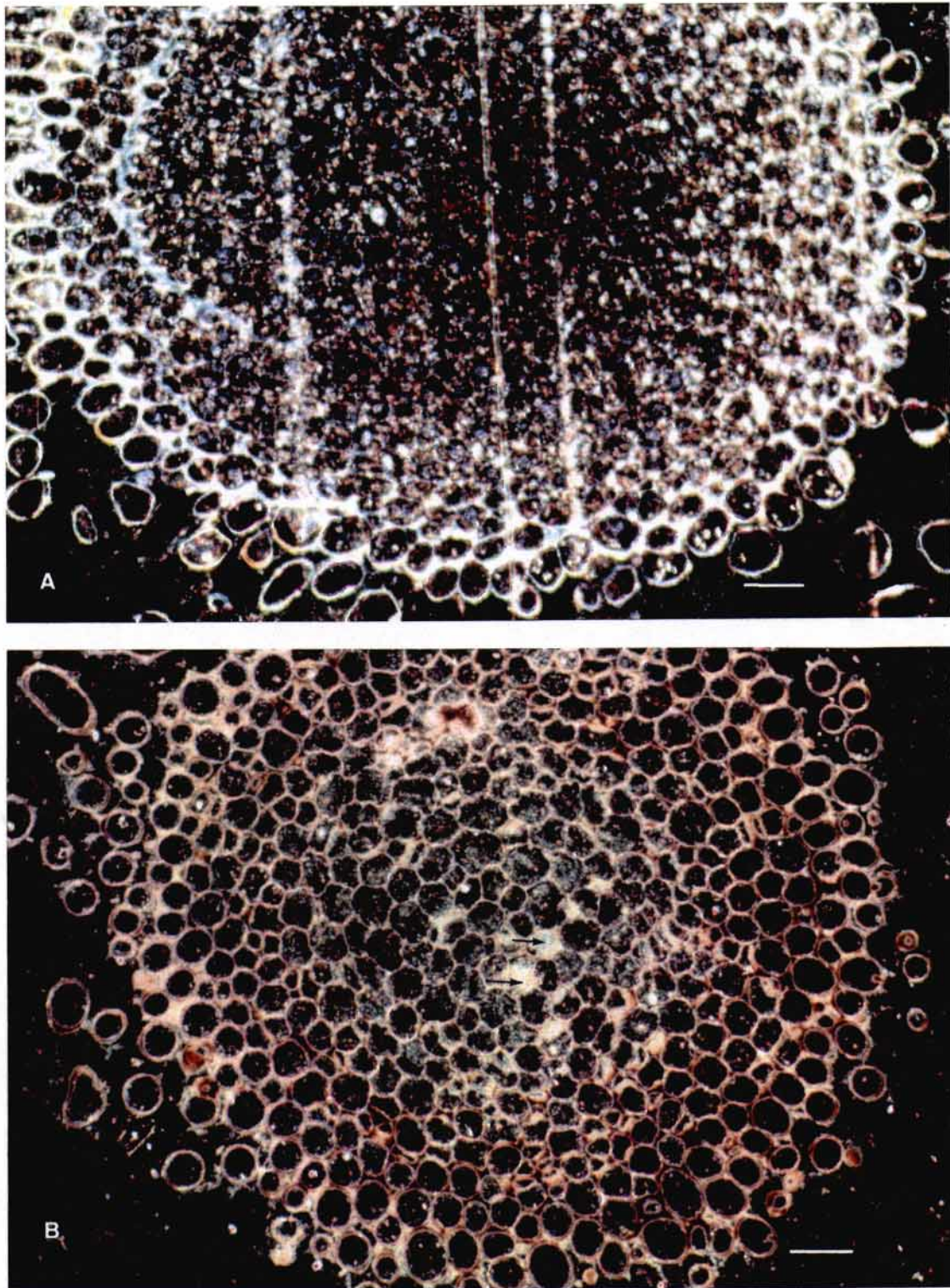




**Fig. 5.7. Localisation du nickel par autoradiographie des plants de maïs XL 94.** Les plants ont été cultivés pendant 8 jours sur solution de Hoagland diluée au quart. Au 8<sup>ème</sup> jour les plants ont été placés sur la même solution nutritive marquée en plus avec  $^{63}\text{NiCl}_2$  ( $1,31 \mu\text{g } ^{63}\text{Ni.l}^{-1}$ , soit  $740 \text{ kBq.l}^{-1}$ ), pendant 1 h, 3 h, et 9 h. Les plants ont été ensuite rincés, séchés, puis autoradiographiés. Seul le système racinaire est présenté, les parties aériennes n'étant pas marquées. (Taille réelle).

Noter la coloration intense au niveau de l'apex de la radicule et des apex des racines latérales (flèches).

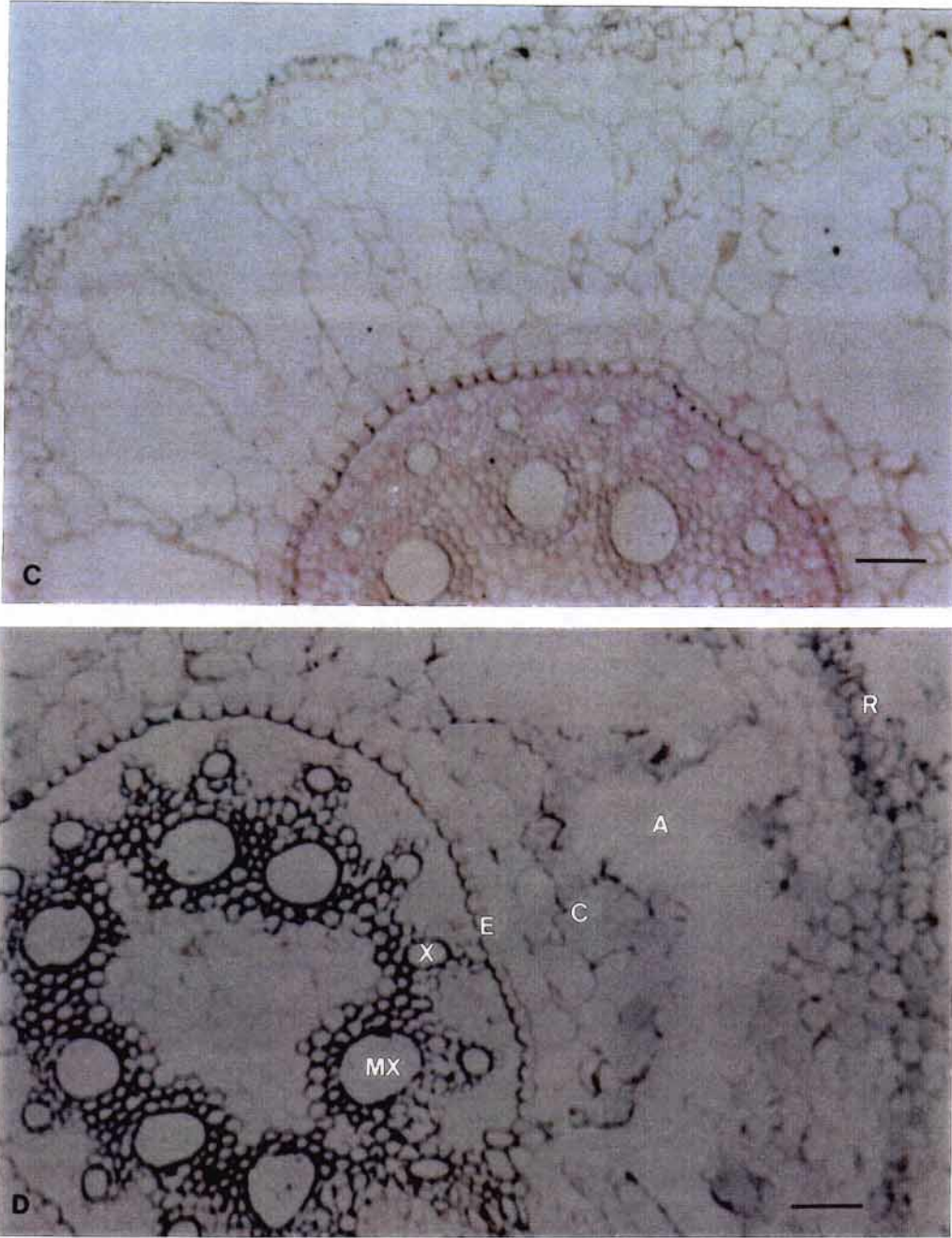




**Fig. 5.8. Localisation du nickel chez les maïs XL 94 et Hycorn 80 par la méthode au sulfure d'argent.** Les plants ont été cultivés pendant 10 jours sur solution de Hoagland diluée au quart contenant différentes concentrations de  $\text{NiCl}_2$ . Photos faites en microscopie optique. La coloration (blanche en fond noir, ou noire en lumière blanche, cf. page suivante) est de l'argent réduit fixé à l'emplacement des métaux.

**A, B :** coupes transversales dans la zone méristématique racinaire du maïs XL 94. Fond noir. **A :** témoin. **B :** plant exposé à  $30 \mu\text{M}$  de Ni. Noter la présence d'Ag au niveau des parois et du cytoplasme des cellules du méristème (flèches). Barres =  $50 \mu\text{m}$ .



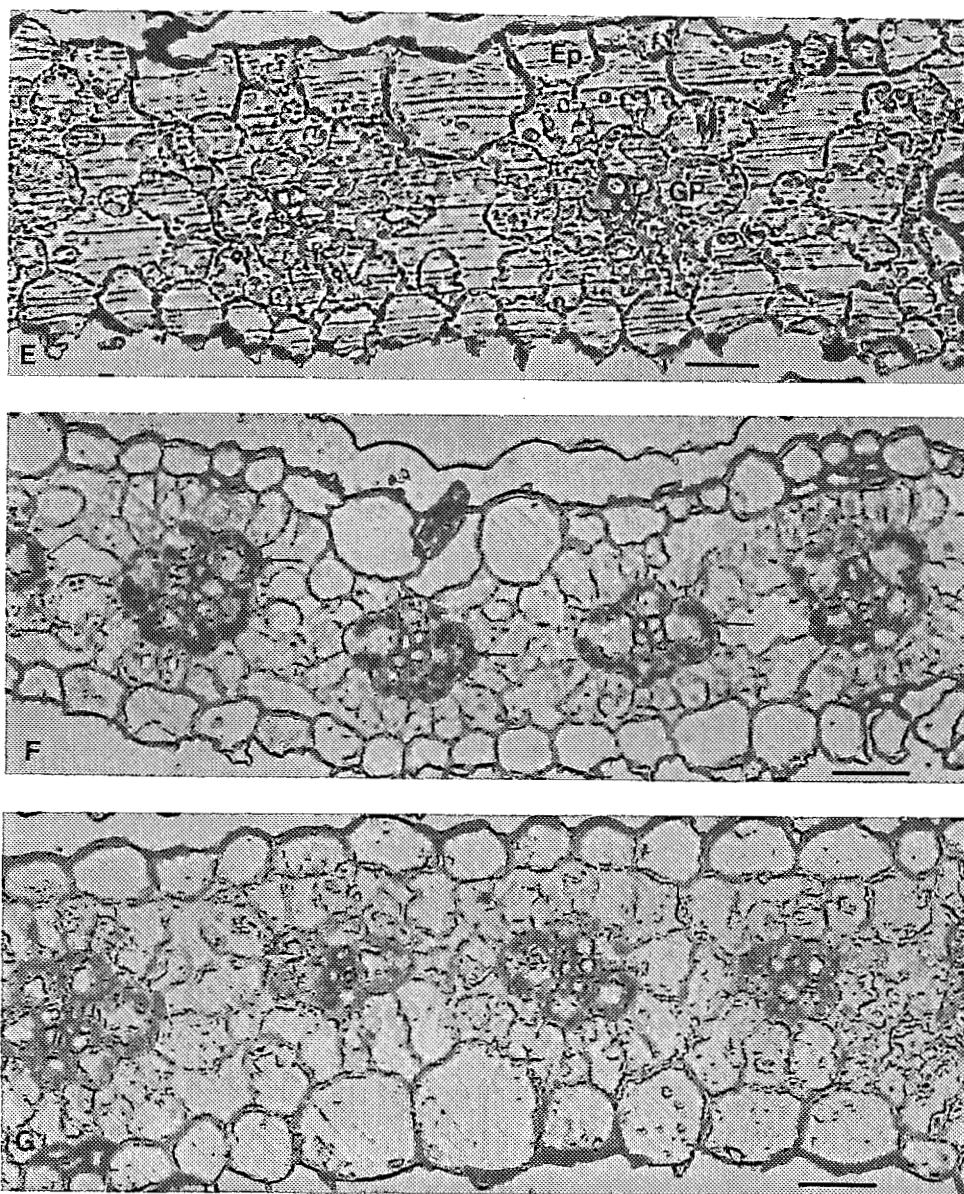


**Fig. 5.8 (suite).**

**C, D** : coupes transversales de la base de la racine de maïs XL 94. Lumière blanche. **C** : témoin. **D** : plant exposé à 30 µM de Ni. Noter la forte coloration noire au niveau des parois des vaisseaux du métaxylème et du xylème, et la coloration modérée au niveau des parois de l'endoderme ainsi que de la paroi et du cytoplasme des cellules du cortex. Barres = 100 µm.

A : aerenchyme; C : cortex, E : endoderme, MX : métaxylème, R : Rhizoderme, X : xylème.





**Fig. 5.8 (suite).**

**E-G** : coupes transversales du milieu du limbe de la 2<sup>ème</sup> feuille. Lumière blanche. **E** : témoin (cv XL 94). **F** : maïs XL 94 exposés à 60  $\mu\text{M}$  de Ni. Noter la forte coloration au niveau des chloroplastes des gaines périvasculaires (flèches). **G** : maïs Hycorn 80 exposés à 60  $\mu\text{M}$  de Ni. On ne distingue pas de coloration importante. Barres = 50  $\mu\text{m}$ .

Ep : épiderme, GP : gaine périvasculaire, M : Mésophylle, TV : tissus vasculaires.





### 5.3. DISCUSSION ET CONCLUSION

L'étude de la répartition du nickel dans le plant de maïs montre qu'il s'accumule essentiellement dans les racines, celles du jeune plant en immobilisant 70 à 80 % du total (tableau 5.1), celles du plant adulte plus de 90 % (tableau 5.2). Cette accumulation de Ni au niveau des racines semble être le cas pour la majorité des plantes (Cataldo *et al.*, 1978b; Taylor, 1988; Wallace, 1989d; Lübben et Sauerbeck, 1991; Sauerbeck et Hein, 1991; Mench *et al.*, 1992). Ce fait allant de pair avec une diminution de la croissance des racines (tableau 5.1, et cf. Fig. 4.2), il est vraisemblable que l'action toxique du nickel se situe essentiellement au niveau racinaire.

Cependant, Ni n'est pas totalement bloqué dans les racines, car un pourcentage non négligeable (20 à 30 %) est retrouvé dans les parties aériennes après seulement 8 jours de culture (tableau 5.1). Cela suggère que Ni puisse agir également au niveau des parties aériennes. Dans celles du plant adulte, les teneurs les plus élevées s'observent au niveau des feuilles, des grains et de la panicule (tableau 5.2). Une répartition identique est signalée par de nombreux auteurs (Hunter et Vergnano, 1952; Crooke et Knight, 1955; Sauerbeck et Hein, 1991; Mench *et al.*, 1992).

Chez le jeune plant de maïs de 24 jours, la répartition de Ni au sein des feuilles et des tiges n'est pas homogène : les feuilles les plus riches sont les plus âgées (feuilles inférieures) et les plus jeunes (feuilles supérieures), tandis que celles situées entre ces deux niveaux ont des teneurs sensiblement plus faibles (Fig. 5.1a). Wallace *et al.* (1977) ont constaté également des teneurs plus élevées dans la partie supérieure des tiges et feuilles du maïs de 19 jours. Il est possible que les feuilles inférieures soient plus riches en Ni du fait de leur proximité du système racinaire, qui pourrait alimenter préférentiellement les organes les plus proches, à moins qu'il ne s'agisse d'un phénomène cumulatif. Quant aux jeunes feuilles, on peut penser que Ni est relativement mobile dans le phloème et peut alimenter les tissus-puits par cette voie. Neumann et Chamel (1986) ont en effet nettement mis en évidence, chez le pois et le géranium, un transport de  $^{63}\text{Ni}$  dans le phloème, à partir des feuilles non-sénescentes vers les tissus puits.

Chez le plant adulte, les feuilles inférieures ont plus de Ni que les feuilles supérieures, tandis qu'au niveau des entre-noeuds, on peut s'étonner de l'accumulation de nickel dans celui qui porte l'épi (Fig. 5.1b). Étant donné les teneurs en Ni relativement élevées dans les grains et dans la panicule, il paraît probable qu'une partie du Ni contenu dans les feuilles supérieures ait migré vers les organes reproducteurs au moment de leur formation, ce qui expliquerait les teneurs élevées dans les entre-noeuds situés à proximité de l'épi. Ni pourrait donc suivre la voie de transport des photoassimilats. En effet, selon Prioul (1983) les feuilles alimentent les puits les plus proches : les feuilles inférieures fournissent plutôt les entre-noeud et les racines,

tandis que les feuilles supérieures alimentent les points végétatifs et principalement l'épi à partir de la floraison. Ainsi, le nickel contenu dans les feuilles proches de l'épi pourrait avoir été mobilisé au profit de ce dernier et de l'inflorescence mâle (panicule), en transitant au niveau des proches entre-noeuds. Ce résultat soutient l'hypothèse du paragraphe précédent selon laquelle Ni serait en partie transporté dans le phloème.

L'analyse à la microsonde confirme la présence plus importante de nickel dans les racines, en précisant sa localisation : il s'accumule en grande partie sur les parois de l'endoderme des deux cultivars de maïs XL 94 (Ni-sensible) et Hycorn 80 (Ni-tolérant), et ce davantage à la base de la racine que dans la zone d'élongation, ce qui correspond à des tissus plus différenciés (Figs. 5.2 et 5.3, tableaux 5.3 et 5.4). La même localisation a été mise en évidence par la méthode au sulfure d'argent et par la coloration au diméthylglyoxime (Figs. 5.8D et 5.5). L'endoderme jouant un rôle de barrière au transport apoplasmique des ions, d'autant plus que les tissus sont différenciés, il paraît logique que Ni soit bloqué à ce niveau. Il est probable que le nickel puisse déplacer une partie du calcium lié aux polygalacturonates des pectines, en particulier au niveau de la lamelle moyenne et de la paroi primaire, tel que cela a été suggéré par Varner et Taylor (1989). Khan *et al.* (1984) ont d'ailleurs montré sur des racines de maïs que le cadmium est localisé principalement au niveau des résidus pectiques de la lamelle moyenne séparant l'endoderme du péricycle.

Toutefois, Ni est également retrouvé au niveau du péricycle, ainsi que sur les parois du xylème et du phloème chez le cultivar Ni-sensible, surtout à la base de la racine (tableau 5.3). Dans ce cas, Ni semble pouvoir passer en partie à travers l'endoderme (peut-être par le biais de cellules de passage) et, suivant une voie symplasmique, atteindre les vaisseaux du xylème puis les parties aériennes, avant d'être redistribué dans la plante comme en témoigne sa présence en quantité significative dans le phloème. Le cultivar Ni-tolérant ne contient pas de quantités significatives de Ni au niveau du xylème et du phloème, que ce soit à la base ou dans la zone d'élongation de la racine (tableau 5.4). Ce résultat suggère que la tolérance de ce cultivar vis à vis de Ni (cf. Fig. 4.7 et 4.8) pourrait être due à des différences de constitution des parois de l'endoderme de son système racinaire, lui conférant la capacité de limiter le transport de Ni vers les parties aériennes.

Cependant, il est possible que Ni puisse atteindre les parties aériennes non pas en traversant l'endoderme, mais par le biais d'une absorption au niveau des apex racinaires, où l'endoderme n'est pas différencié. Il a été en effet montré que ce passage constitue une voie d'absorption préférentielle du plomb chez les racines de peuplier (Ksiazek et Wozny, 1990), et Punz et Sieghardt (1993) suggèrent que cela pourrait être le cas pour tous les métaux. Selon Turina (1968), l'absorption du nickel chez les monocotylédones (seigle, blé et maïs) a lieu principalement au travers de la coiffe de la racine. Dans le cas de l'absorption du nickel

par le maïs, nos résultats sont en accord avec cette hypothèse : on constate en effet la présence de Ni en quantité importante au niveau de l'apex de la racicule par coloration avec le diméthylglyoxime (Fig. 5.5), un marquage important de l'apex de la racicule et de ceux des racines latérales par autoradiographie de plants ayant absorbé du  $^{63}\text{Ni}$  (Fig. 5.7), ainsi que la présence d'argent, correspondant à l'emplacement de Ni au niveau du méristème de la racicule avec la méthode au sulfure d'argent (Fig. 5.8 B). La gamme de coloration du nickel par le diméthylglyoxime (Fig. 5.6) suggère que les teneurs en nickel des apex sont relativement élevées, surtout chez le cultivar XL 94. Toutefois, elles ne dépassent probablement pas  $500 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MS, l'analyse à la microsonde n'ayant pas révélé de teneurs significatives.

La répartition du nickel au niveau de l'apex racinaire mériterait d'être précisée. En effet, seule la méthode au sulfure d'argent suggère que Ni se situe dans le méristème, les deux autres (diméthylglyoxime et autoradiographie) manquant de précision. Toutefois, une localisation au niveau du méristème racinaire pourrait diminuer l'activité de ce dernier et permettrait de rendre compte du ralentissement de la croissance en longueur des racines observé précédemment (cf. Fig. 4.2). Robertson et Meakin (1980) ont en effet attribué le ralentissement de la croissance des racines de *Brachystegia spiciformis* exposé au nickel à une diminution de l'index mitotique au niveau du méristème racinaire. De plus, la coloration de l'apex racinaire par le diméthylglyoxime plus intense chez le cultivar XL 94 que Hycorn 80 (Fig. 5.5 B et C) doit être corrélée au ralentissement de la croissance plus important chez XL 94 (cf. Figs. 4.7 c et d), ce qui soutient l'hypothèse d'une localisation méristématique. Le méristème racinaire pourrait donc constituer un site d'action majeur de Ni. Par contre, nous n'avons pas d'explications précises quant à une fixation préférentielle de Ni à ce niveau. Il est possible qu'il puisse se lier à des protéines, qui sont très nombreuses dans le cytoplasme des cellules méristématiques, en particulier à des protéines soufrées, plusieurs auteurs ayant montré que les métaux ont de fortes affinités pour les groupements thiols des phytochélatines (Grill *et al.*, 1985; Obata et Umebayashi, 1993). La forte corrélation entre les teneurs en Ni et S sur l'ensemble des analyses à la microsonde (Fig. 5.4) est en faveur de cette hypothèse. Cependant, il semble qu'une liaison Ni-phytochélatine n'ait encore jamais été mise en évidence (cf. la synthèse bibliographique, § 1.3.6).

S'agissant des feuilles, seule la méthode au sulfure d'argent a permis de révéler la présence de nickel au niveau des limbes. Il est manifestement localisé au niveau des chloroplastes des cellules des gaines périvasculaires (Fig. 5.8 E-G). Plusieurs auteurs ont montré que Ni peut se lier aux chloroplastes (Golovchenko et Cherednichenko, 1962), en particulier au niveau du stroma et des lamelles du stroma chez le basilic (Veeranjaneyulu et Das, 1982). L'analyse à la microsonde n'ayant pas révélé de teneurs significatives, celles-ci sont probablement inférieures à  $500 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MS. Néanmoins, la localisation apparente du nickel dans les chloroplastes est en faveur d'une action au niveau foliaire. En effet, d'après de

nombreux auteurs (Carlson *et al.*, 1975; Clijsters et Van Assche, 1985; Sheoran *et al.*, 1990; Bishnoi *et al.*, 1993a), Ni pourrait inhiber la photosynthèse. De plus, la coloration plus intense des chloroplastes du cultivar XL 94 pourrait être liée à la sensibilité supérieure de ce cultivar par rapport à Hycorn 80. La quantité de nickel à ce niveau plus importante chez XL 94 pourrait provenir du fait que Ni serait moins retenu sur l'endoderme de la racine, comme cela a été constaté plus haut, lui permettant d'atteindre plus facilement les parties aériennes.

À propos des techniques de localisation de Ni, plusieurs essais de mise au point ont été expérimentés sur chacune d'elles. Ainsi, pour l'analyse à la microsonde, deux méthodes de fixation des échantillons, citées dans la littérature (Vázquez *et al.*, 1992a), ont été comparées : (1) la cryofixation (utilisée pour les échantillons analysés dans cette étude), (2) la fixation dans un tampon phosphate 0,1 M (pH 7,2) contenant 2 % de glutaraldéhyde et 0,1 % de Na<sub>2</sub>S, ce dernier étant supposé fixer tous les métaux (Danscher, 1981). Aucune différence significative n'a été constatée dans l'analyse des échantillons fixés par ces deux méthodes. Par conséquent, la cryofixation paraît préférable. Pourtant Khan *et al.* (1984) ont montré que Na<sub>2</sub>S est efficace pour fixer le cadmium chez le maïs. Mais Vázquez *et al.* (1992b) ont constaté une perte d'ions métalliques (Cd et Zn) des échantillons fixés par Na<sub>2</sub>S.

La technique de localisation du nickel par le sulfure d'argent (Danscher, 1981) apporte des résultats intéressants, mais l'interprétation des coupes se heurte à au moins une difficulté : il n'est pas certain, à nouveau, que la fixation par le Na<sub>2</sub>S soit totalement efficace pour éviter une fuite d'ions métalliques en dehors de l'échantillon. En effet, il semble que les bases des racines, en particulier, soient soumises à ce phénomène puisque l'on trouve des colorations au niveau des aérénchymes (Fig. 5.8 D), et même à l'extérieur de la coupe auprès du rhizoderme. Ce problème a été noté par d'autres auteurs (Vázquez *et al.*, 1992b). Il pourrait être évité semble-t-il en fixant l'échantillon moins longtemps (Danscher, 1981).

Pour ce qui est de la coloration des tissus avec le diméthylglyoxime, des essais sur des coupes transversales de bases de racines soit fraîches, soit fixées par le glutaraldéhyde, soit fixées puis incluses dans la résine, n'ont pas donné de résultats satisfaisants : une coloration rose apparaît effectivement dans les premières secondes au niveau de la stèle de la base de la racine des plants exposés au nickel, mais celle-ci est instable et le complexe coloré formé semble pouvoir se déplacer avant le séchage de la coupe. Seule la coloration de tissus frais légèrement écrasés entre deux lames a donné des résultats intéressants (Fig. 5.5). Toutefois, la coloration des apex racinaires intacts n'a pas été testée. Une telle étude mériterait d'être réalisée, en particulier sur des racines exposées plus ou moins longtemps au nickel. Une coloration des feuilles, en coupe ou sur des broyats, a également été testée. Aucune coloration n'a pu être détectée, celle-ci étant probablement perturbée par les pigments chlorophylliens et par des teneurs trop faibles (cette technique sur des broyats de feuilles ou d'autres organes est couramment employée avec succès par les botanistes étudiant les plantes

accumulatrices de nickel, pouvant contenir plusieurs milliers de  $\mu\text{g}$  de  $\text{Ni}\cdot\text{g}^{-1}$  MS ; cf. § 1.3.6). Notons que nous n'avons trouvé aucune référence dans la littérature traitant de coloration de tissus végétaux par le diméthylglyoxime. Seuls Rubányi *et al.* (1980) semblent l'avoir introduite pour colorer des coeurs de rats exposés au nickel. Au regard de la gamme de coloration (Fig. 5.6), cette technique semble assez sensible, et a d'ailleurs permis de différencier les teneurs en Ni des apex racinaires des deux cultivars (Fig. 5.5 B et C).

Ces techniques ne permettant pas de localiser Ni dans les cellules, une analyse à la microsonde en microscopie électronique à transmission a été effectuée dans ce but, sur différents organes des deux cultivars de maïs cultivés pendant 8 jours sur solution de Hoagland diluée au quart et contenant  $60\ \mu\text{M}$  de Ni. D'une manière générale, les résultats de ces analyses ont été très peu significatifs. Étant donné la limite de détection de la technique (environ  $500\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MS), ces résultats suggèrent que Ni n'est pas concentré à des teneurs supérieures à  $500\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MS dans les cellules. Néanmoins, quelques tirs dirigés sur les noyaux des cellules du péricycle, au niveau de la base de la racine du maïs XL 94, ont révélé la présence de quantités significatives de nickel, ce qui est en accord avec les résultats du tableau 5.3. Des auteurs ont montré que Ni peut se lier aux noyaux (Sigeo, 1982; Quintana *et al.*, 1987). Toutefois, les résultats présentés ici sont à considérer avec précaution et comme une première approche, car la technique nécessite un temps considérable pour analyser toutes les organites des cellules de l'ensemble des tissus de la plante, avec un nombre de tirs suffisant pour pouvoir être sûr des résultats.

En conclusion, il apparaît que le nickel est localisé pour une grande part dans les racines au niveau de l'endoderme, ce d'autant plus que les tissus sont différenciés. Bien que les acides polygalacturoniques des lamelles moyennes soient probablement impliqués dans la fixation de Ni à ce niveau, le type de liaison reste inconnu et mériterait d'être précisé. Des différences de constitution pariétale pourraient être ainsi à l'origine des différences d'accumulation de Ni sur l'endoderme et des différences de tolérance entre les deux cultivars de maïs. En effet, Hycorn 80, le cultivar tolérant, accumule davantage de nickel au niveau de l'endoderme que XL 94.

Le nickel pourrait être toxique en inhibant la photosynthèse et/ou en inhibant l'activité du méristème racinaire, comme en témoigne sa localisation au niveau des chloroplastes des cellules des gaines périvasculaires et au niveau des méristèmes racinaires, surtout chez le cultivar sensible. La vérification de ces hypothèses constitue un objectif majeur des travaux relatés dans chapitre suivant.



## RÉSUMÉ

Le nickel s'accumule essentiellement dans les racines du maïs, au stade de plantule comme chez le plant plus âgé (70 à 90 % du Ni immobilisé). À ce niveau, il est surtout localisé sur l'endoderme différencié.

Chez le cultivar sensible au nickel (XL 94), Ni semble pouvoir traverser l'endoderme par une voie symplasmique : il est retrouvé dans le péricycle, le xylème et le phloème.

Ni se situe également au niveau des apex racinaires, qui pourraient constituer des sites d'absorption importants. Cette localisation est susceptible d'entraîner une diminution de l'activité méristématique pouvant expliquer l'inhibition de la croissance des racines par Ni.

Dans les parties aériennes, Ni est présent en quantité relativement importante (10 à 30 % du Ni immobilisé), en particulier au niveau des feuilles les plus âgées et des tissus-puits, tels que les feuilles en croissance, la panicule et l'épi. Ces résultats suggèrent que Ni est relativement mobile dans le phloème. Une localisation fine a permis de constater sa présence dans les feuilles au niveau des chloroplastes des cellules des gaines périvasculaires.

Les différences de sensibilité au nickel entre les deux cultivars de maïs pourraient avoir comme origine des différences de propriété de l'endoderme (composition chimique ou importance relative des cellules de passage) et des différences d'affinité de Ni pour les méristèmes racinaires.

Les résultats mettent aussi en évidence les avantages et les limites des techniques utilisées pour localiser le nickel.





## CHAPITRE 6

---

### EFFETS TOXIQUES DU NICKEL SUR LA PHYSIOLOGIE DU MAÏS

---



## 6

---

### **EFFETS TOXIQUES DU NICKEL SUR LA PHYSIOLOGIE DU MAÏS**

Les travaux présentés dans les chapitres 4 et 5 ont montré, d'une part que Ni agit préférentiellement sur la croissance des racines, d'autre part que les apex racinaires constituent des sites importants d'accumulation. Le nickel pourrait donc agir directement sur l'activité des méristèmes racinaires. Toutefois, il est également présent en quantité relativement importante au niveau des chloroplastes des gaines périvasculaires des feuilles, suggérant une action potentielle au niveau foliaire. Le nickel pourrait donc être toxique en altérant le métabolisme de la plante à différents niveaux. D'après la littérature, plusieurs hypothèses sont possibles, telles que :

- inhibition de la photosynthèse ;
- blocage de la division cellulaire au niveau des méristèmes racinaires ;
- diminution du transport des carbohydrates vers les tissus puits.

L'objectif des recherches relatées dans ce chapitre est de vérifier ces hypothèses et d'approfondir les connaissances afin de mieux comprendre le mécanisme de la toxicité du nickel sur le maïs. Par ailleurs, un certain nombre de résultats, présentés dans les différents paragraphes et discutés plus en détail dans la dernière partie du chapitre, concernent la compréhension des différences de sensibilité au nickel, mises en évidence au chapitre 4, entre les deux cultivars de maïs XL 94 (Ni-sensible) et Hycorn 80 (Ni-tolérant).

#### **6.1. CARACTÉRISTIQUES DE L'ABSORPTION DU NICKEL PAR LE MAÏS**

##### **6.1.1. Conditions expérimentales**

Dans un premier temps, nous avons étudié la cinétique d'absorption du Ni par des racines excisées de maïs afin de déterminer si cette absorption se faisait par diffusion ou par un transport actif. Pour cela, nous avons utilisé le 2,4-dinitrophénol (DNP), qui est un protonophore annihilant la force motrice protonique et tous les phénomènes actifs. La cinétique a été réalisée sur des racines excisées de maïs XL 94. Les plants ont été préalablement cultivés pendant 4 jours sur solution de Hoagland diluée au quart, sans addition de nickel. Au quatrième jour, les radicules ont été excisées et rincées pendant 12 heures dans

de l'eau déminéralisée avec aération. Des lots de 8 racines excisées (environ 1 g), ont été mis à incuber à 25 °C dans 100 ml de solution de NiCl<sub>2</sub> à 1 mg.l<sup>-1</sup> de Ni (17 µM) et 1,31 µg.l<sup>-1</sup> de <sup>63</sup>Ni donnant une radioactivité de 740 kBq.l<sup>-1</sup>. Le DNP était apporté à 50 µM. Après différents temps d'absorption, les lots ont été rincés trois fois avec 25 ml d'eau déminéralisée. La quantité de Ni absorbée a été déterminée par comptage de la radioactivité selon la technique décrite au paragraphe 2.8.

Nous avons également déterminé l'affinité des racines de maïs pour le nickel non radioactif. Cette expérience a porté sur des racines excisées des deux cultivars (XL 94 : Ni-sensible, et Hycorn 80 : Ni-tolérant). Les plants ont été préalablement cultivés pendant 4 jours sur solution de Hoagland diluée au quart, sans addition de nickel. Au quatrième jour, les racines ont été excisées et rincées pendant 12 heures dans de l'eau déminéralisée avec aération. Des lots de 45 racines excisées ont été ensuite mis dans des solutions de NiCl<sub>2</sub> de concentrations croissantes, à 25 ± 0,5 °C. Le volume des solutions était de 5 litres afin d'éviter des variations significatives de pH. Après 8 heures d'absorption, les lots ont été rincés par CaSO<sub>4</sub> 1 mM, deux fois pendant 15 min à 2 °C, de façon à enlever le nickel présent dans l'espace libre (selon Cocucci et Morgutti, 1986). Les lots ont été ensuite séparés en trois parties. La quantité de Ni absorbée a été dosée par spectrométrie d'absorption atomique.

De plus, nous avons étudié l'action de Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> et Fe<sup>2+</sup> sur l'absorption de Ni<sup>2+</sup>, car les cations divalents sont susceptibles d'entrer en compétition avec Ni si son transport implique un système protéique saturable. L'expérience a porté sur des racines excisées de maïs XL 94. Les plants ont été cultivés pendant 4 jours, comme ci-dessus. Des lots de 45 racines excisées, lavées dans l'eau déminéralisée, ont été mis dans 5 l de solution de NiCl<sub>2</sub> de concentrations croissantes, sans ou avec 80 µM de CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> ou FeCl<sub>2</sub>. Après 8 heures d'absorption à 25 °C, les lots ont été traités selon la méthode précisée plus haut.

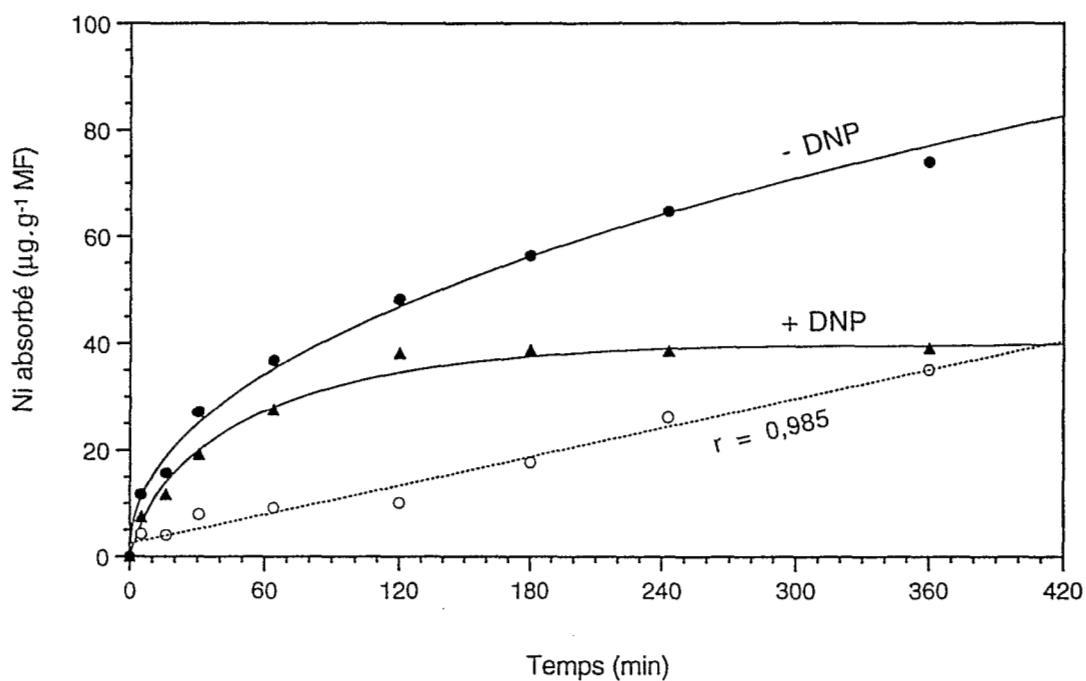
### 6.1.2. Résultats

#### *Influence du DNP sur l'absorption du nickel*

En l'absence de 2,4-dinitrophénol (DNP), l'isotherme d'absorption de Ni (Fig. 6.1) présente une phase d'absorption rapide durant les 30 premières minutes environ, suivie d'une absorption plus lente et quasi-linéaire au moins jusqu'à la 6<sup>e</sup> heure.

En présence de DNP, donc en l'absence d'une fourniture normale d'ATP, la première partie de la courbe présente une phase d'absorption rapide proche de la précédente (sans DNP). L'absorption diminue ensuite rapidement et atteint un palier à partir de la 2<sup>e</sup> heure avec 38 µg Ni.g<sup>-1</sup> MF. Le pourcentage d'inhibition par rapport à l'absorption sans DNP est déjà de 40 % à bout de 5 min, et de 50 % après 6 heures.

La courbe résultant des écarts entre les deux traitements (avec et sans DNP) est pratiquement une droite ( $r = 0,985$ , significatif au seuil de 1 ‰).



**Fig. 6.1. Influence du 2,4 dinitrophénol (DNP) sur l'absorption du nickel par les racines excisées du maïs XL 94.** Les plants ont été cultivés pendant 4 jours sur solution de Hoagland diluée au quart. Au quatrième jour, des lots de 8 racines excisées sont mis à incuber dans des solutions de  $\text{NiCl}_2$  contenant  $1 \text{ mg.l}^{-1}$  de Ni ( $17 \mu\text{M}$ ) et  $1,31 \mu\text{g.l}^{-1}$  de  $^{63}\text{Ni}$  donnant une radioactivité de  $740 \text{ kBq.l}^{-1}$ . Température =  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . (●) : sans DNP; (▲) : avec  $50 \mu\text{M}$  de DNP; (○) : différence des deux courbes.

### *Affinité des racines des deux cultivars de maïs pour Ni*

La figure 6.2a présente la vitesse d'absorption de Ni non radioactif par les racines excisées de XL 94 et de Hycorn 80 en fonction de la concentration en Ni dans la solution. La vitesse est calculée sur un temps d'absorption de 8 heures et après rinçage des racines par  $\text{CaSO}_4$  1mM à 2 °C, permettant d'éliminer au maximum le Ni absorbé passivement. On constate que les courbes sont hyperboliques : les vitesses d'absorption de Ni augmentent rapidement aux faibles concentrations en Ni dans la solution, tandis qu'elles augmentent beaucoup moins vite au-delà de 20  $\mu\text{M}$  de Ni. Les différences entre les deux cultivars sont peu significatives, hormis à 40  $\mu\text{M}$ .

Les résultats exprimés en coordonnées inverses (Fig. 6.2b) permettent de calculer la vitesse d'absorption maximale de Ni ( $V_{\max}$ ) et la constante de Michaelis ( $K_m$ ) pour les deux cultivars :

- $V_{\max}$  ( $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{MS.h}^{-1}$ ) = 4,79 pour XL 94, et 4,18 pour Hycorn 80 ;
- $K_m$  ( $\mu\text{M}$ ) = 13,3 pour XL 94, et 15,0 pour Hycorn 80.

### *Influence de Ca, Mg et Fe sur l'absorption de Ni*

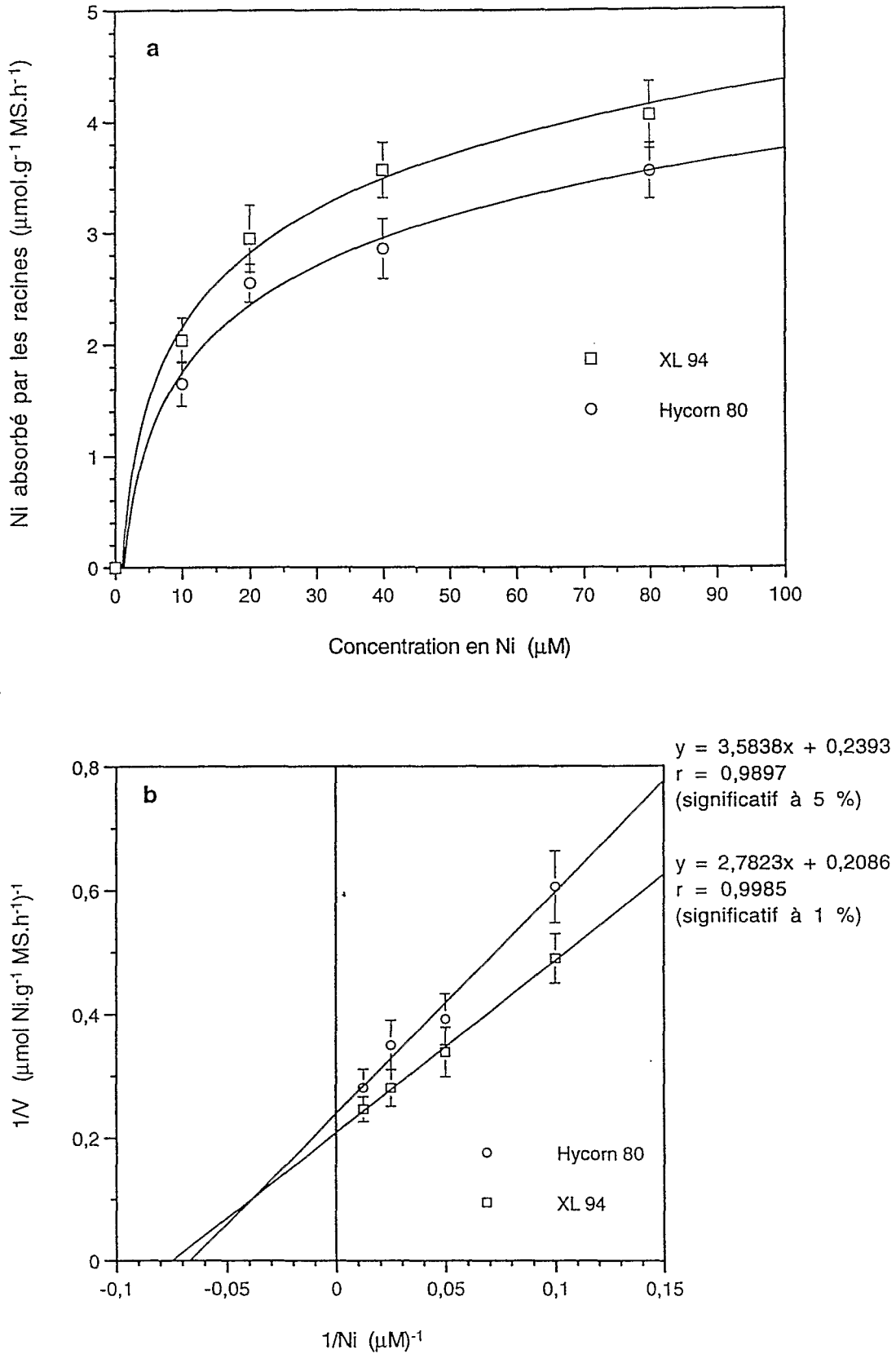
Les effets de  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  et  $\text{FeCl}_2$  sur l'absorption de Ni ont été étudiés afin de caractériser les effets des cations sur une éventuelle absorption active de Ni. Pour cela, les vitesses ont été déterminées après 8 heures d'absorption et après rinçage des racines par  $\text{CaSO}_4$  1mM à 2 °C, permettant d'éliminer au maximum le Ni absorbé passivement.

On constate (Fig. 6.3a) que l'absorption de Ni est fortement diminuée par  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{2+}$  à toutes les concentrations en Ni dans le milieu, sauf par  $\text{Fe}^{2+}$  avec 80  $\mu\text{M}$  de Ni.

Les résultats exprimés en coordonnées inverses (Fig. 6.3 b, c et d) permettent de calculer la vitesse d'absorption maximale de Ni ( $V_{\max}$ ) et la constante de Michaelis ( $K_m$ ) pour les différents cas (résultats dans le tableau 6.1).

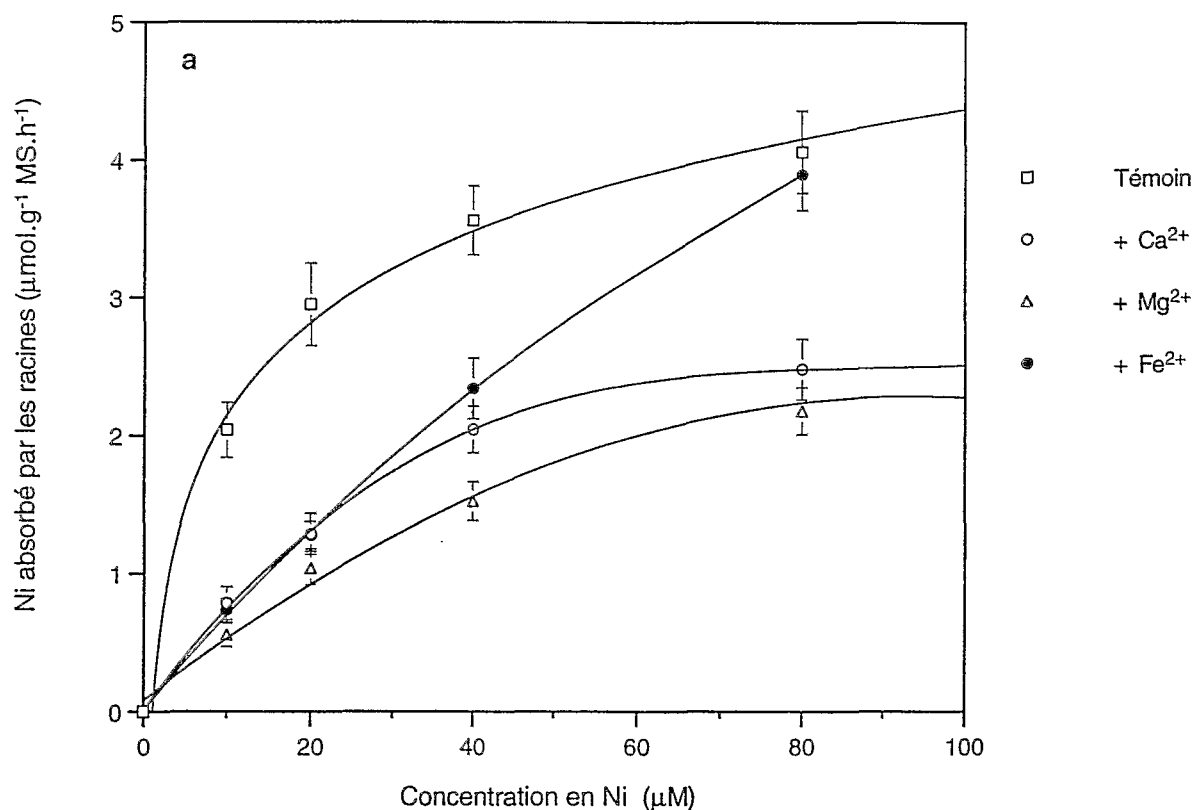
**Tableau 6.1. Caractéristiques de l'absorption de Ni par les racines excisées de maïs XL 94, en fonction de Ca, Mg, et Fe.** Les plants ont été cultivés pendant 4 jours sur solution de Hoagland diluée au quart. Des lots de 45 racines excisées ont été ensuite mis pendant 8 heures dans des solutions contenant 10 à 80  $\mu\text{M}$  de  $\text{NiCl}_2$ , sans ou avec 80  $\mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_2$ . Les résultats sont les moyennes  $\pm$  leurs écarts-types calculés sur 3 répétitions.

	Ni seul	Ni + Ca	Ni + Mg	Ni + Fe
$V_{\max}$ ( $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{MS.h}^{-1}$ )	4,79 $\pm$ 0,44	4,09 $\pm$ 0,45	4,05 $\pm$ 0,36	8,70 $\pm$ 0,97
$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	13,3 $\pm$ 1,5	43,8 $\pm$ 6,1	62,4 $\pm$ 6,3	109,9 $\pm$ 12,8

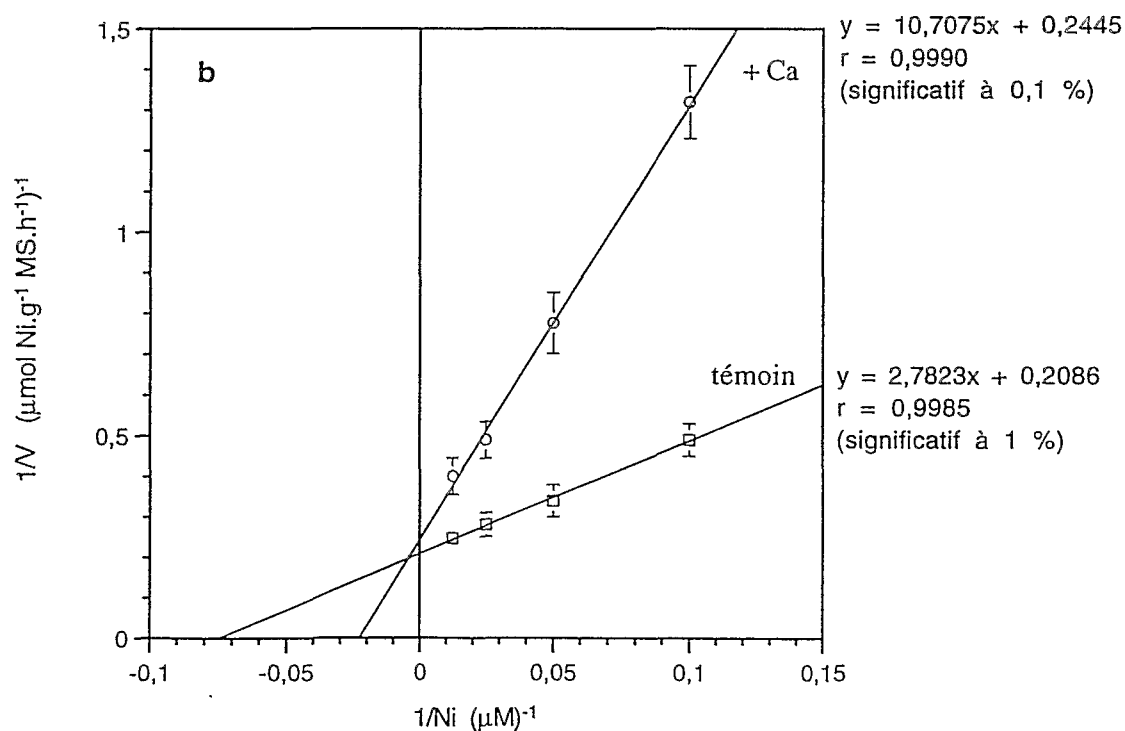


**Fig. 6.2. Affinité des racines des deux cultivars de maïs XL 94 et Hycorn 80 pour Ni.** Les plants ont été cultivés sur solution de Hoagland diluée au quart. Au quatrième jour, des lots de 15 racines excisées sont mises à incuber dans des solutions de  $\text{NiCl}_2$ , à 25 °C. Après 8 h d'absorption, les lots sont rincés avec  $\text{CaSO}_4$  1 mM à 2 °C, puis analysés. Les résultats sont les moyennes  $\pm$  leurs écarts-types calculés sur 3 répétitions.

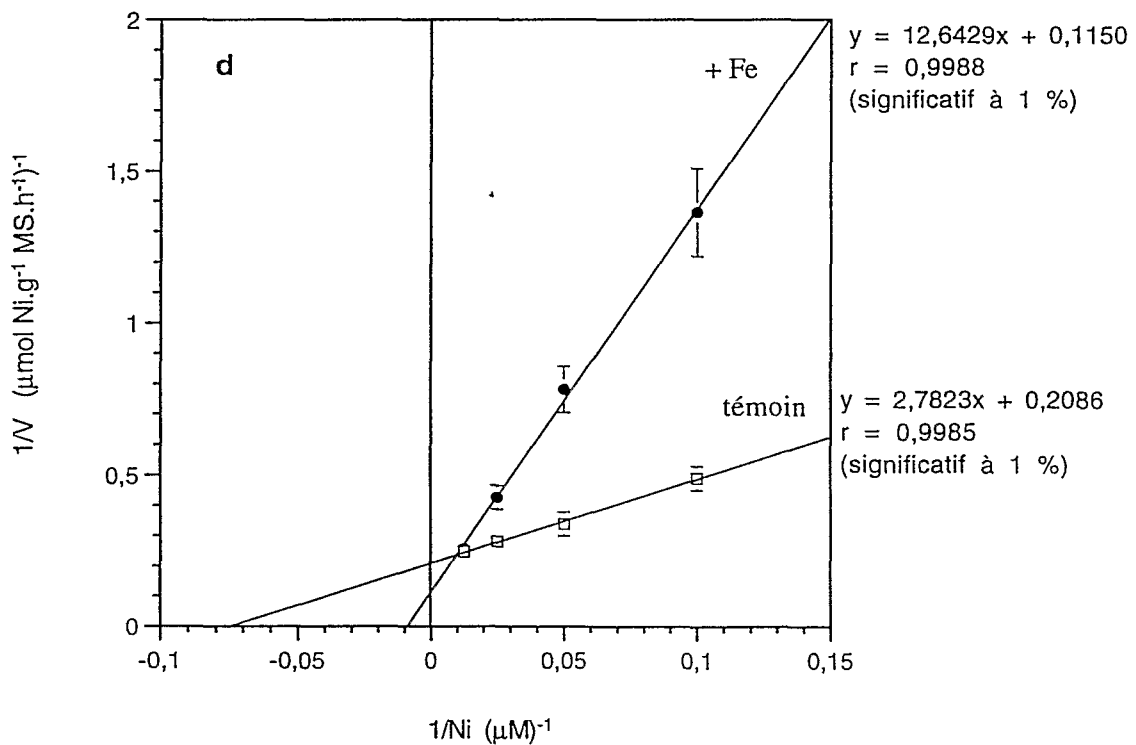
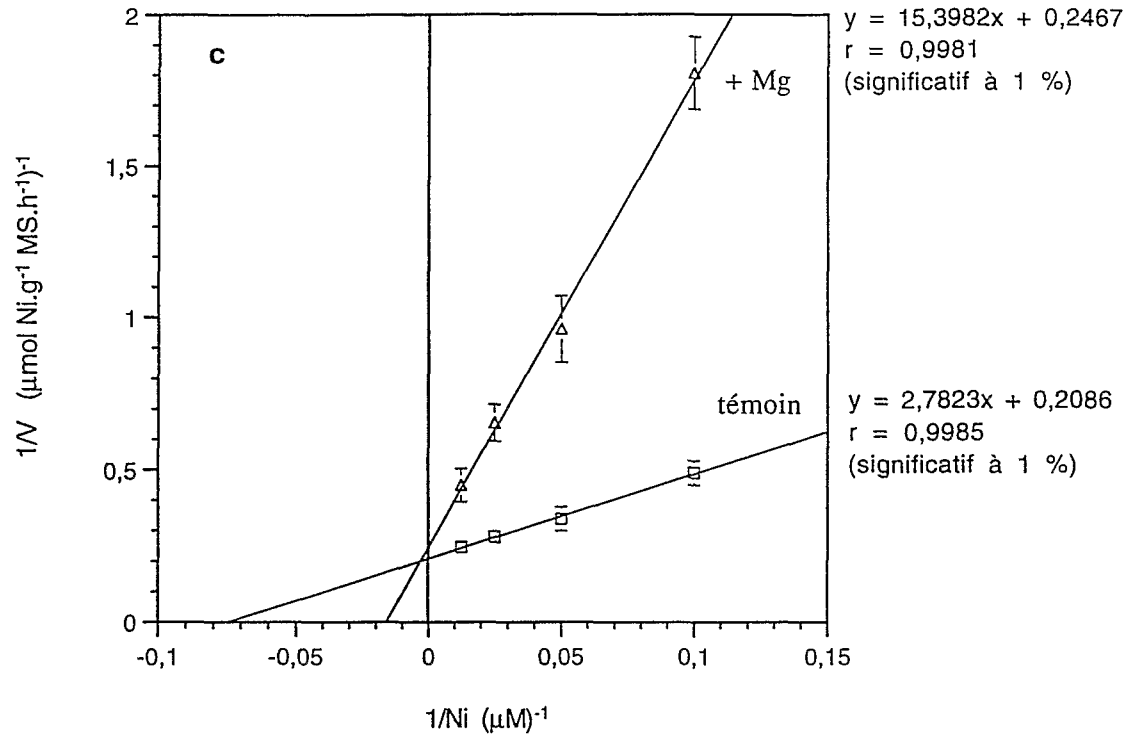




**Fig. 6.3. Vitesse d'absorption du nickel en fonction de la concentration en Ni dans la solution, avec ou sans ions antagonistes.** Les plants de maïs (cv XL 94) ont été cultivés sur solution de Hoagland diluée au quart. Au quatrième jour, des lots de 15 racines excisées sont mises à incuber dans des solutions de  $\text{NiCl}_2$ , sans ou avec  $80 \mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ , ou  $\text{FeCl}_2$ , à  $25^\circ\text{C}$ . Après 8 h d'absorption, les lots sont rincés avec  $\text{CaSO}_4$   $1 \text{ mM}$  à  $2^\circ\text{C}$ , puis analysés. Les résultats sont les moyennes  $\pm$  leurs écarts-types calculés sur 3 répétitions.



**Fig. 6.3 (suite). Inhibition de l'absorption de Ni par Ca.** Représentation en coordonnées inverses dérivée de la figure 6.3a. L'inhibition paraît être compétitive.



**Fig. 6.3 (suite). Inhibition de l'absorption de Ni par Mg (c), et Fe (d).** Représentations en coordonnées inverses dérivant de la figure 6.3a. L'inhibition de l'absorption de Ni par Mg paraît être compétitive.

On constate, d'après le tableau 6.1, d'une part que l'affinité des racines pour Ni diminue fortement en présence de Ca, Mg et surtout Fe, d'autre part que la  $V_{\max}$  est peu modifié par Ca et Mg, suggérant une inhibition de l'absorption de Ni par Ca et Mg de type compétitif (voir aussi les figures 6.3 b et c).

### 6.1.3. Discussion et conclusion

#### *Influence du DNP sur l'absorption du nickel*

L'expérience rapportée ici avait pour but de déterminer dans quelle mesure l'absorption de Ni relevait d'un phénomène passif de simple diffusion ou d'un transport actif énergisé. Elle a porté sur des racines excisées, limitant ainsi une absorption passive par convection due à la transpiration de la plante (Mench, 1990). De plus, le rinçage des racines à la fin de l'absorption de Ni par  $\text{CaSO}_4$  1 mM à 2 °C permet d'éliminer le nickel présent dans l'espace libre. Ainsi, l'inhibition de l'absorption de Ni par le DNP (Fig. 6.1), protonophore neutralisant la force motrice protonique et par là même la synthèse d'ATP en même temps qu'il interdit l'énergisation des transports par couplage indirect, suggère fortement l'existence d'un transport actif. Le coefficient de corrélation hautement significatif de la droite résultant de la différence des deux courbes (avec et sans DNP, cf. Fig. 6.1), représentant théoriquement la phase active, confirme cette hypothèse. En outre, la forme hyperbolique de la courbe des vitesses d'absorption de Ni en fonction de la concentration dans le milieu (Fig. 6.2a) traduit l'existence d'un transporteur protéique membranaire possédant un site saturable par l'ion  $\text{Ni}^{2+}$ . L'absorption de Ni par des racines excisées d'orge est également inhibée par 100  $\mu\text{M}$  de DNP (Körner *et al.*, 1986), celle par des racines d'avoine par 20  $\mu\text{M}$  de DNP (Aschmann et Zasoski, 1987), et celle par des racines excisées de *Leucaena leucocephala* (faux-mimosa) par 50  $\mu\text{M}$  de DNP (Verlière et Heller, 1981). Ces résultats soutiennent tous l'hypothèse posée : à côté d'une phase diffusive passive concernant le Ni absorbé dans l'espace libre (Fig. 6.1), il existe une composante active, donc énergisée.

Le pouvoir d'accumulation des racines paraît étonnant : la teneur est de 75  $\mu\text{g Ni.g}^{-1}$  (soit 75  $\text{mg.kg}^{-1}$ ) par rapport à la matière fraîche en 6 heures pour une concentration de 1  $\text{mg.l}^{-1}$  (Fig 6.1), soit un taux d'accumulation de 75. Toutefois, il se rapproche des valeurs trouvées par Verlière et Heller (1981), qui ont noté un taux d'accumulation de 30 en 3 heures dans l'absorption de Ni à 5  $\text{mg.l}^{-1}$  par des racines excisées de *Leucaena leucocephala*, et de celles trouvées pour le cuivre par Cathala et Salzac (1975) qui ont constaté un taux de 50 en 3 heures sur des racines excisées de maïs mises dans des solutions à 0,3  $\text{mg.l}^{-1}$ . Cette accumulation suggère que Ni est concentré à certains niveaux de la racine.

*Affinité des racines des deux cultivars de maïs pour Ni*

Les  $K_m$  et  $V_{max}$  de Ni déterminés sur maïs dans cette étude sont en accord avec ceux mis en évidence sur avoine, *Leucaena leucocephala* et soja, ainsi qu'avec ceux de Cu et Zn sur canne à sucre (tableau 6.2).

Les différences d'affinité ( $K_m$ ) et de  $V_{max}$  entre les deux cultivars sont relativement faibles, et ne suffisent vraisemblablement pas à rendre compte des différences de sensibilité au nickel mises en évidence au paragraphe 4.4, même si l'affinité de XL 94 pour Ni est légèrement supérieure. Par ailleurs, l'expérimentation de la figure 6.2 ne rend compte que de la phase active. Il serait souhaitable de comparer l'efficacité de la phase passive des deux cultivars, car elle pourrait intervenir dans la tolérance de la plante vis à vis du nickel.

**Tableau 6.2.  $K_m$  et  $V_{max}$  pour différents ions, différents matériels végétaux, et différentes gammes de concentration.**

Matériel végétal (partie analysée)	Ion	Concentration ( $\mu\text{M}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ MS.h}^{-1}$ )	Référence	
Maïs (racines excisées)	cv XL 94 cv Hycorn 80	Ni <sup>2+</sup>	10-80	13,3	4,79	(1)
			10-80	15,0	4,18	
Avoine entier (racines)	Ni <sup>2+</sup>	0,53-28	12	2,73	(2)	
<i>Leucaena leucocephala</i> (racines excisées)	Ni <sup>2+</sup>	0,17-170	12,9	22,99	(3)	
Soja (plant entier)	Ni <sup>2+</sup>	0,025-0,25	0,51	0,22	(4)	
		0,5-5	9	2,98		
		50-200	379	31,85		
Canne à sucre (feuilles)	Cu <sup>2+</sup>	2-500	14,5	5,4	(5)	
		2-75	11,0	5,7	(6)	
Canne à sucre (feuilles)	Zn <sup>2+</sup>	2-500	11,0	5,9	(5)	
		2-75	15,0	6,2	(6)	

(1) présente étude; (2) Aschmann et Zasoski (1987); (3) Verlière et Heller (1981); (4) Cataldo *et al.* (1978a); (5) Bowen (1969); (6) Nissen (1973).

*Influence de Ca, Mg et Fe sur l'absorption de Ni*

Les additions de CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> et FeCl<sub>2</sub> ont eu un effet dépressif sur l'absorption de Ni (Fig. 6.3a). Verlière et Heller (1981) ont observé des résultats comparables avec Ca et Mg sur des racines de *Leucaena leucocephala*. Par contre, Cataldo *et al.* (1978a) n'ont observé aucun effet de Mg sur l'absorption de Ni par le soja. Cela pourrait provenir des faibles concentrations en magnésium utilisées par les auteurs (5  $\mu\text{M}$ ) et d'une affinité plus grande des

racines de soja pour Ni que pour Mg. En effet, Le  $K_m$  de Mg pour les racines excisées de maïs est de l'ordre de 44  $\mu\text{M}$  (d'après Maas et Ogata, 1971), tandis qu'il est de 13 à 15  $\mu\text{M}$  pour Ni (tableau 6.2). D'une manière générale, Ca et Mg sont connus pour diminuer fortement l'absorption de Ni (Proctor et Mc Gowan, 1976; Gabrielli et Pandolfini, 1984; Robertson, 1985; Heikal *et al.*, 1989a).

Concernant Fe, il diminue l'absorption de Ni lorsque celui-ci est présent à de faibles concentrations dans le milieu (Fig. 6.3a). Par contre, à une concentration en Ni élevée et identique à Fe (80  $\mu\text{M}$ ), ce dernier n'a pratiquement aucune influence. Cataldo *et al.* (1978a) ont observé le même résultat sur le soja, Fe inhibant l'absorption de Ni à des concentrations inférieures à 4  $\mu\text{M}$ , mais augmentant l'absorption à des concentrations supérieures à 4  $\mu\text{M}$  Ni.

Les représentations en double inverses suggèrent que Ca et Mg sont des inhibiteurs compétitifs de l'absorption de Ni (Fig. 6.3 b, c). Ces éléments pourraient donc être absorbés par un ou des transporteurs communs à certains cations divalents et donc peu spécifiques. En outre, les racines de maïs pourraient avoir davantage d'affinité pour Ni que pour Mg, le  $K_m$  de Ni étant de 13 à 15  $\mu\text{M}$  (tableau 6.2) tandis que celui de Mg est de l'ordre de 44  $\mu\text{M}$  (d'après Maas et Ogata, 1971). Cela suggère que les concentrations en Mg doivent être supérieures à celles de Ni pour diminuer efficacement l'absorption de ce dernier.

L'hypothèse d'une inhibition compétitive de l'absorption de Ni par Ca pourrait être contestable, car Ca est connu pour être absorbé passivement (Salzac, 1970). Toutefois, même une absorption passive peut s'opérer par le biais d'un transporteur protéique (diffusion facilitée ou canal ionique), dont le site est par définition saturable, ce qui rend plausible une inhibition compétitive entre Ni et Ca.

Finalement, le manque d'informations dans la littérature au sujet des interactions entre Ca, Mg et Ni rend nécessaire une confirmation des résultats qui viennent d'être exposés. Néanmoins, ces interactions peuvent avoir un grand intérêt pratique dans les sols ferrallitiques ferritiques de Nouvelle-Calédonie. En effet, ces sols étant très riches en fer, celui-ci pourrait limiter une absorption excessive de nickel. Le magnésium, abondant dans les faciès de plaine, pourrait jouer le même rôle.

En conclusion, ces résultats apportent une preuve supplémentaire de l'existence d'une absorption active du nickel chez les végétaux supérieurs.

S'agissant des affinités des deux cultivars de maïs pour Ni, elles paraissent peu différentes. Par conséquent, les différences de sensibilité observées au chapitre 4 nécessitent des études supplémentaires.

L'affinité des racines de maïs pour Ni semble être élevée. Cependant, l'absorption de cet élément pourrait être diminuée efficacement par des apports de Ca et Mg, qui apparaissent comme des inhibiteurs compétitifs. Le fer, par contre, ne serait efficace qu'aux faibles concentrations en Ni dans le milieu.

## 6.2. LES MÉCANISMES FORTEMENT IMPLIQUÉS DANS LA TOXICITÉ DU NICKEL CHEZ LE MAÏS

### 6.2.1. Conditions expérimentales

Les expériences relatées dans ce paragraphe ont porté soit sur des plantules soit sur des racines excisées de maïs XL94 et/ou Hycorn 80 cultivés sur solution.

Une grande attention a été portée au choix des concentrations en nickel. Celles-ci se situent toujours dans des gammes de concentrations modérément toxiques pour la croissance des plantules, c'est à dire entre 20 et 60  $\mu\text{M}$  en solution de Hoagland diluée au quart, telles qu'elles ont été mises en évidence sur les figures 4.7 et 4.8.

Lorsque les plantules ont été exposées au nickel, la mesure du pourcentage d'intoxication est donnée. Celle-ci est basée sur l'inhibition de la croissance en longueur de la racine, depuis la mise en solution contenant Ni jusqu'au moment du prélèvement du plant : une inhibition racinaire de  $n\%$ , notée  $IR_n$ , correspond à des racines dont la longueur est inférieure de  $n\%$  par rapport au témoin. Les résultats sont la moyenne des mesures réalisées sur 12 plants.

Les détails de chaque expérience sont précisés au début de chaque paragraphe de la partie résultats, ainsi que sur les figures plus brièvement. On se rapportera au chapitre 2 pour les techniques d'analyses, de mesures et d'observations.

### 6.2.2. Résultats

#### *Action du nickel sur l'acidification du milieu par les racines de maïs*

Afin d'étudier un éventuel effet inhibiteur du nickel sur l'absorption des éléments majeurs et de l'eau, nous avons tout d'abord recherché l'existence d'une inhibition par Ni de l'ATPase plasmalemmique des racines. On sait en effet que les transports actifs dépendent de la Force Motrice Protonique (FMP) créée par l'efflux transmembranaire de protons résultant du fonctionnement de cette ATPase. La mesure de l'acidification du milieu extérieur par des racines excisées en présence ou non de Ni a été prise en compte afin de tester une action du nickel à ce niveau.

Cette expérience a porté sur des racines excisées de maïs XL 94. Les plants ont été préalablement cultivés pendant 3 jours sur solution de Hoagland diluée dix fois à pH 5,3. Le choix de cette dilution de la solution de Hoagland a été dicté par la nécessité d'un milieu contenant tous les éléments nécessaires à une bonne croissance sans être trop tamponné de

façon à pouvoir détecter facilement par la suite des variations de pH du milieu. Après 3 jours de croissance, des lots de 36 racines excisées mesurant 7 à 8 cm (les lots pesant environ 3 g) ont été mis à incuber dans 75 ml de solution fraîche de Hoagland diluée dix fois, ajustée à pH 6,00 à l'aide de NaOH, et contenant 0, 25 ou 60  $\mu\text{M}$  de  $\text{NiCl}_2$ , ou 50  $\mu\text{M}$  de vanadate (inhibiteur des ATPases plasmalemmiques). Le milieu a été mis sous agitation magnétique et maintenu à  $25 \pm 0,5$  °C. L'évolution du pH de la solution a été suivie en continu avec un pH-mètre de précision ( $\pm 0,01$ ). A la fin de l'expérience, les poids frais des lots de racines ont été déterminés. Les résultats sont exprimés en quantité de protons excrétés par gramme de racines fraîches dans 1 ml de solution de Hoagland diluée au dixième ( $\text{neq.ml}^{-1}.\text{g}^{-1}$  MF).

Les résultats sont présentés sur la figure 6.4. On constate que l'évolution de l'excrétion de protons par le motif témoin a l'allure d'une courbe hyperbolique, avec un palier au-delà de 4 heures, correspondant à un pH de 4,8 (les valeurs de pH de toutes les mesures sont données en annexe 7). En présence de 25 ou 60  $\mu\text{M}$  de Ni, l'excrétion de  $\text{H}^+$  est fortement ralentie, se rapprochant de l'inhibition quasi-totale induite par le vanadate. Cette inhibition par Ni est quasi-immédiate, les différences par rapport au témoin étant détectables après seulement 3 à 4 minutes de contact. Un palier est atteint très rapidement (environ 60 min) avec 60  $\mu\text{M}$  de Ni, tandis qu'avec 25  $\mu\text{M}$  l'excrétion de  $\text{H}^+$  se poursuit très lentement après une phase relativement rapide de 30 min.

#### *Action du nickel sur la fuite d'électrolytes des racines de maïs*

Un désordre dans l'absorption des éléments minéraux et de l'eau peut également provenir d'une dégradation de l'intégrité du plasmalemme. Cette altération est en effet rapportée comme une action toxique potentielle des métaux, en particulier de Cu, chez les végétaux. La mesure de la fuite d'électrolytes des cellules est une méthode permettant l'estimation du degré d'altération de la membrane plasmique.

Cette expérience a porté sur des racines excisées de maïs XL 94. Les plants ont été préalablement cultivés pendant 4 jours sur solution de Hoagland diluée au quart, et contenant 0, 50 ou 65  $\mu\text{M}$  de  $\text{NiCl}_2$  (concentrations en Ni toxiques). Au quatrième jour, des lots de 15 à 30 racines excisées ( $1,5 \pm 0,05$  g par lot), ont été transférés dans 50 ml d'eau bi-déminéralisée. Le milieu a été mis sous agitation magnétique et maintenu à  $25 \pm 0,5$  °C. L'évolution de la conductivité du milieu a été suivie en continu à l'aide d'un conductimètre de précision. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{S.cm}^{-1}$ . Les degrés d'inhibition racinaire ( $\text{IR}_n$ ) sont donnés sur le graphique et dans le texte.

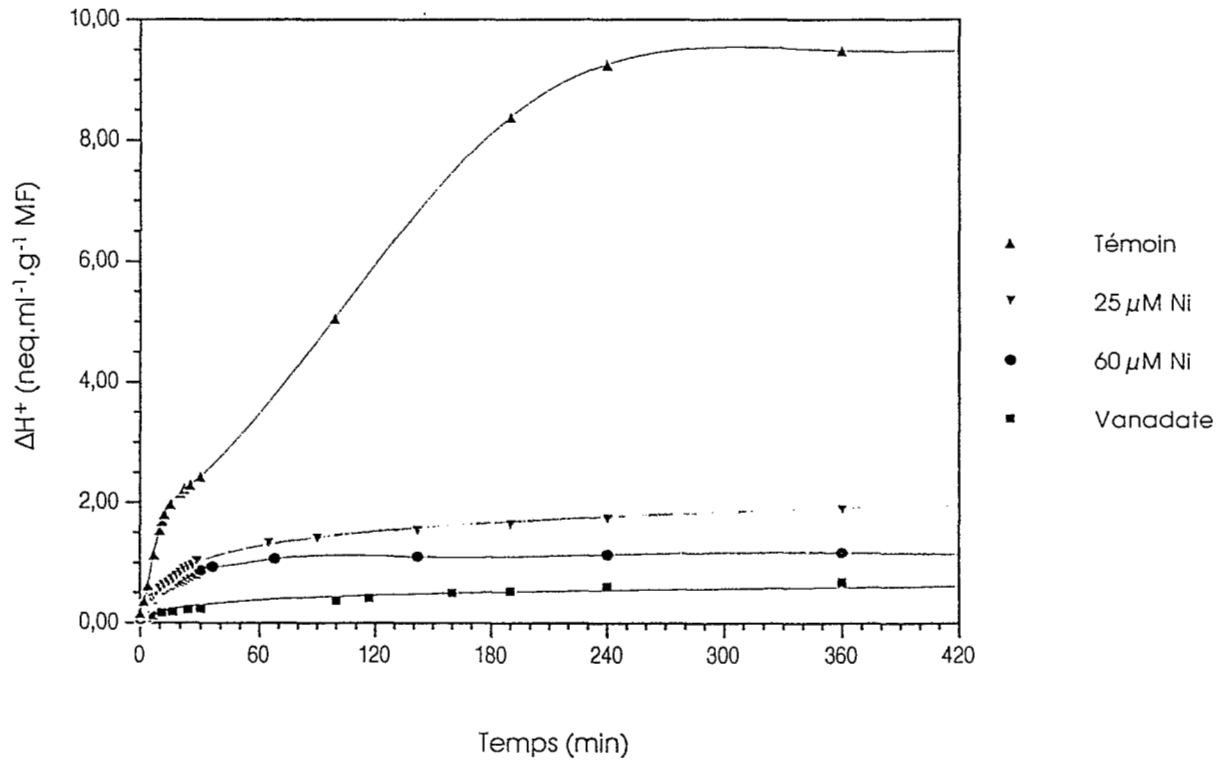
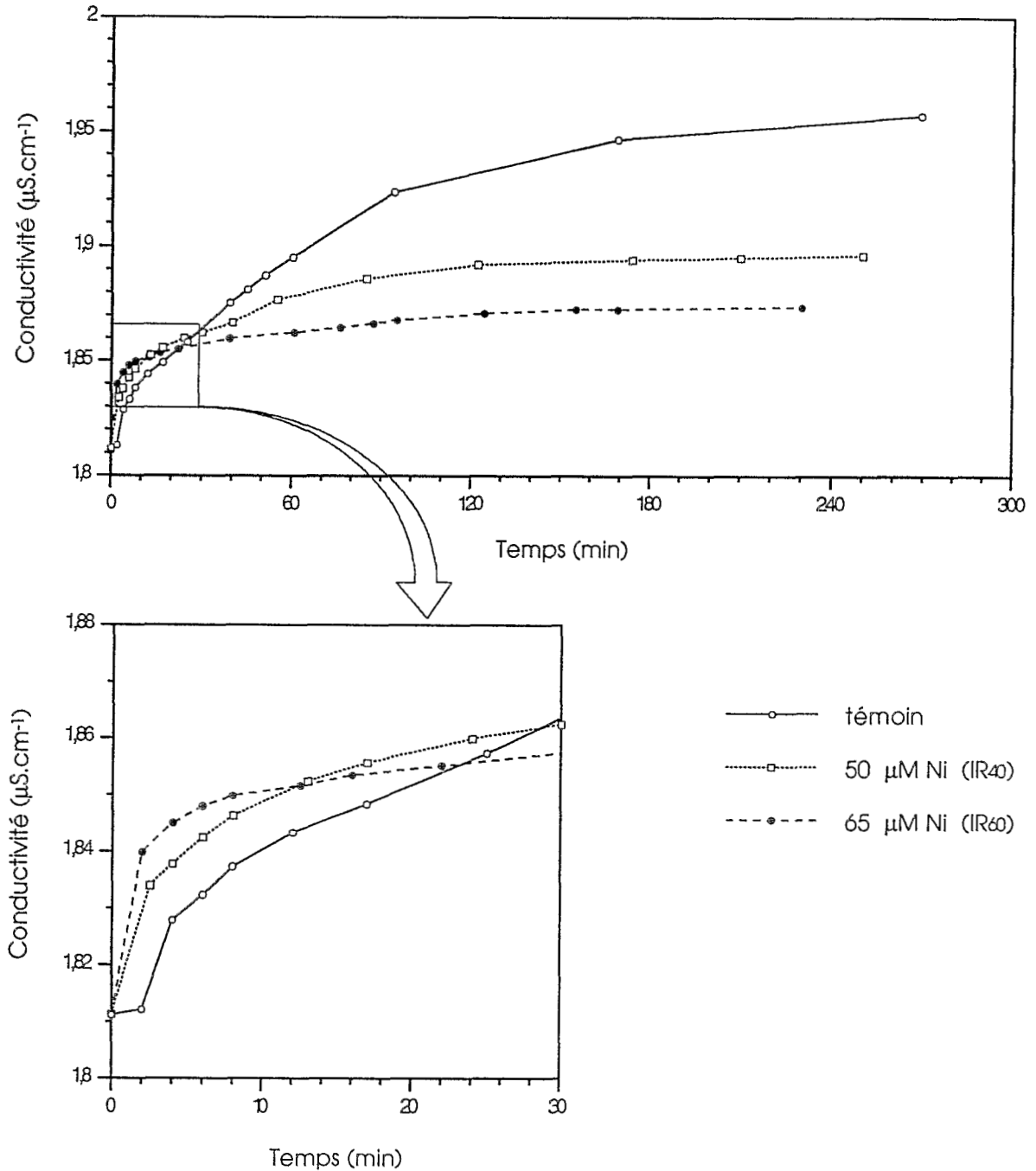


Fig. 6.4. Influence du nickel sur l'évolution de l'acidification du milieu par les racines de maïs XL 94. Les plants ont été cultivés pendant 3 jours sur solution de Hoagland diluée 10 fois à pH 5,3. Des lots de 36 racines excisées ont été ensuite mis à incuber dans 75 ml de solution fraîche de Hoagland 1/10 ajustée à pH 6,00, contenant différentes concentrations de  $\text{NiCl}_2$ , ou 50  $\mu\text{M}$  de vanadate. Température =  $25 \pm 0,5$  °C.





**Fig. 6.5.** Évolution de la fuite d'électrolytes des racines de maïs XL 94 en fonction de la concentration en nickel dans la solution de culture. Les plants ont été cultivés pendant 4 jours sur solution de Hoagland diluée au quart, avec différentes concentrations de NiCl<sub>2</sub>. Des lots de racines excisées pesant 1,5 g ont été ensuite transférés dans 50 ml d'eau bi-déminéralisée. L'évolution de la conductivité du milieu a été suivie en continu à l'aide d'un conductimètre de précision.

La figure 6.5 montre l'évolution de la fuite d'électrolytes des racines excisées de maïs en fonction des concentrations en Ni des solutions dans lesquelles les plants ont été préalablement cultivés. On constate que la conductivité (qui est proportionnelle à la concentration en électrolytes du milieu) augmente rapidement au cours des premières minutes dans les trois cas (témoin, 50  $\mu\text{M}$  et 65  $\mu\text{M}$  de Ni), avec néanmoins de nettes différences :

- la conductivité du témoin augmente rapidement dans les premières minutes, puis ralentit progressivement pour atteindre environ 1,96  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  après 4 h ;
- celle du plant exposé à 50  $\mu\text{M}$  de Ni (IR40) augmente plus rapidement que celle du témoin dans les premières minutes, puis atteint quasiment un palier en 2 h vers 1,89  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  ;
- celle du plant exposé à 65  $\mu\text{M}$  de Ni (IR60) augmente encore plus rapidement et atteint un palier après 90 min vers 1,87  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

En résumé, plus le plant est intoxiqué par Ni, plus la fuite d'électrolytes est rapide dans les 10 à 20 premières minutes d'échange avec le milieu extérieur, et plus un palier est atteint rapidement, ce palier étant d'autant plus faible que la concentration en Ni est élevée.

#### *Action du nickel sur la teneur en eau du maïs*

Une diminution de la teneur en eau est souvent rapportée comme une conséquence importante de l'intoxication des végétaux par les métaux. Nous avons cherché à le vérifier sur les deux cultivars de maïs XL 94 (Ni-sensible) et Hycorn 80 (Ni-tolérant), afin de confirmer la différence de sensibilité de ces deux plantes et d'approfondir la compréhension de la toxicité du nickel chez le maïs.

Les plants ont été cultivés sur solution de Hoagland diluée au quart et contenant différentes concentrations en  $\text{NiCl}_2$ . Des échantillons de 12 plants ont été prélevés après 4, 8 et 12 jours de culture. Les poids frais des racines et des parties aériennes, séparés au niveau du collet après suppression du grain, ont été immédiatement déterminés (les racines étant essorées sur papier absorbant). La mesure du poids de matière sèche (après séchage à 105 °C pendant 24 h) permet le calcul de la teneur en eau de l'organe.

Ainsi, on constate (Fig. 6.6) qu'au-delà de 50  $\mu\text{M}$  de Ni, la teneur en eau des parties aériennes et des racines du cultivar XL 94 diminuent dès le 4<sup>e</sup> jour de culture. Cette diminution est importante au 12<sup>e</sup> jour, surtout au niveau des parties aériennes, celles-ci ayant, par rapport au témoin, 7 % d'eau de moins avec 50  $\mu\text{M}$  Ni et 13 % de moins avec 65  $\mu\text{M}$ . En d'autres termes, pour les parties aériennes à 12 jours, la teneur en matière sèche est de 7 % pour le témoin, 14 % avec 50  $\mu\text{M}$  de Ni, et 20 % avec 65  $\mu\text{M}$  de Ni. Les racines sont moins affectées que les parties aériennes (6, 11 et 13,5 % avec 0, 50 et 65  $\mu\text{M}$  de Ni).

Par contre, la teneur en eau du cultivar Hycorn 80 n'est quasiment pas modifiée. Seule celle des racines après 12 jours de croissance diminue de 2,5 % avec 65  $\mu\text{M}$ .

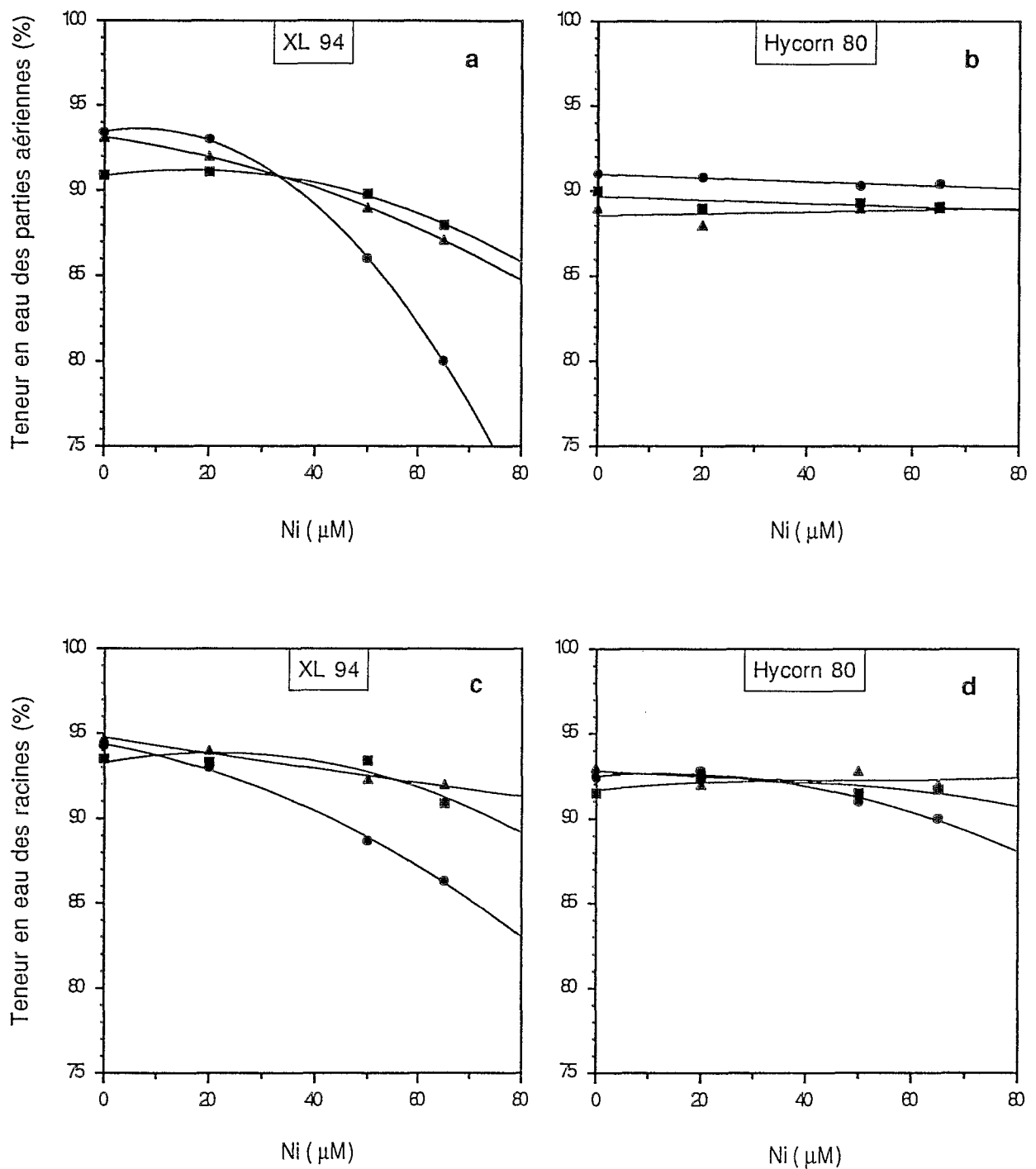


Fig. 6.6. Effet du nickel sur la teneur en eau des parties aériennes et des racines de maïs XL 94 et Hycorn 80. Les plants ont été cultivés pendant 4 (■), 8 (▲) et 12 (●) jours, sur solution de Hoagland diluée au quart, avec différentes concentrations de  $\text{NiCl}_2$ . Les mesures ont été faites sur des échantillons moyens de 12 plants. a et b : parties aériennes de XL 94 et Hycorn 80; c et d : racines de XL 94 et Hycorn 80.

### *Action du nickel sur la structure et l'ultrastructure du maïs*

Les observations microscopiques des tissus et des cellules permettent souvent d'apporter des réponses déterminantes lorsqu'il s'agit de comprendre l'action d'un facteur affectant la croissance et le métabolisme d'une plante, comme c'est le cas pour l'action du nickel sur le maïs.

Dans cette expérience, les deux cultivars de maïs ont été cultivés pendant 8 jours sur solution de Hoagland contenant différentes concentrations toxiques de  $\text{NiCl}_2$ . Les observations ont porté sur les apex racinaires, les bases de racines et sur les feuilles. Rappelons que dans le cas de la microscopie photonique, la coloration PAS (Periodic Acid-Schiff)-Naphthol blue-black a été utilisée, colorant les protéines en bleu et les dérivés glycosylés en rouge. On se rapportera au chapitre 2 (§ 2.10) pour les méthodes utilisées.

**Effets de Ni sur les apex racinaires.** De nombreux désordres structuraux et physiologiques ont été observés au niveau des apex racinaires, surtout chez le cultivar de maïs XL 94 sensible au nickel.

Le cultivar XL 94 intoxiqué par  $60 \mu\text{M}$  (IR60) de nickel montre un allongement important des cellules de la zone d'élongation (Figs. 6.7 A, B) : entre 1 et 2 mm au-dessus du méristème apical, les cellules du parenchyme cortical mesurent en section longitudinale  $50 \pm 10 \mu\text{m}$  chez le plant intoxiqué contre  $20 \pm 5 \mu\text{m}$  chez le plant sain. La différence est plus grande encore au niveau du rhizoderme : entre 70 et  $160 \mu\text{m}$  contre  $20 \pm 5 \mu\text{m}$ . Cet allongement des cellules est associé à une augmentation du nombre et du volume des vacuoles. Chez le cultivar Hycorn 80 exposé à  $60 \mu\text{M}$  de Ni (IR30), on ne distingue pas d'allongement cellulaire particulier (Fig. 6.7 C). Par contre, les deux cultivars intoxiqués présentent un retard par rapport au témoin dans la différenciation des cellules de la stèle (Figs. 6.7 A-C) : les vaisseaux du xylème sont en effet nettement visibles à environ 2 mm du méristème chez le témoin, tandis qu'ils sont apparemment absents à ce niveau chez les plants intoxiqués.

Le nickel à une concentration de  $60 \mu\text{M}$  inhibe l'activité mitotique à environ 80 % chez XL 94 et 50 % chez Hycorn 80 (tableau 6.3). Ce résultat est illustré par la comparaison des figures 6.7 D, E et F. De nombreuses divisions sont observables dans le méristème témoin (Fig. 6.7 D, flèches). Par contre, elles sont rares dans la racine de XL 94 cultivé en présence de Ni (Fig. 6.7 E). Dans ce cas, entre les deux noyaux formés, la paroi primaire est rarement observable, et les cellules en division semblent toutes avoir deux noyaux. D'une façon générale, les parois cellulaires, bien nettes et bien colorées dans la racine témoin, sont moins précises et moins bien colorées par la réaction PAS (periodic acid-schiff) dans les racines intoxiquées des deux cultivars, ce qui suggère une déficience en polysaccharides pariétaux.

Ces plants présentent également de nombreuses disjonctions cellulaires (Figs. 6.7 B, C, flèches), qui pourraient correspondre à une fragilité et une malformation pariétale. Les figures 6.8 C et D soutiennent ces observations. De plus, les cellules de la coiffe et du méristème des plants exposés à Ni sont plus vacuolisées et leur cytoplasme est moins dense et donc moins riche en protéines, surtout chez XL 94 (Figs. 6.7 D-F). La figure 6.8 B suggère même une dégénérescence des cellules méristématiques chez XL 94 exposé à Ni (IR60).

L'absence de statolithes dans les cellules de la coiffe des deux cultivars intoxiqués par 60  $\mu\text{M}$  de Ni est remarquable, alors qu'ils sont nombreux chez le témoin (Figs. 6.7 D-F). Les cellules de la coiffe des échantillons traités avec 40  $\mu\text{M}$  de Ni montrent moins de statolithes que celles des témoins, mais seule une étude quantitative permettrait de le préciser.

Finalement, des différences existent entre les deux cultivars au niveau des apex racinaires. A la même concentration de nickel (60  $\mu\text{M}$ ), Hycorn 80 présente des cellules beaucoup plus méristématiques que XL 94 (Figs. 6.7 E, F). Cette meilleure activité métabolique doit être corrélée au moindre ralentissement de la croissance de ce cultivar. Apparemment les seuls désordres chez Hycorn 80 sont l'absence d'amidon dans les cellules de la coiffe, une fragilité pariétale et un retard de différenciation des cellules de la stèle. XL 94 présente les mêmes désordres avec en plus une activité du méristème très faible et un allongement des cellules de la zone d'élongation.

**Tableau 6.3. Effets du nickel sur le nombre de cellules en division au niveau du méristème de la racine des maïs XL 94 et Hycorn 80.** Plants cultivés pendant 8 jours sur solution de Hoagland diluée quatre fois, avec des concentrations croissantes de chlorure de nickel. Surface de la zone observée : 0,25 mm<sup>2</sup> au niveau du méristème. (d'après les Figs. 6.7 D-F).

	Inhibition racinaire (%)	Cellules hors mitose (nombre)	Cellules en mitose (nombre)	Index mitotique (%)
Témoin	0	335 $\pm$ 10	36 $\pm$ 4	9,7 $\pm$ 1,3
XL 94 + 60 $\mu\text{M}$ Ni	60	360 $\pm$ 10	7 $\pm$ 2	1,9 $\pm$ 0,6
Hyc.80 + 60 $\mu\text{M}$ Ni	30	358 $\pm$ 10	18 $\pm$ 4	4,8 $\pm$ 1,2

**Effets du nickel sur la différenciation racinaire.** Les sections transversales réalisées à la base et dans la zone pilifère de la racine de XL 94 montrent une moins bonne structuration tissulaire pour les plants intoxiqués que pour les témoins (Figs. 6.9 A-E). L'endoderme est moins bien différencié, les cellules du péricycle et du parenchyme vasculaire, encore riches en cytoplasme, montrent un retard de leur différenciation. Ces dysfonctionnements sont déjà perceptibles chez les plants exposés à 40  $\mu\text{M}$  de Ni (Fig. 6.9 B).

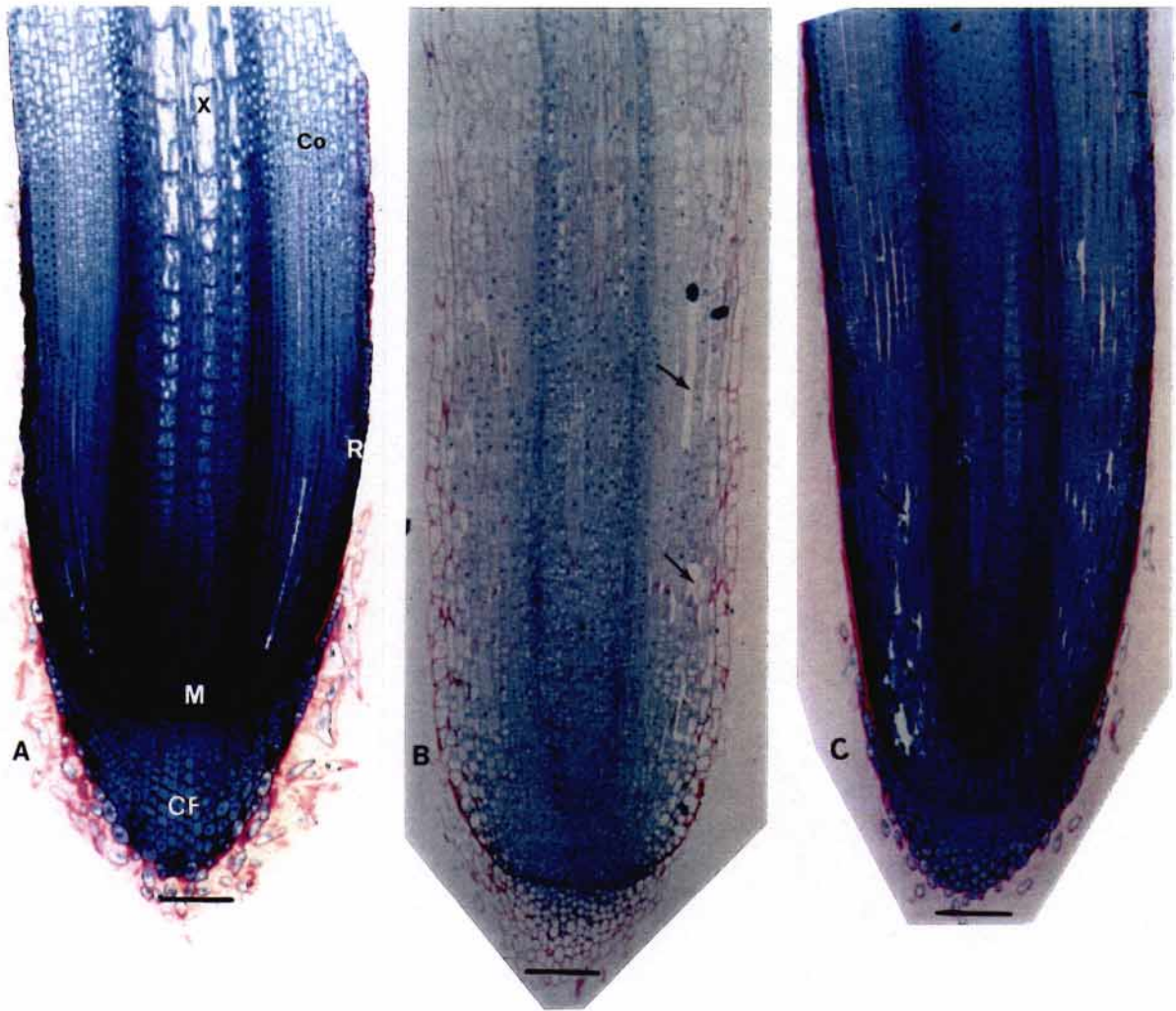
De la même façon que pour la racicule, le nickel à 60  $\mu\text{M}$  ralentit la croissance des racines latérales et de plus diminue leur densité linéaire (Figs. 6.10 A, B) :  $8 \pm 2$  racines latérales  $\text{cm}^{-1}$  contre  $18 \pm 5$   $\text{cm}^{-1}$  chez le témoin (entre 3 et 4 cm de la base de la racine, zone la plus dense en racines latérales pour les plants sains et intoxiqués). Par ailleurs, le plant intoxiqué est totalement dépourvu de poils absorbants entre 3 et 10 mm de l'apex, contrairement au témoin (Figs. 6.10 C, D). Ce n'est qu'à partir de 10 mm de l'apex que des poils se forment (Fig. 6.10 B).

**Effets de Ni sur la turgescence des cellules du cortex.** On constate, chez le cultivar XL 94 intoxiqué, que les tissus corticaux sont moins turgescents au niveau de la base de la racicule et surtout dans la zone pilifère (Figs. 6.9 A-E). Dans ce dernier cas, les cellules apparaissent extrêmement plasmolysées (Fig. 6.9 E). De plus, on constate une augmentation du volume des cellules du cortex dans la zone pilifère de la racicule : leur volume moyen est de  $150.10^3 \mu\text{m}^3$  chez le témoin contre  $550.10^3 \mu\text{m}^3$  chez le plant intoxiqué, certaines cellules atteignant même  $1000.10^3 \mu\text{m}^3$  (Figs. 6.9 D, E).

**Effets du nickel au niveau foliaire.** Les feuilles du cultivar XL 94 intoxiqué par le nickel ne montrent aucune malformation histologique. Cependant, on peut noter une accumulation d'amidon dans les chloroplastes des cellules des gaines périvasculaires (Fig. 6.11 A-C), d'autant plus forte que la concentration en Ni dans la solution est élevée. Les chloroplastes chargés de gros grains d'amidon sont déformés, leurs membranes sont rompues par endroits, tandis que ceux du plant sain sont bien ovoïdes et moins riches en amidon (Fig. 6.11 D, E). Cette accumulation d'amidon a été observée aussi bien sur le cultivar Hycorn 80 que sur XL 94, et aucune différence quantitative n'a été notée entre les deux cultivars.

**Différences de réaction à l'intoxication entre les deux cultivars.** Les désordres induits par le nickel sur les feuilles, à la base et dans la zone pilifère des racicules sont visiblement les mêmes pour les deux cultivars. Seules des différences existent au niveau des apex racinaires, telles qu'elles ont été décrites plus haut.





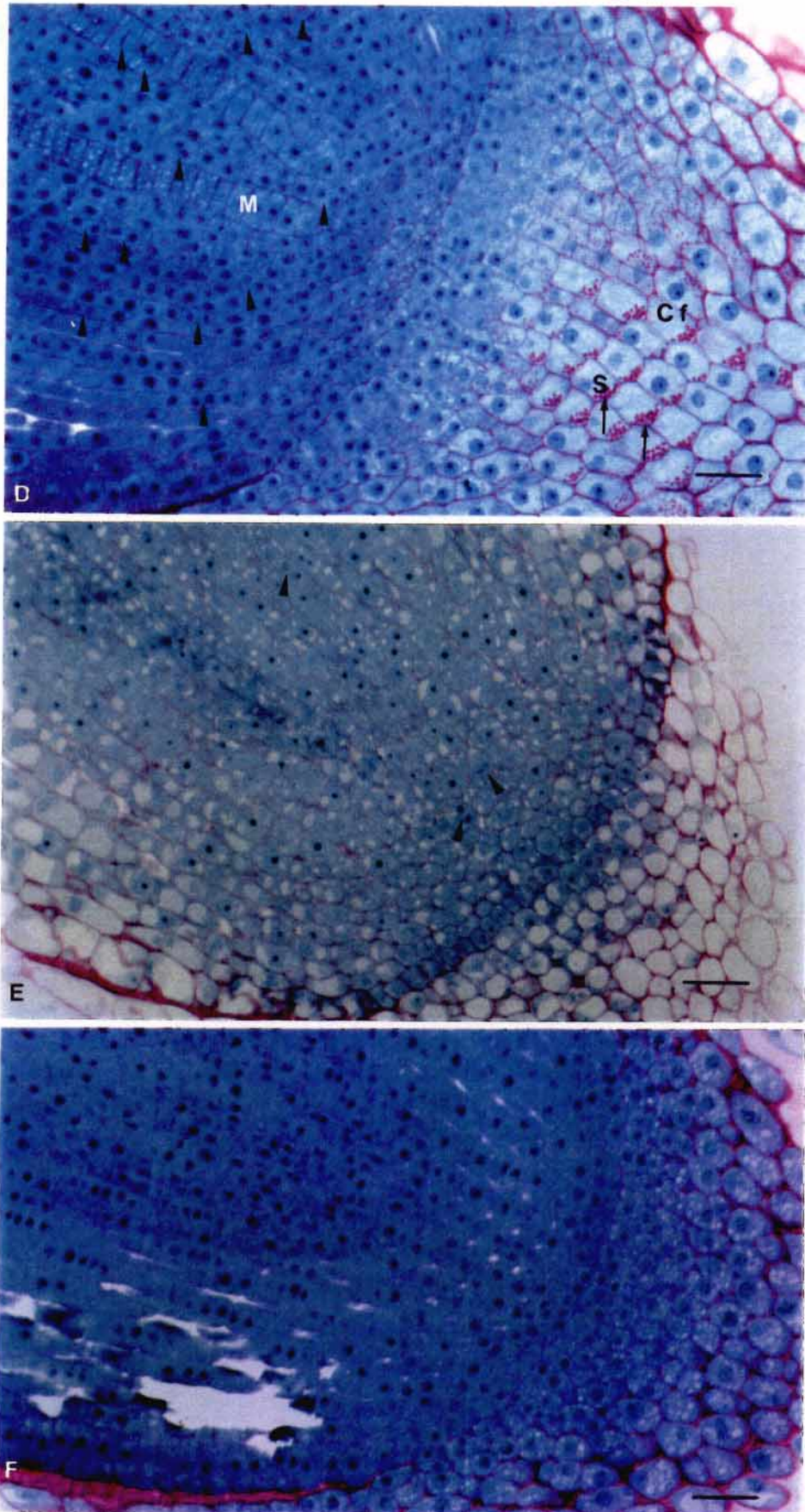
**Fig. 6.7. Modifications histologiques des apex racinaires causées par des excès de nickel chez les deux cultivars de maïs (XL 94 et Hycorn 80).** Les plants ont été cultivés pendant 8 jours sur solution de Hoagland diluée au quart contenant différentes concentrations de  $\text{NiCl}_2$ . Sections longitudinales de racines, colorées par le PAS - Naphtol blue-black, et observées en microscopie photonique.

A. Témoin (XL 94). B. XL 94 exposé à  $60 \mu\text{M}$  de Ni (IR60). Noter l'allongement important des cellules du rhizoderme et du cortex. C. Hycorn 80 exposé à  $60 \mu\text{M}$  de Ni (IR30). Noter les nombreuses disjonctions cellulaires chez les deux cultivars exposés au nickel (flèches), et le retard de différenciation des cellules de la stèle alors que le xylème apparaît chez le témoin. Barres =  $220 \mu\text{m}$ .

Co : parenchyme cortical; Cf : coiffe; M : méristème apical; R : rhizoderme; X : xylème.





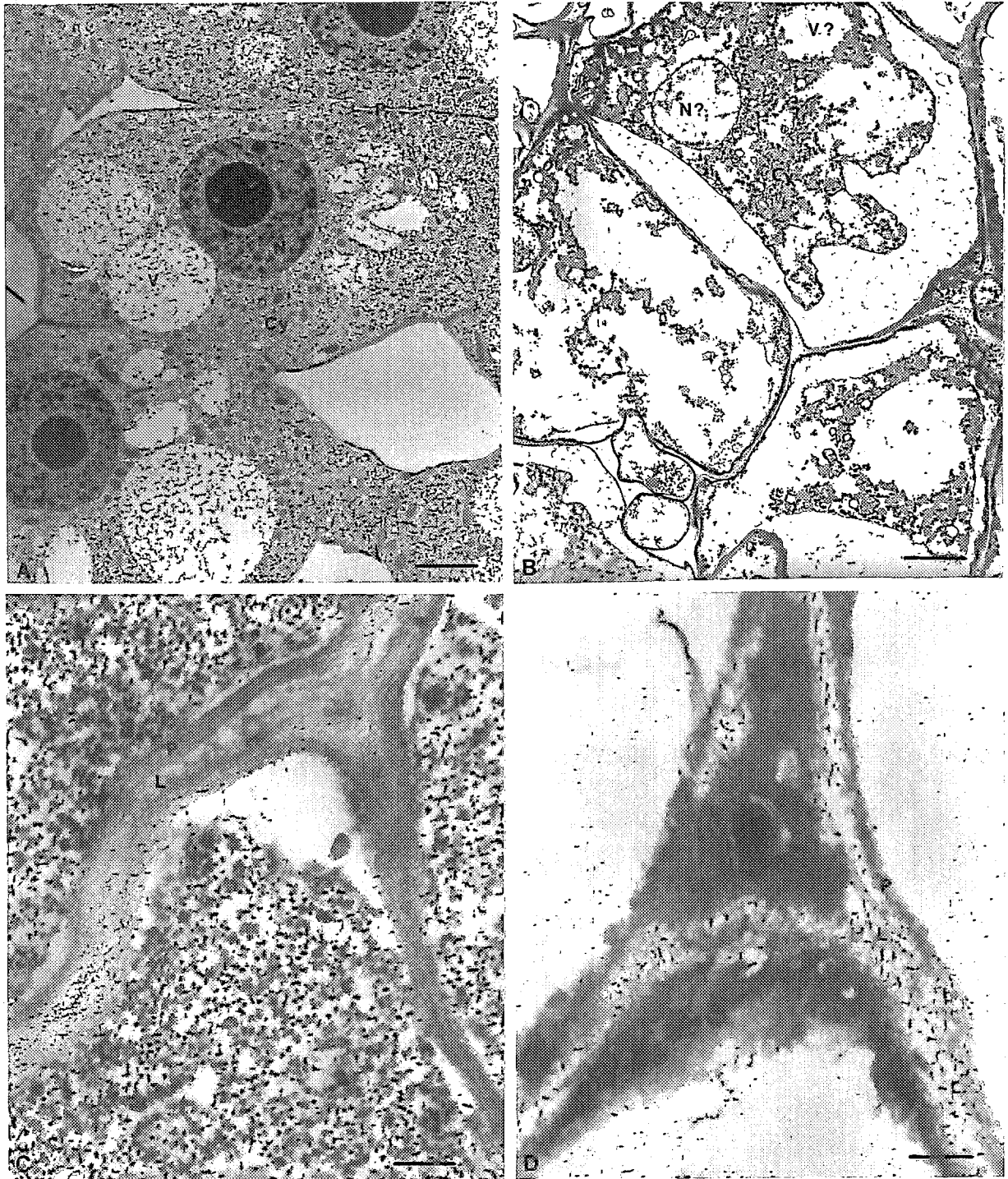


**Fig. 6.7. (suite).**

**D.** Témoin (XL 94). **E.** XL 94 exposé à 60  $\mu\text{M}$  Ni (IR60). Noter la faible densité de protéines et le faible nombre de cellules en cours de mitose (flèches larges) au niveau du méristème comparé au témoin. **F.** Hycorn 80 exposé à 60  $\mu\text{M}$  Ni (IR30). Noter, au niveau de la coiffe des deux cultivars exposés à Ni, la vacuolisation et l'absence de statolithes qui sont nombreux chez le témoin (flèches fines). Barres = 60  $\mu\text{m}$ .

Cf : coiffe; M : méristème apical; S : statocystes.





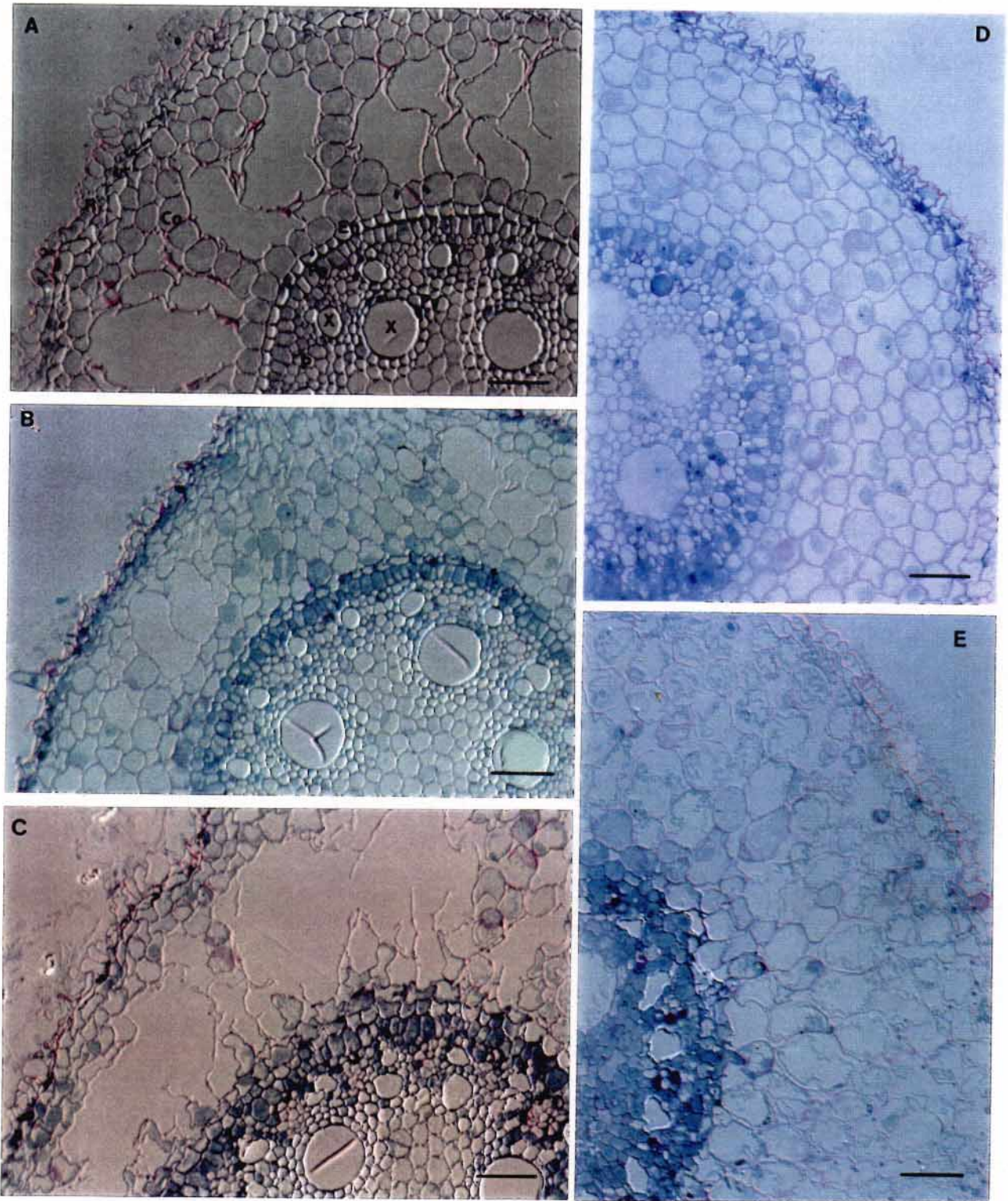
**Fig. 6.8.** Ultrastructure de cellules du méristème racinaire de maïs XL 94 exposé à des excès de nickel. Les plants ont été cultivés pendant 20 jours sur solution de Hoagland diluée au quart contenant différentes concentrations de  $\text{NiCl}_2$ . Microscopie électronique à transmission.

A. Témoin. B. plant exposé à  $40 \mu\text{M}$  de Ni (IR60). Noter la dégénérescence des cellules, manifestant une absence d'organites normalement constitués. Barres =  $3 \mu\text{m}$ .

C. Témoin. D. plant exposé à  $40 \mu\text{M}$  de Ni (IR60). Noter l'altération de la paroi primaire et de la lamelle moyenne. Barres =  $150 \text{ nm}$ .

Cy : cytosol; L : lamelle moyenne; N : noyau; P : paroi primaire; V : vacuole.





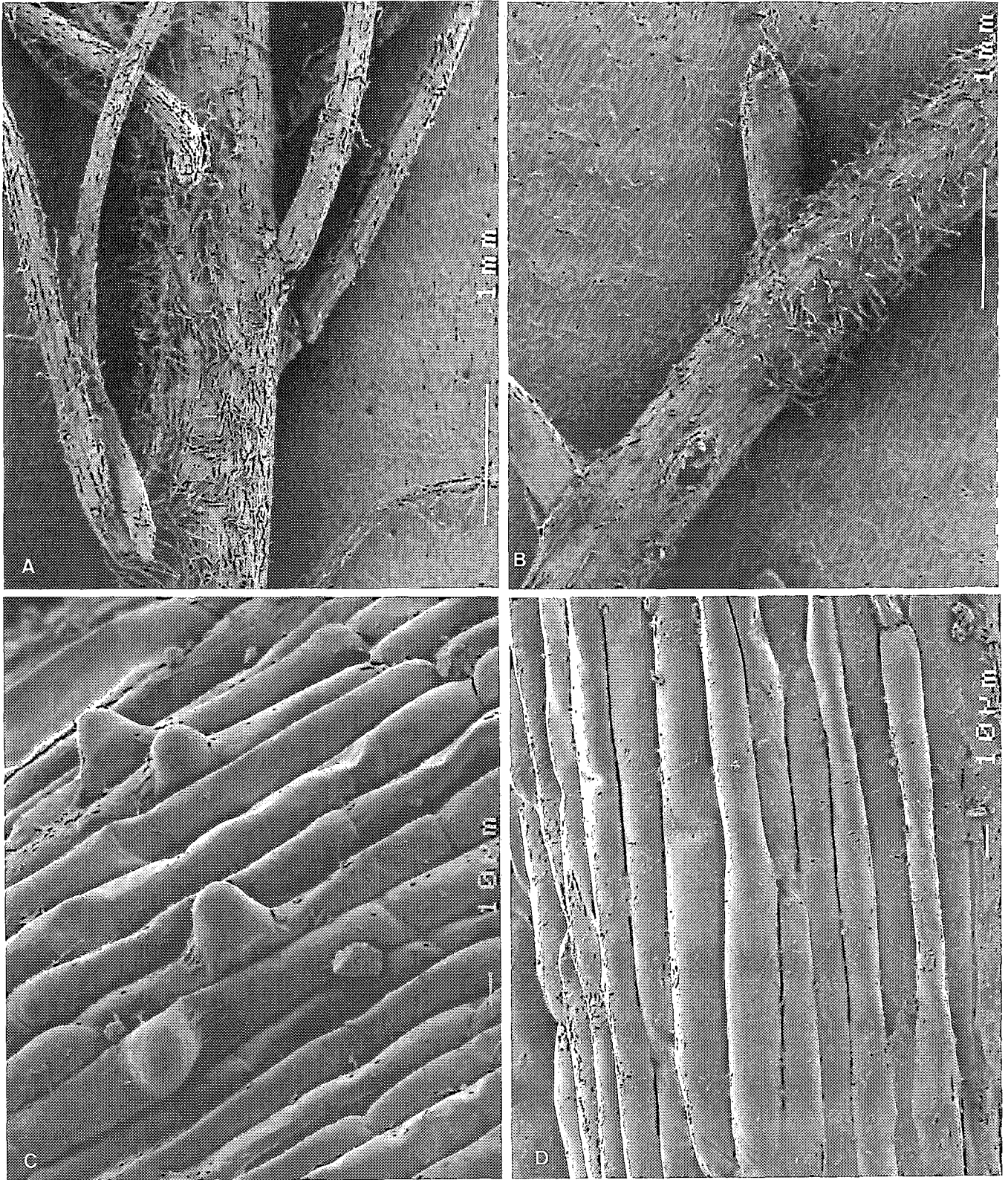
**Fig. 6.9. Modifications histologiques causées par des excès de nickel au niveau de la base et de la zone pilifère de la racine du maïs XL 94.** Les plants ont été cultivés pendant 8 jours sur solution de Hoagland diluée au quart contenant différentes concentrations de  $\text{NiCl}_2$ . Sections transversales, colorées par le PAS - Naphtol blue-black, et observées en microscopie photonique.

**A-C :** base de la racine (à 1 cm du collet). **A.** Témoin. **B.** Plant exposé à  $40 \mu\text{M}$  de Ni (IR15). **C.** Plant exposé à  $60 \mu\text{M}$  de Ni (IR60). Noter l'importante densité de protéines au niveau du rhizoderme et du péricycle des plants intoxiqués, ainsi que l'important aérenchyme avec  $60 \mu\text{M}$  Ni. Barres =  $100 \mu\text{m}$ .

**D, E :** zone pilifère (à 5 mm de l'apex). **D.** Témoin. **E.** Plant exposé à  $60 \mu\text{M}$  de Ni (IR60). Noter les déformations et la densité de protéines des cellules de la stèle, ainsi que la plasmolyse apparente et l'augmentation du volume des cellules du cortex. Barres =  $100 \mu\text{m}$ .

Co : parenchyme cortical; En : endoderme; P : phloème; Pe : péricycle; Pv : parenchyme vasculaire; R : rhizoderme; X : xylème.



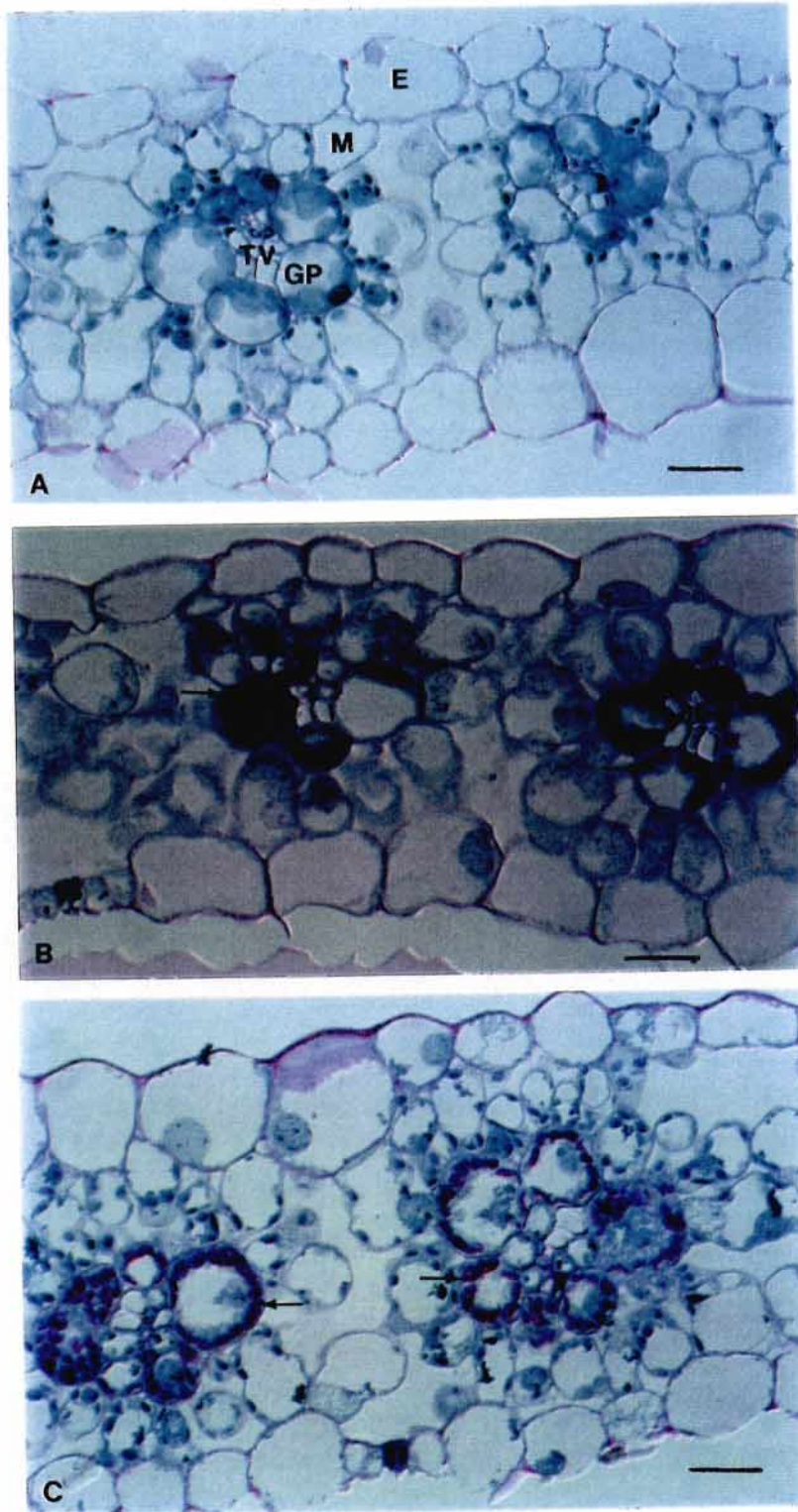


**Fig. 6.10. Modifications morphologiques de la base de la racine du maïs XL 94 causées par des excès de nickel.** Les plants ont été cultivés pendant 8 jours sur solution de Hoagland diluée au quart contenant différentes concentrations de  $\text{NiCl}_2$ . Microscopie électronique à balayage.

**A, B :** zone d'initiation des racines latérales (située entre 3 et 4 cm du noeud cellulaire). **A.** Témoin. **B.** Plant exposé à  $60 \mu\text{M}$  de Ni (IR60). Noter le faible nombre de racines latérales. Barre = 1 mm.

**C, D :** zone pilifère, à 5 mm de l'apex. **C.** Témoin. **D.** Plant exposé à  $60 \mu\text{M}$  de Ni (IR60): les poils absorbants sont absents à ce niveau. Barre =  $10 \mu\text{m}$ .





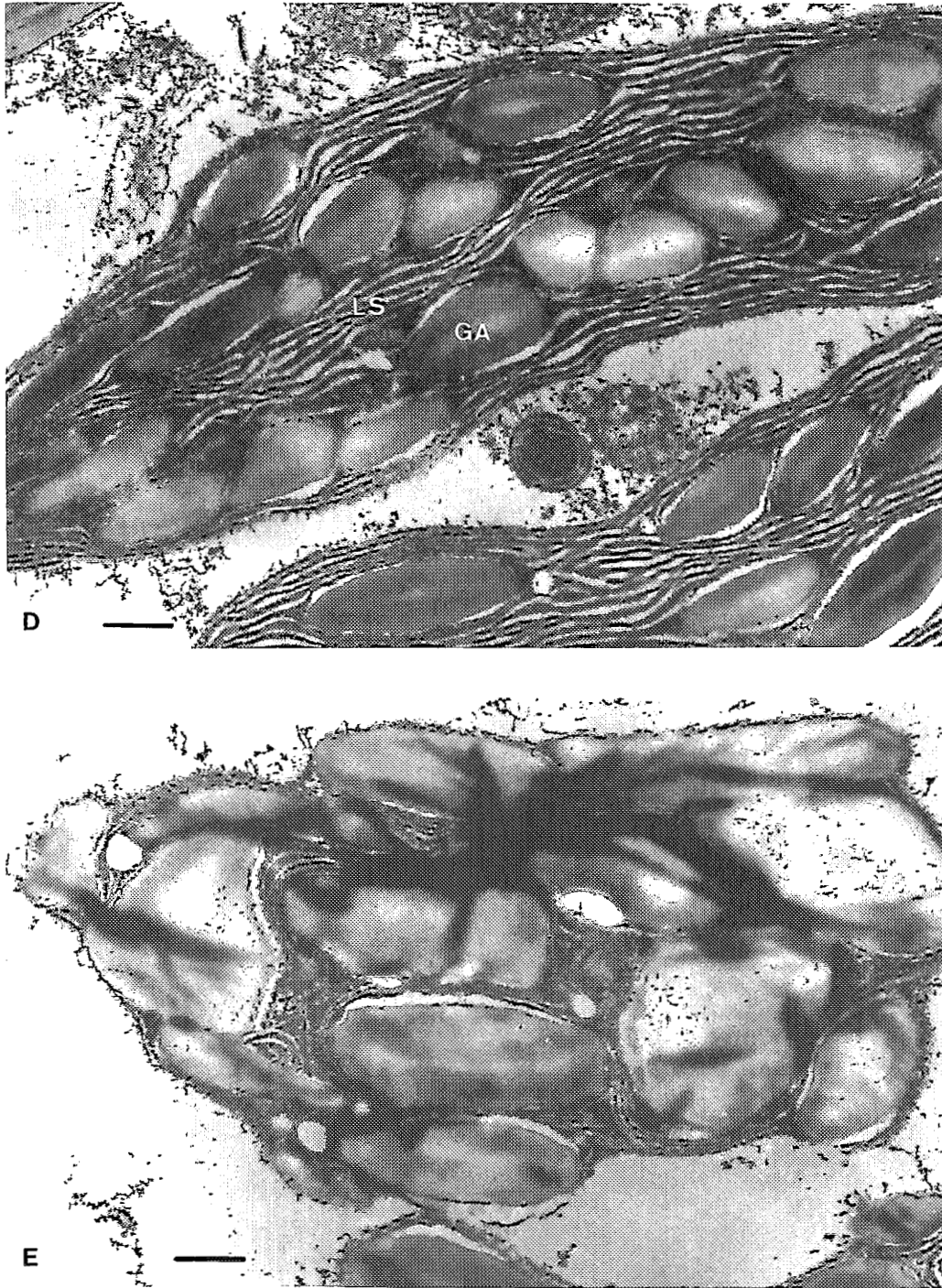
**Fig. 6.11. Structure et ultrastructure des feuilles de maïs XL 94 exposé au nickel.** Les plants ont été cultivés pendant 8 jours sur solution de Hoagland diluée au quart contenant différentes concentrations de  $\text{NiCl}_2$ . Milieu du limbe de la 2<sup>ème</sup> feuille (état mature).

A-C : sections transversales, colorées par le PAS - Naphtol blue-black, et observées en microscopie photonique. A. Témoin. B. Plant exposé à  $40 \mu\text{M}$  de Ni (IR15). C. Plant exposé à  $60 \mu\text{M}$  de Ni (IR60). Noter l'accumulation d'amidon dans les chloroplastes des cellules des gaines périvasculaires (flèches). Barres =  $33 \mu\text{m}$ .

E : épiderme; GP : gaine périvasculaire; M : mésophylle; TV : tissus vasculaires.

Figure 6.1. Effets de Ni sur la physiologie du maïs.

Figure 6.2. Effets de Ni sur la physiologie du maïs.



**Fig. 6.11 (suite).**

**D, E :** microscopie électronique à transmission. Aspect des chloroplastes dans les cellules de la gaine périvasculaire. **D.** Témoin. **E.** Plant exposé à 60 µM de Ni (IR60). Noter l'accumulation d'amidon et les ruptures des membranes des chloroplastes. Les lamelles du stroma sont peu visibles. Barres = 400 nm.

GA : grain d'amidon; LS : lamelles du stroma.

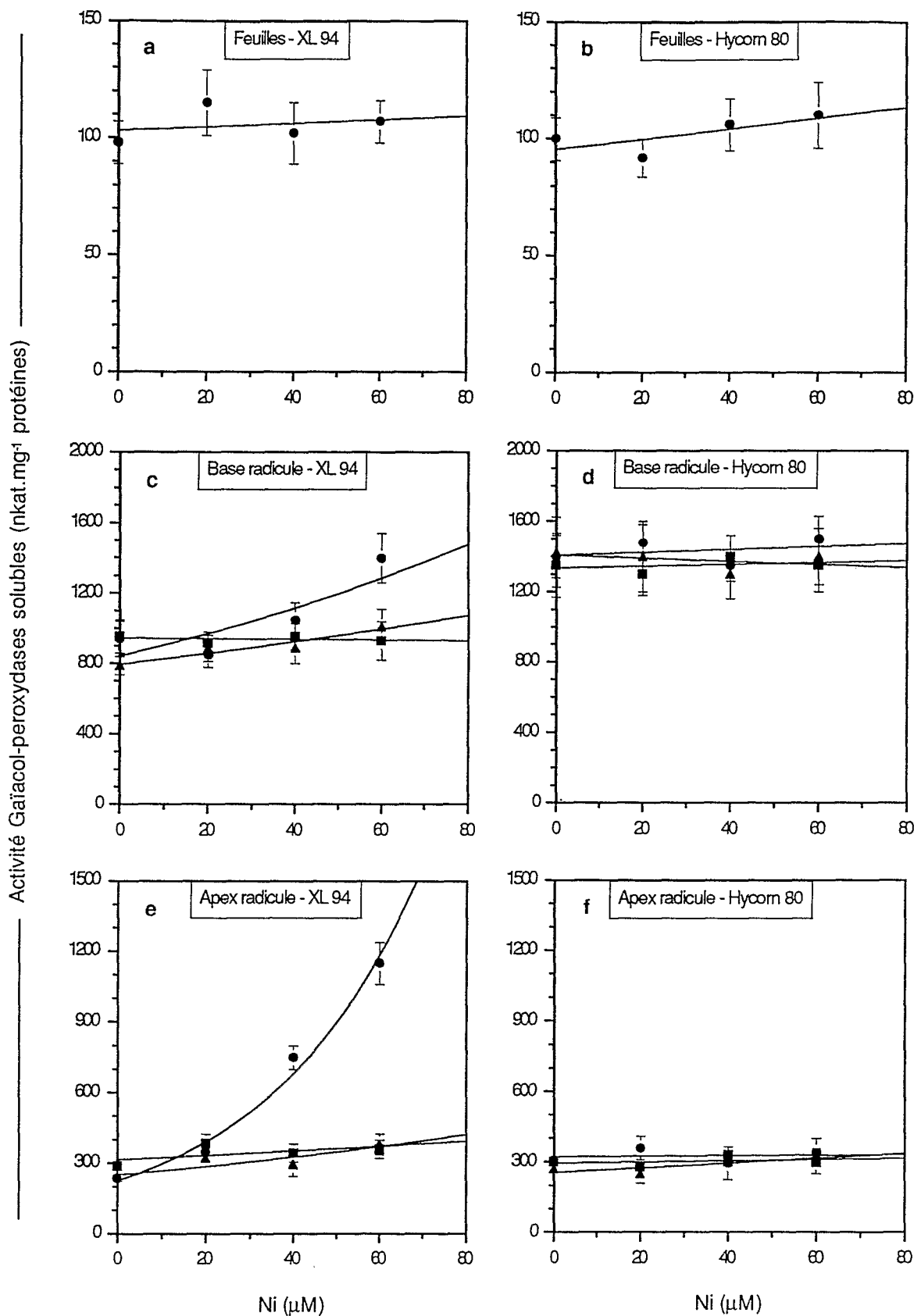


Fig. 6.12. Effet du nickel sur l'activité totale des peroxydases solubles de différents organes des maïs XL 94 et Hycorn 80. Les plants ont été cultivés pendant 2 (■), 4 (▲) ou 8 (●) jours, sur solution de Hoagland diluée au quart, avec différentes concentrations de NiCl<sub>2</sub>. Activité peroxydase dosée avec le gaïacol. Les valeurs sont les moyennes ± leurs écarts-types calculés sur 3 répétitions par traitement.

### *Action du nickel sur l'activité des peroxydases*

Parce que souvent activées lors d'un stress (Castillo, 1986), nous nous sommes intéressés aux peroxydases afin de tenter de préciser où et à quel moment le nickel pouvait exprimer sa toxicité sur le maïs. Nous avons ainsi comparé les activités de différents organes de maïs (apex racinaire, base de la racine, et feuille), en fonction de la concentration en nickel dans la solution, du temps de culture, et du cultivar (sensible et tolérant au nickel). Pour cela, les plants de maïs XL 94 et Hycorn 80 ont été cultivés sur solution de Hoagland diluée au quart et contenant différentes concentrations en  $\text{NiCl}_2$ . Des échantillons de 6 plants ont été constitués après 2, 4 et 8 jours de culture. L'apex racinaire (l'extrémité sur 6 à 7 mm), la base de la racicule (entre 1 et 2 cm du collet), ainsi que le milieu du limbe de la seconde feuille (sur 1 cm) ont été prélevés sur chacun des 6 plants afin de constituer les échantillons moyens. Les analyses, telles qu'elles sont décrites au paragraphe 2.5, ont porté sur les fractions solubles de ces échantillons.

Le dosage de l'activité totale (au gaïacol) des peroxydases solubles (Fig. 6.12) montre que Ni, à des concentrations toxiques pour la croissance comprises entre 20 et 60  $\mu\text{M}$ , n'induit pas de modification significative de l'activité sur les feuilles des deux cultivars après 8 jours de culture.

Au niveau des racines, seul le cultivar XL 94 montre une augmentation de l'activité gaïacol-peroxydase et seulement après 8 jours. Une nette différence existe entre la base et l'apex de la racicule : l'activité au niveau de la base augmente légèrement avec 60  $\mu\text{M}$  de Ni, tandis que celle au niveau de l'apex augmente fortement à partir de 40  $\mu\text{M}$ . Cette augmentation de l'activité sur l'apex coïncide avec l'apparition d'un brunissement à ce niveau.

### **6.2.3. Discussion et conclusion**

#### *Action du nickel sur l'acidification du milieu par les racines de maïs*

La figure 6.4 montre que le nickel inhibe de façon très nette l'acidification du milieu extérieur par des racines excisées de maïs XL94 (Ni-sensible). Celle-ci est normalement due à l'activité des ATPases pompes à protons ( $\text{H}^+$ -ATPases) du plasmalemme. Ainsi, Ni inhiberait l'activité  $\text{H}^+$ -ATPasique, à des concentrations toxiques pour la croissance de la plante, 25 et 60  $\mu\text{M}$  pouvant ainsi contribuer à l'inhibition de la croissance racinaire d'environ 50 et 95 % constatée après 8 jours de culture sur solution de Hoagland diluée dix fois (pour cv GH 5010, cf. Fig. 4.6). En effet, l'acidification des parois squelettiques est aujourd'hui classiquement admise pour expliquer l'élongation cellulaire.

Plusieurs mécanismes sont possibles dans l'inhibition de l'activité ATPasique : (1) par compétition entre  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  et formation de complexes Ni-ATP peu réactifs ;

(2) par inhibition de la synthèse d'ATP diminuant sa disponibilité à l'ATPase ;  
(3)  $\text{Ni}^{2+}$  pourrait se fixer sur l'enzyme et modifier la structure de son site catalytique ;  
(4) des modifications des charges de surface des membranes peuvent diminuer l'activité des enzymes membranaires ; (5)  $\text{Ni}^{2+}$  pourrait modifier la structure lipidique de la membrane, et affecter l'ATPase par altération des caractéristiques de l'interaction lipide-protéine.

Le mécanisme (1) a été mis en évidence sur le maïs avec le cadmium (Tu et Brouillette, 1987), alors que Caldwell et Haug (1982) ont montré sur l'orge que  $\text{Cd}^{2+}$  inhibe l'activité ATPase par une diminution de la fluidité du plasmalemmme. Concernant l'aluminium, il semble que l'inhibition de l'activité de l'enzyme puisse être due à une modification de l'environnement lipidique et à une fixation de Al sur la protéine elle-même, affectant sa conformation et son affinité pour le complexe Mg-ATP (Tu et Brouillette, 1987; Matsumoto *et al.*, 1992; Lindberg et Griffiths, 1993).

S'agissant de Ni, les résultats trouvés dans la littérature sont assez controversés. Selon Ros *et al.* (1992a), chez le riz le nickel inhibe l'activité ATPase plasmalemmique *in vitro* dans les racines et les feuilles, alors que Ni augmente l'activité dans les feuilles *in vivo*. Cette activation serait due à une modification de la composition lipidique du plasmalemmme (Ros *et al.*, 1990; Ros *et al.*, 1992b). Sur les racines de maïs, Marrè *et al.* (1982) ont constaté une augmentation de l'activité *in vitro* en absence de magnésium, Ni pouvant alors se substituer à Mg pour le fonctionnement de l'enzyme ; par contre, en présence de 1mM de Mg, 2 mM de Ni inhibent l'activité de 40 %. Divers auteurs ont mis en évidence une activation de l'ATPase plasmalemmique par Ni, comme chez les cyanobactéries (Asthana *et al.*, 1992) et sur les racines de maïs (Cocucci *et al.*, 1981; Morgutti *et al.*, 1981; Morgutti *et al.*, 1984; Cocucci et Morgutti, 1986). Concernant les travaux effectués par ces derniers sur le maïs, il est intéressant de faire quelques remarques, car, hormis la variété, ils ont utilisé le même matériel végétal que dans la présente étude (racines excisées de maïs exposées à Ni) : (1) les variations de pH qu'ils ont observé sont faibles (diminution de 0,09 unités pH au maximum en 1 h en présence de 1 mM de  $\text{NiSO}_4$  dans de l'eau, concentration d'ailleurs excessivement forte comparée à celle utilisée dans notre cas ; cf. Cocucci et Morgutti, 1986) ; (2) le milieu qu'ils utilisent n'est pas du tout tamponné (que  $\text{NiSO}_4$  à 1mM ; cf. Cocucci et Morgutti, 1986) ou faiblement tamponné ( $\text{NiSO}_4$  à 0,1 mM dans  $\text{CaSO}_4$  0,2 mM ; cf. Morgutti *et al.*, 1984), suggérant une intervention possible des ions sulfates dans un symport  $\text{H}^+ / \text{SO}_4^{2-}$  contribuant à neutraliser l'efflux de protons ; (3) les segments de racines utilisés par les auteurs (Morgutti *et al.*, 1984; Cocucci et Morgutti, 1986), de 8 mm de long, ont été prélevés dans la zone 5-13 mm au-dessus de l'apex, or ces segments pourraient présenter une activité acidifiante préférentielle par rapport à l'ensemble du profil de la racine, tel que cela a été montré sur les racines de colza et de ray-grass (Ruiz, 1992). Finalement, suivant le matériel végétal utilisé et les conditions expérimentales, Ni semble pouvoir diminuer ou augmenter l'activité ATPase plasmalemmique.

Toutefois, nos résultats montrent manifestement, au moins dans nos conditions, que Ni inhibe l'activité H<sup>+</sup>-ATPase plasmalemmique des racines de maïs. De plus, la rapidité de l'inhibition (3 à 4 min) suggère que Ni pourrait modifier directement la structure du site catalytique de l'enzyme. Ainsi, une diminution de l'activité pompe à protons des ATPases du plasmalemmes racinaire, à des concentrations en Ni toxiques pour la croissance, pourrait ralentir le développement de la plante par une diminution générale de l'absorption des éléments nutritifs majeurs, mais aussi par la moindre acidification de la paroi squelettique classiquement impliquée dans le processus d'élongation cellulaire. On peut regretter que, faute de temps, cette expérience n'ait porté que sur le cultivar sensible à Ni (XL 94). En effet, des différences importantes peuvent exister dans l'activité des H<sup>+</sup>-ATPases entre différents cultivars, tels que Costa et Morel (1994) l'ont montré.

#### *Action du nickel sur la fuite d'électrolytes des racines de maïs*

Les racines des plants intoxiqués par Ni présentent, dans les 10 à 20 premières minutes d'échange avec le milieu aqueux, une fuite d'électrolytes plus rapide que celle du témoin (Fig. 6.5), cette fuite étant d'autant plus rapide que Ni est plus élevé. Cela suggère une dégradation du plasmalemmes par le nickel, facilitant la fuite des ions en dehors de la cellule mise en condition hypotonique.

Cependant, on constate que les plants exposés à Ni libèrent moins d'électrolytes que le témoin au-delà de 30 min, ce d'autant moins que Ni est élevé. Les différences sont importantes après 4 h : si on fait le bilan entre la conductivité de départ (1,81  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) et celles à 4 h, les plants exposés à 50  $\mu\text{M}$  (IR40) et 65  $\mu\text{M}$  de Ni (IR60) libèrent respectivement 46 % et 60 % moins d'ions que le témoin. On pourrait alors croire que le plasmalemmes n'est pas dégradé et que les cellules conservent davantage leurs ions en présence de Ni. Cette hypothèse est toutefois peu probable. Par contre, il est vraisemblable que les plants intoxiqués disposaient d'une faible réserve d'électrolytes au départ de l'expérience, expliquant les paliers d'autant plus bas et atteints plus rapidement que Ni est élevé, tandis que le témoin disposait probablement d'une réserve plus importante, comme en témoigne la sortie d'ions encore mesurable après plus de 4 heures. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que les plants ont été exposés au nickel pendant 4 jours, temps durant lequel les membranes ont pu se dégrader progressivement et permettre la sortie d'une partie des réserves d'électrolytes.

Néanmoins, s'agissant de la fuite des ions encore après 4 h chez le motif témoin, il n'est pas exclu qu'elle puisse être due à une dégradation du plasmalemmes pour des temps longs, car le milieu ne contient pas de calcium, qui est généralement ajouté pour préserver l'intégrité membranaire. Toutefois, cela ne change pas l'interprétation des résultats sur les temps courts.

Par conséquent, il paraît vraisemblable que Ni, appliqué à des concentrations toxiques pour la croissance du maïs (50 et 65  $\mu\text{M}$  dans Hoagland diluée au quart; cf. Fig. 4.7), puisse causer une dégradation des membranes plasmiques se traduisant par une fuite d'électrolytes.

La plasmolyse constatée au niveau des cellules du cortex racinaire (Fig. 6.9 E) est en accord avec une altération du plasmalemme. En effet, une telle plasmolyse n'est pas due à une diminution du potentiel osmotique extérieur (cas typique de plasmolyse) chez le plant exposé au nickel, car la quantité (en terme de mole) de  $\text{NiCl}_2$  ajoutée à la solution de Hoagland diluée au quart est négligeable comparée à la quantité d'éléments majeurs présents (cf. tableau 2.2). Il ne peut s'agir que d'une augmentation du potentiel osmotique interne, c'est à dire d'une diminution de la concentration en solutés de la cellule, par une fuite d'une partie de ses ions. Il est donc vraisemblable que la plasmolyse observée au niveau des cellules corticales, en présence de concentrations toxiques en Ni, soit due à une dégradation du plasmalemme au point de permettre la fuite d'une partie des ions et de l'eau de la cellule.

Une telle dégradation du plasmalemme par Ni a déjà été suspectée par divers auteurs (Robertson et Meakin, 1980; Verlière et Heller, 1981). Pandolfini *et al.* (1992) l'ont mise en évidence chez le blé. Le cuivre, à des concentrations toxiques, est connu pour altérer l'intégrité des membranes plasmiques et augmenter leur perméabilité (Lidon et Henriques, 1993; Meharg, 1993; Punz et Sieghardt, 1993).

En conclusion, en plus des raisons précédemment invoquées, le nickel pourrait diminuer la croissance et le développement du maïs en dégradant le plasmalemme des cellules du cortex racinaire, entraînant une fuite d'électrolytes et une diminution de l'absorption des éléments nutritifs.

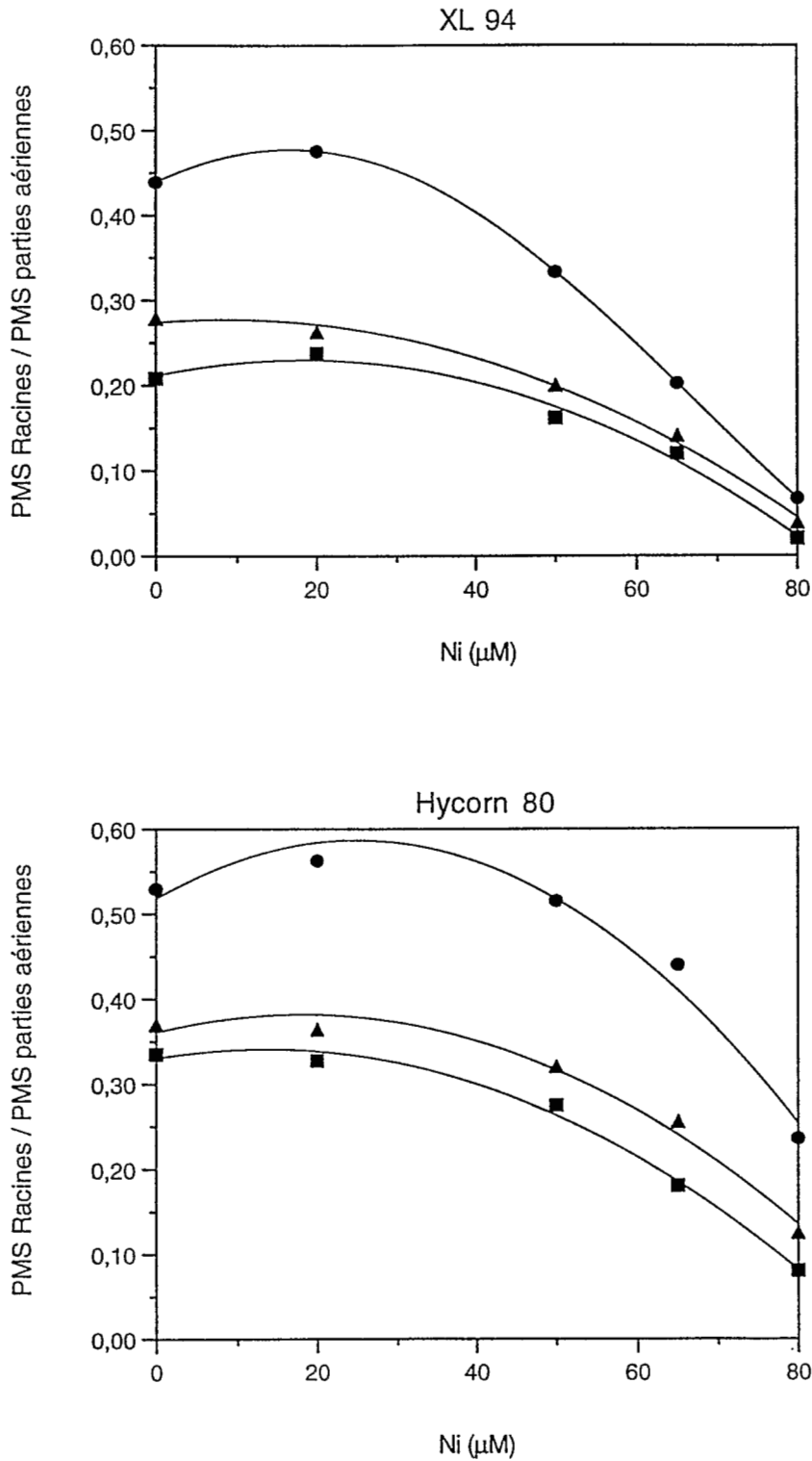
#### *Action du nickel sur la teneur en eau du maïs*

L'inhibition de la croissance du maïs par des excès de nickel se traduit par diminution importante de la teneur en eau des racines et surtout des parties aériennes (Fig. 6.6).

Il semble que ce soit le cas pour la plupart des métaux (Barceló et Poschenrieder, 1990). Azpiazu *et al.* (1986) ont montré sur le ray-grass (*Lolium multiflorum*) que Ni induit une forte diminution de la teneur en eau des parties aériennes (jusqu'à 18 %). Dans leur étude, tous les métaux testés (Ni, Cu, Zn, Co, Cd, As, et Pb appliqués à 250  $\text{mg.l}^{-1}$ ) induisent une diminution de la teneur en eau, mais Ni est celui qui occasionne la diminution la plus importante. De nombreux auteurs ont constaté le même phénomène avec Ni (Estañ *et al.*, 1988; Pandolfini *et al.*, 1992; Moya *et al.*, 1993; Xyländer *et al.*, 1993).

Il est vraisemblable que la diminution de la teneur en eau observée provienne de l'inhibition préférentielle de la croissance des racines par Ni, entraînant une diminution du rapport biomasse racinaire / biomasse aérienne chez les plants intoxiqués (Fig. 6.13).





**Fig. 6.13.** Effet du nickel sur le rapport (poids de matière sèche des racines / poids de matière sèche des parties aériennes) de maïs XL 94 et Hycorn 80. Les plants ont été cultivés pendant 4 (■), 8 (▲) et 12 (●) jours, sur solution de Hoagland diluée au quart, avec différentes concentrations de  $\text{NiCl}_2$ . Les mesures ont porté sur des échantillons moyens de 10 plants.

En effet, les résultats du tableau 6.4 suggèrent que la transpiration par unité de surface foliaire est peu modifiée, si bien que - la masse racinaire étant réduite - la poussée radiculaire serait insuffisante pour compenser la transpiration, et conduirait irrémédiablement à une diminution de la teneur en eau de la plante. De plus, la capacité d'absorption d'eau par les racines est probablement altérée, comme le suggère la faible turgescence des cellules du cortex racinaire (Fig. 6.9 E) et la fuite d'électrolytes constatée précédemment. Dans ce cas, le potentiel osmotique serait plus élevé, le potentiel hydrique par conséquent aussi, et l'appel d'eau serait donc plus faible.

**Tableau 6.4. Effet du nickel sur la transpiration, exprimée par  $\text{cm}^{-2}$  de surface foliaire, du maïs XL 94.** Les plants ont été cultivés pendant 8 jours sur solution de Hoagland diluée au quart et contenant différentes concentrations de  $\text{NiCl}_2$ . Le calcul a été effectué en déterminant le volume d'eau consommée sur les deux derniers jours et la surface foliaire à 8 jours. Les mesures ont porté sur des échantillons de 10 plants.

	Témoin	25 $\mu\text{M}$ Ni (IR5)	50 $\mu\text{M}$ Ni (IR50)
Transpiration ( $\mu\text{l}.\text{cm}^{-2}.\text{j}^{-1}$ )	66,9	66,2	61,3

#### *Action du nickel sur la structure et l'ultrastructure du maïs*

La figure 4.7 a montré que le nickel inhibe davantage la croissance des racines que celle des parties aériennes. L'inhibition de la croissance racinaire se traduit par une réduction de la longueur des radicules et des racines latérales, ainsi que de la densité des racines latérales et des poils absorbants (Fig. 6.10). Il est généralement admis que l'inhibition de la croissance racinaire est un effet précoce de la phytotoxicité des métaux lourds (Barceló et Poschenrieder, 1990).

L'absence de statolithes dans les cellules de la coiffe des racines est un effet spectaculaire du nickel (à 60  $\mu\text{M}$ ) sur les jeunes plants intoxiqués chez les deux cultivars (Figs. 6.7 D-F). Il est possible que le nickel puisse inhiber l'accumulation d'amidon dans les statocystes en bloquant leur approvisionnement en carbohydrates (L'Huillier *et al.*, en préparation).

L'accumulation d'amidon dans les feuilles du maïs intoxiqué (Figs. 6.11 A-E) suggère effectivement que Ni agit sur le métabolisme des carbohydrates, comme cela a été montré sur d'autres plantes (Rauser, 1978; Samarakoon et Rauser, 1979; Moya *et al.*, 1993). Cette accumulation d'amidon pourrait s'expliquer par une augmentation de la photosynthèse. Mais de nombreuses études ont montré que celle-ci est au contraire inhibée par le nickel (Clijsters et Van Assche, 1985; Sheoran *et al.*, 1990; Bishnoi *et al.*, 1993a). Cependant, Greger *et al.* (1991) ont émis l'hypothèse que la diminution de transport des carbohydrates induite par les métaux lourds est plus importante que celle de la photosynthèse, entraînant une

augmentation de l'accumulation des carbohydrates dans les feuilles. Nos expériences corroborent cette hypothèse. En effet, le blocage du transport du saccharose à partir des feuilles vers les racines est supporté par cinq résultats :

- (1) la croissance des racines, qui sont exclusivement dépendantes des feuilles pour les carbohydrates, est inhibée plus fortement que celle des parties aériennes (Figs. 4.7 et 4.8) ;
- (2) les statolithes, constitués d'amidon provenant des sucres transportés à partir des feuilles, sont absents au niveau de la coiffe de la racine (Figs. 6.7 D-F) ;
- (3) la faible coloration des parois par le PAS au niveau de l'apex traduit sans doute une déficience en polysaccharides ;
- (4) l'absence apparente de paroi primaire dans les cellules en division peut provenir d'un manque de composés pecto-cellulosiques ;
- (5) la faible densité de protéines au niveau du méristème racinaire, surtout chez le cultivar XL 94, peut traduire une situation dans laquelle les protéines remplacent les carbohydrates en tant que substrats majeurs de la respiration, comme l'ont observé Dieuaide *et al.* (1992).

L'origine d'une inhibition du transport des carbohydrates pourrait se situer au niveau :

- (1) d'un aiguillage préférentiel des triose-phosphates vers l'amidon plutôt que le saccharose ;
- (2) d'une inhibition de la transformation de l'amidon en saccharose dans les feuilles (l' $\alpha$ -amylase, qui pourrait être mise en cause, ne semble pas être inhibée par des excès de nickel; Bishnoi *et al.*, 1993b) ;
- (3) ou d'une inhibition du transport actif du saccharose vers les racines. La quantité relativement importante de nickel trouvée dans les feuilles (Cataldo *et al.*, 1978; Lübben et Sauerbeck, 1991) et même dans les chloroplastes (Veeranjaneyulu et Das, 1982) suggère que Ni agit directement au niveau foliaire.

On peut penser qu'un blocage du transport des carbohydrates vers les apex des racines doit nécessairement perturber le géotropisme racinaire. Toutefois, une étude des effets de Ni sur la morphologie du système racinaire du maïs cultivé sur rhizotron ne nous a pas permis de confirmer cette hypothèse. Cependant, le support utilisé (billes d'argile expansée ; cf. § 2.1.4) n'était peut-être pas adapté. En effet, on peut imaginer que les billes d'argile ont pu orienter naturellement les racines vers le bas ou vers le haut lorsque ces dernières ont buté sur elles. Un tropisme de contact (haptotropisme) pourrait avoir interféré avec le géotropisme. De plus, les vides importants entre les billes ont probablement permis aux racines de s'orienter vers le bas simplement par leur propre poids. Par conséquent, une telle expérience mériterait d'être reconduite avec un autre support de texture plus fine. Une étude approfondie serait également souhaitable, en particulier sur le transport de l'auxine dans la racine, des auteurs ayant montré que l'aluminium altère ce transport et perturbe le gravitropisme racinaire chez le maïs (Hasenstein et Evans, 1988).

La baisse de la fourniture de carbohydrates a de nombreuses conséquences dans la racine. Tout d'abord, elle doit contribuer largement à l'inhibition de la croissance racinaire. En effet, une réduction de l'alimentation glucidique des racines peut conduire à une

diminution de l'activité mitotique, en particulier par inhibition de la formation des parois primaires, comme cela a aussi été observé sur *Brachystegia spiciformis* (Robertson et Meakin, 1980). Cependant, la présence importante de nickel au niveau des apex racinaires constatée précédemment (cf. chapitre 5, Fig. 5.5) suggère que Ni peut également inhiber directement l'activité du méristème. Il est probable que l'inhibition de l'activité mitotique soit la cause principale de la baisse de la croissance racinaire, puisque 80 % d'inhibition de l'activité mitotique du cultivar XL 94 par 60  $\mu\text{M}$  de Ni peuvent probablement suffire à diminuer la longueur de la racine de 60 % (tableau 6.3). De même que les 50 % de diminution de l'activité mitotique du cultivar Hycorn 80 peuvent expliquer la réduction de la longueur de la racine de 30 % (tableau 6.3).

Par ailleurs, l'allongement important des cellules du rhizoderme et du cortex au niveau de l'apex du maïs XL 94 (Figs. 6.7 B) est vraisemblablement dû aussi à une diminution de l'apport de carbohydrates. En effet, il est possible que les parois primaires de l'apex du plant intoxiqué soient déficientes en microfibrilles de cellulose. Dans ces conditions, le nickel pourrait entraîner un relâchement des parois et favoriser une élévation cellulaire. Cependant, on peut concevoir aussi que l'augmentation de l'élévation soit due à un déplacement du calcium lié aux polygalacturonates des pectines par Ni, en particulier au niveau de la lamelle moyenne et de la paroi primaire (Varner et Taylor, 1989).

D'autre part, une privation de carbohydrates peut induire un blocage de la différenciation cellulaire au niveau des racines, suite à l'inhibition des mitoses. On observe en effet un blocage de la différenciation cellulaire chez les deux cultivars intoxiqués, comme le montre l'absence de vaisseaux du xylème à 2 mm au-dessus du méristème (Fig. 6.7 A-C), ainsi que la forte densité cytoplasmique au niveau du péricycle et du rhizoderme à la base de la racine (Figs. 6.9 A-C). Ceci concorde de façon remarquable avec la diminution de la densité de racines latérales, issus des primordiums au niveau du péricycle, et de la densité de poils absorbants, issus de la différenciation des trichoblastes au niveau du rhizoderme (Figs. 6.10).

Le cultivar Hycorn 80, moins sensible au nickel que XL 94 (cf. Figs. 4.7 et 4.8), montre une activité méristématique plus importante au niveau de l'apex racinaire (Fig. 6.7 C, F). Toutefois, avec 60  $\mu\text{M}$  de Ni, les cellules de la coiffe des racines des deux cultivars sont dépourvues de statolithes. Ceci suggère que l'inhibition du transport des carbohydrates est plus faible dans le cas du cultivar tolérant que chez le cultivar sensible. En effet, il est possible que le saccharose soit utilisé en priorité pour l'activité méristématique, inhibant ainsi la synthèse de statolithes. Les protéines des cellules méristématiques de Hycorn 80 ne seraient alors pas dégradées, la formation des parois primaires et les mitoses se feraient normalement, assurant une croissance des racines relativement bonne. Dans le cas du cultivar sensible (XL 94), l'inhibition du transport des carbohydrates serait plus importante, entraînant une diminution de l'activité du méristème racinaire.

S'agissant de la plasmolyse apparente des cellules du cortex au niveau de la zone pilifère de la racine (Fig. 6.9 E), elle semble en contradiction avec l'allongement accru de ces mêmes cellules observé dans la zone d'élongation (Fig. 6.7 B). En effet, c'est normalement la turgescence qui permet l'allongement des cellules de cette zone. Robertson et Meakin (1980) ont constaté le même phénomène chez *Brachystegia spiciformis*. En fait, les cellules de la stèle n'apparaissent pas plasmolysées. Ceci suggère que les parois des cellules du cortex continuent à s'allonger non pas par turgescence, mais vraisemblablement par un entraînement de la part des cellules de la stèle qui s'allongeraient normalement.

En conclusion des effets du nickel sur la structure du maïs, il apparaît que Ni retarde la croissance en inhibant la division et la différenciation cellulaire au niveau des racines, probablement à la suite d'une inhibition du transport des carbohydrates des feuilles vers les racines. Les résultats de cette étude nous permettent de penser que le principal site d'action du nickel se situe dans les feuilles, en inhibant le transport des carbohydrates à ce niveau. La différence de sensibilité entre les cultivars pourrait alors provenir de différences de teneurs en nickel des feuilles. À partir de ces résultats et de ceux d'autres études (Rauser, 1978; Samarakoon et Rauser, 1979; Moya *et al.*, 1993), on peut penser que l'accumulation d'amidon dans les feuilles puisse servir de marqueur d'intoxication d'une plante par le nickel.

#### *Action du nickel sur l'activité des peroxydases*

Une stimulation de l'activité peroxydase est considérée comme une réponse du métabolisme des végétaux supérieurs lorsqu'ils sont en situation de stress, tel que le froid, l'hypoxie, la sécheresse, une infection, une blessure, ou encore un statut ionique anormal (carence ou toxicité) (Gaspar *et al.*, 1982; Castillo, 1986; Siegel et Siegel, 1986).

Une plante exposée à des excès de nickel présente également une augmentation de l'activité peroxydase (Pandolfini et Maier, 1985; Gabbrielli *et al.*, 1990; Karataglis *et al.*, 1991; Pandolfini *et al.*, 1992; Pandolfini et Gabbrielli, 1993). Certaines de ces études relient l'augmentation de l'activité à une diminution de la croissance et suggèrent que les peroxydases peuvent être utilisées efficacement comme marqueurs de stress causé par Ni (Pandolfini *et al.*, 1992). Cependant, ces travaux se limitent généralement au dosage de l'activité contenue dans les racines et les parties aériennes, et aucun n'a tenté de préciser celle des apex racinaires, qui pourraient pourtant constituer un site privilégié d'action du nickel.

Dans cette étude, l'activité totale des peroxydases solubles a été déterminée au niveau des feuilles, de la base de la radicule et de l'apex racinaire de jeunes plantules de maïs (cv Hycorn 80 et XL 94) exposées au nickel (Fig. 6.12). On constate que l'apex racinaire est l'organe dont l'activité est la plus stimulée en présence de concentrations en Ni toxiques pour la croissance (entre 20 et 60  $\mu\text{M}$ ), et ceci uniquement sur le cultivar XL 94 sensible au nickel

(Fig. 6.12 e). Ces résultats suggèrent fortement que les principaux désordres physiologiques causés par des excès de nickel chez le maïs se situent au niveau des méristèmes racinaires.

Par ailleurs, l'évolution de l'activité a été suivie sur ces mêmes plantules entre le 2<sup>e</sup> et le 8<sup>e</sup> jour (Fig. 6.12), moment où le ralentissement de la croissance en longueur des racines commence à être détectable. On constate que l'augmentation de l'activité au niveau de la base et, surtout, de l'apex de la racicule de XL 94 est importante seulement après 8 jours de croissance, et à partir de 40  $\mu\text{M}$ . Pourtant, les figures 4.7 et 4.8 ont montré que la croissance de XL 94 est nettement ralentie après 4 jours avec 60  $\mu\text{M}$  de Ni. Par conséquent, il apparaît que les peroxydases solubles ne constituent pas des marqueurs précoces de stress causé par Ni chez le maïs.

De plus, on constate qu'avec 60  $\mu\text{M}$  de Ni au 8<sup>e</sup> jour, l'activité au niveau de l'apex de XL 94 augmente très fortement (+ 500 % ; Fig. 6.12 e) en même temps qu'apparaît un brunissement à ce niveau. Une augmentation de l'activité polyphénol-oxydase (PPO) n'est donc pas à exclure, à moins qu'il ne s'agisse d'une décompartmentation de certains constituants cellulaires permettant aux PPO d'oxyder des composés phénoliques sans qu'il n'y ait d'activation enzymatique. Ceci est plausible dans la mesure où il a été montré que Ni pouvait dégrader la membrane plasmique. Finalement, ce résultat soutient l'hypothèse d'un désordre majeur au niveau de l'apex racinaire, ce que tend à confirmer l'inhibition de la division cellulaire observée précédemment.

En conclusion de ce paragraphe, il ressort que Ni, à des concentrations toxiques pour la croissance du maïs, induit de nombreux désordres physiologiques et que plusieurs mécanismes sont susceptibles d'intervenir dans la toxicité :

- le ralentissement de l'absorption des éléments, suite à une inhibition de l'activité de l'ATPase pompe à protons du plasmalemmes et à une dégradation de l'intégrité de la membrane plasmique ;
- une diminution importante de la teneur en eau des parties aériennes ;
- l'inhibition de la division cellulaire au niveau des méristèmes racinaires, vraisemblablement par blocage du transport des carbohydrates à partir des feuilles vers les racines ;
- un désordre majeur du métabolisme apical des racines révélé par les peroxydases.

### 6.3. LES MÉCANISMES PEU IMPLIQUÉS DANS LA TOXICITÉ DU NICKEL SUR LE MAÏS

Ce paragraphe rend compte de quelques expériences dans lesquelles le nickel a eu peu d'effets. Bien que n'ayant pas été approfondies, il nous a semblé intéressant de présenter ici leurs résultats. C'est ainsi que nous avons recherché une éventuelle action inhibitrice de Ni sur la photosynthèse, action dont la littérature fait souvent état. De même, l'effet inhibiteur du Ni sur la croissance en longueur des tiges et des racines nous a conduit, faute de pouvoir analyser le taux d'auxine, à rechercher une éventuelle activation de l'AIA-oxydase. Enfin, nous avons étudié une action possible de Ni, en tant que traumatisme chimique, sur la production de l'éthylène, hormone de stress intervenant dans la croissance.

#### 6.3.1. Conditions expérimentales

Les expériences ont porté sur de jeunes plants de maïs. Leurs détails sont précisés au début de chaque paragraphe de la partie résultats, ainsi que sur les tableaux plus brièvement. On se rapportera au chapitre 2 pour les techniques d'analyses, de mesures et d'observations.

#### 6.3.2. Résultats

##### *Action du nickel sur la photosynthèse*

La photosynthèse a été mesurée sur des plants de maïs de 35 jours cultivés sur sol mélangé à différentes quantités de  $\text{NiCl}_2$ . Le nombre de feuilles dégainées variait de 5 à 7 suivant la dose de Ni. Les mesures ont porté sur la 5<sup>e</sup> feuille (complètement développée). La conductance stomatique a été également déterminée sur la même feuille.

On constate (tableau 6.5) que la photosynthèse des plants fortement intoxiqués (hauteur diminuée de 40 %) n'est pas significativement différente de celle du témoin. Par contre, la conductance stomatique augmente fortement avec l'intoxication.

La conductance stomatique étant proportionnelle à l'ouverture stomatique, nous avons calculé le rapport Photosynthèse / Conductance afin d'estimer l'efficacité de la photosynthèse. En d'autre terme, une ouverture stomatique importante devrait s'accompagner d'une meilleure assimilation de  $\text{CO}_2$  donc d'une photosynthèse plus forte. On constate que ce rapport diminue très nettement quand l'intoxication augmente, suggérant une diminution de l'efficacité de la photosynthèse, ou de l'efficacité de l'assimilation du  $\text{CO}_2$ .

**Tableau 6.5. Effet du nickel sur la photosynthèse et la conductance stomatique du maïs XL 94.** Les plants ont été cultivés pendant 34 jours sur un sol équilibré contenant différentes concentrations de NiCl<sub>2</sub>. Les valeurs sont les moyennes ± leurs écarts-types calculés sur 10 mesures par plant.

	Ni (mg.kg <sup>-1</sup> )		
	0	125	250
Réduction de la croissance en hauteur (%)	0	- 16	- 40
Photosynthèse nette (μmol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )	11,82 ± 1,45	11,24 ± 1,35	10,55 ± 0,86
Conductance stomatique (mol.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )	0,49 ± 0,03	0,60 ± 0,05	0,88 ± 0,08
Photosynthèse / Conductance	24,12	18,73	11,99

#### *Action du nickel sur l'activité AIA-oxydase*

L'effet de Ni sur l'activité AIA-oxydase a été étudié sur de jeunes plantules de maïs XL 94 cultivées pendant 8 jours sur solution contenant différentes concentrations toxiques de NiCl<sub>2</sub>. La croissance des racines étant davantage affectée que celle des parties aériennes, le dosage a porté sur la fraction soluble obtenue à partir des racines (cf. § 2.5.1).

On constate (tableau 6.6) que l'activité n'apparaît pas modifiée chez les plants exposés au nickel.

**Tableau 6.6. Effet du nickel sur l'activité AIA-oxydase des extraits solubles des racines de maïs XL 94.** Les plants ont été cultivés pendant 8 jours sur solution de Hoagland diluée au quart et contenant différentes concentrations de NiCl<sub>2</sub>. Les valeurs d'activité sont les moyennes ± leurs écarts-types calculés sur 3 répétitions.

	Ni (μM)			
	0	20	40	60
Inhibition racinaire (%)	0	0	- 17	- 55
Activité (nkat.g <sup>-1</sup> MF)	1,5 ± 1,5	1,1 ± 1,0	2,5 ± 1,7	1,9 ± 1,5

#### *Action du nickel sur la synthèse d'éthylène*

L'effet de Ni sur la production d'éthylène a été étudié sur des plantules entières de maïs XL 94 et Hycorn 80 cultivées sur milieu nutritif gélosé, contenant différentes concentrations toxiques de NiCl<sub>2</sub>.

Le tableau 6.7 montre que la production d'éthylène ne semble ni diminuer, ni augmenter en présence de concentrations toxiques de Ni dans le milieu.



**Tableau 6.7. Effet du nickel sur la synthèse d'éthylène par le maïs XL 94.** Les plants ont été cultivés pendant 8 jours sur milieu gélosé (agar), préparé avec la solution de Hoagland diluée au quart et contenant différentes concentrations de NiCl<sub>2</sub>. Les mesures ont été faites au 8<sup>e</sup> jour après fermeture des flacons pendant 8 heures. Les valeurs sont les moyennes ± leurs écarts-types calculés sur 4 répétitions.

	Ni (μM)		
	0	100	200
Inhibition racinaire (%)	0	- 33	- 75
C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> produit (nl.h <sup>-1</sup> .plt <sup>-1</sup> )	0,5 ± 0,4	1,1 ± 0,8	0,6 ± 0,4

### 6.3.3. Discussion et conclusion

#### *Action du nickel sur la photosynthèse*

Une inhibition de la photosynthèse est souvent rapportée comme une action majeure des métaux lourds sur les végétaux (Clijsters et Van Assche, 1985; Sheoran *et al.*, 1990; Bishnoi *et al.*, 1993a; Ferretti *et al.*, 1993). Le but de cette expérience est donc de déterminer si une diminution de la photosynthèse peut intervenir dans le ralentissement de la croissance du maïs exposé à des excès de nickel.

Le tableau 6.5 montre que le nickel présent à des doses toxiques pour la croissance du maïs ne diminue pas la photosynthèse. Toutefois, celle-ci a besoin d'une ouverture stomatique plus importante que celle du témoin pour rester au même niveau. Ceci suggère que l'assimilation du CO<sub>2</sub> est moins efficace chez les plants intoxiqués. Chez le maïs, plante à cycle photosynthétique en C<sub>4</sub> typique, le CO<sub>2</sub> est assimilé en premier lieu au niveau des cellules du mésophylle avant d'être transféré sous forme de malate et d'aspartate aux cellules de la gaine périvasculaire, si bien que ce résultat suggère un désordre dans l'assimilation du CO<sub>2</sub> au niveau des cellules du mésophylle. Pourtant, l'accumulation d'amidon dans les chloroplastes des cellules de la gaine périvasculaire (Figs. 6.11) est en faveur d'un fonctionnement apparemment normal de la photosynthèse, d'ailleurs supporté par la mesure de la photosynthèse nette (tableau 6.5) qui est réalisée par le suivi de la diminution du taux de CO<sub>2</sub> dans la chambre contenant la feuille. La première fixation du CO<sub>2</sub> et la synthèse de malate et d'aspartate dans les cellules du mésophylle ne seraient donc pas inhibées, de même que le transfert de ces molécules, l'incorporation de CO<sub>2</sub> et le fonctionnement du cycle de Calvin dans les cellules de la gaine périvasculaire. Par contre, étant donné les déformations des structures chloroplastiques, vraisemblablement dues à l'accumulation considérable d'amidon (Fig. 6.11), on peut penser que ce sont les chloroplastes des cellules de la gaine périvasculaire qui sont affectés par Ni. Le nickel pourrait alors inhiber la translocation

triose-phosphates / Pi au niveau de la membrane chloroplastique, par inhibition du translocateur membranaire impliqué ou par carence induite en Pi dans le cytoplasme de ces cellules. Une autre possibilité est que Ni pourrait empêcher la dégradation de l'amidon par l'inhibition d'une enzyme impliquée très tôt dans sa dégradation, telles que les amylases ou la phosphorylase. Il s'en suivrait alors une carence en saccharose, tel que cela a été fortement suggéré dans le paragraphe précédent.

Le fait que la photosynthèse ne soit pas inhibée par des concentrations toxiques de nickel peut paraître assez surprenant. En effet, les travaux traitant de la diminution de la photosynthèse causée par Ni sont nombreux (Sheoran *et al.*, 1990; Bishnoi *et al.*, 1993a). Cependant, la plupart des études sont réalisées sur des chloroplastes isolés (Tripathy *et al.*, 1981; Krupa *et al.*, 1993) ou des enzymes auxquels sont rajoutés les métaux (Sheoran *et al.*, 1990), ou encore sur des feuilles excisées exposées à une solution contenant le métal étudié (Bazzaz *et al.*, 1974; Clijsters et Van Assche, 1985), si bien qu'on ne peut pas répondre à cette question essentielle : est-ce que le ralentissement de la croissance du plant causée par des excès de nickel est due à une inhibition de la photosynthèse ? Les études réalisées sur plantes entières sont plus récentes et moins nombreuses. En outre, plusieurs d'entre elles ne prennent pas en compte les effets du nickel sur la croissance de la plante (Sheoran *et al.*, 1990; Bishnoi *et al.*, 1993a). Cette discussion met en évidence la difficulté de la comparaison des informations provenant de différentes études. Nos résultats méritent donc d'être confirmés, même si Carlson *et al.* (1975) ont montré également que Ni, à une concentration de 80  $\mu\text{M}$  en solution de Hoagland, modifiait peu la photosynthèse chez le maïs.

Notons qu'une augmentation de la conductance stomatique, c'est-à-dire de l'ouverture des stomates, devrait conduire à une augmentation de la transpiration, ce que ne confirme pas le tableau 6.4. Cela pourrait provenir d'une diminution de la poussée radiculaire (cf. Fig. 6.13). Ainsi, la non-modification de la transpiration chez les plants intoxiqués pourrait être la résultante des actions opposées d'une plus grande ouverture stomatique associée à une plus faible poussée radiculaire. De plus, ceci rend bien compte de la diminution de la teneur en eau des parties aériennes constatée précédemment.

#### *Action du nickel sur l'activité AIA-oxydase*

L'AIA-oxydase est une peroxydase intervenant dans la régulation du catabolisme de l'AIA (acide indole-acétique, ou auxine) et par conséquent du taux d'auxine libre endogène (Barceló et Muñoz, 1992; Siegel, 1993). Elle est donc directement impliquée dans la régulation de la croissance des végétaux. Le but de cette expérience est donc de déterminer son activité chez les plants de maïs exposés à des excès de nickel, afin de préciser son intervention éventuelle dans le ralentissement de la croissance causé par Ni.

Le tableau 6.6 montre que l'activité AIA-oxydase n'apparaît pas modifiée chez les plants exposés au nickel. Il est possible que la très forte variabilité des résultats puisse masquer un éventuel effet. Cependant, cette variabilité provient du fait que les activités sont très faibles, certaines mesures ayant même montré l'absence totale d'activité sur le temps utilisé (1 heure). L'activité de l'enzyme n'est donc manifestement pas augmentée en présence de Ni.

Néanmoins, il a été montré que la plus forte concentration d'AIA se trouve au niveau des tissus méristématiques (cf. Siegel, 1993). Par conséquent, le dosage ayant été réalisé sur le système racinaire total, il est possible qu'un éventuel effet ait été dilué. Il serait donc souhaitable de préciser l'activité AIA-oxydase au niveau du méristème racinaire des plants intoxiqués par Ni, d'autant plus que le paragraphe 6.2 a mis en évidence une forte activation des peroxydases totales à ce niveau, ce qui suggère que l'AIA pourrait avoir été dégradé dans les tissus méristématiques.

#### *Action du nickel sur la synthèse d'éthylène*

L'éthylène (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) est un régulateur endogène de la croissance, du développement et de la sénescence chez les végétaux (Yang et Hoffman, 1984). Certains métaux peuvent activer sa production, comme Cd (Fuhrer, 1982), ou Cu et Zn (Gora et Clijsters, 1989), tandis que d'autres peuvent l'inhiber, comme Ni et surtout Co (Lau et Yang, 1976a; Roustan *et al.*, 1989; Pennazio et Roggero, 1992). Le but de cette expérience est de déterminer si la diminution de la croissance du maïs exposé au nickel peut être due à une variation dans la synthèse d'éthylène.

La production de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> n'est pas modifiée chez le plant intoxiqué par Ni (tableau 6.7). Mais les résultats sont difficiles à interpréter du fait d'une grande variabilité intra-traitement. Cela pourrait provenir du matériel végétal : la synthèse d'éthylène par un plant entier dépend en effet probablement de la synthèse propre à chaque organe.

Les effets de Ni sur la synthèse d'éthylène par les végétaux ont été peu étudiés. Lau et Yang (1976b) ont montré que Ni inhibe sa production par les segments d'hypocotyle de haricot, ainsi que par les feuilles de soja (Pennazio et Roggero, 1992) en diminuant l'activité EFE (Ethylene-Forming Enzyme, ou ACC-oxydase). À notre connaissance, aucune étude n'a encore porté sur des plants entiers.

Il a été montré que la dernière étape de la synthèse d'éthylène (conversion d'ACC\* en C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) impliquerait une enzyme liée à une membrane et nécessitant l'intégrité structurale de cette membrane (Odawara *et al.*, 1977; Apelbaum *et al.*, 1981). De plus, Fuhrer (1982) a montré que la synthèse de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> par les feuilles de haricot était activée dans les premières heures d'exposition au cadmium (100 µM), mais qu'au-delà de 8 h la synthèse diminuait nettement. Ils ont attribué cette diminution à une dégradation du plasmalemme. Ainsi, dans le

---

\* ACC : acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique

cas présent, on peut penser que Ni a désorganisé l'intégrité membranaire chez le maïs pendant les 8 jours d'exposition (fortement suggéré précédemment), au point de diminuer la conversion d'ACC en  $C_2H_4$ . Dans la mesure où la production paraît également faible chez le témoin (tableau 6.7) cette hypothèse permettrait de rendre compte de l'absence apparente d'effet de Ni sur la production d'éthylène. Par contre, il est possible que Ni puisse agir au cours des premières étapes de sa biosynthèse, Pennazio et Roggero (1992) ayant montré, en plus de l'inhibition de l'ACC-oxydase, une activation de la synthèse d'ACC dans les feuilles de soja exposées à Ni.

En conclusion, le ralentissement de la croissance du maïs causé par des excès de nickel n'apparaît pas être dû à une inhibition importante ni de la photosynthèse, ni de l'activité AIA-oxydase, ni de la production d'éthylène.

#### 6.4. LES MÉCANISMES DE RÉSISTANCE AU NICKEL

Ce paragraphe présente des résultats visant à tenter d'expliquer les différences de sensibilité au nickel entre les cultivars de maïs XL 94 (Ni-sensible) et Hycorn 80 (Ni-tolérant).

##### 6.4.1. Conditions expérimentales

Nous avons tout d'abord déterminé les teneurs en nickel de leurs racines et de leurs parties aériennes au stade de jeune plant.

Dans un second temps, les acides organiques ont été analysés sur ces mêmes organes, la littérature indiquant souvent leur implication dans la résistance aux métaux toxiques.

Enfin, l'activité peroxydase, dosée avec la syringaldazine et impliquée dans la lignification, a été déterminée au niveau des apex racinaires, de la base de la racine et des parties aériennes des deux cultivars. L'apex racinaire (l'extrémité sur 6 à 7 mm), la base de la racine (entre 1 et 2 cm du collet), ainsi que le milieu du limbe de la seconde feuille (sur 1 cm) ont été prélevés sur 6 plants afin de constituer les échantillons moyens. Les analyses, telles qu'elles sont décrites au paragraphe 2.5, ont porté sur les fractions solubles et ioniques de ces échantillons.

Les plantules de maïs XL94 et Hycorn 80 ont été cultivées sur solution de Hoagland diluée au quart. Rappelons que leur différence de sensibilité au nickel a été mise en évidence antérieurement (cf. Fig. 4.7 et 4.8).

Les concentrations en nickel dans la solution ont été choisies de façon à causer une diminution, modérée à forte, de la croissance des deux cultivars de maïs, c'est à dire entre 20 et 65  $\mu\text{M}$ .

#### 6.4.2. Résultats

##### *Teneurs en Ni dans les racines et les parties aériennes des deux cultivars*

La teneur en nickel dans les racines et les parties aériennes des deux cultivars de maïs a été déterminée après 12 jours de croissance sur solution. Le tableau 6.8 montre que les teneurs en Ni dans les parties aériennes et, surtout, dans les racines augmentent quand la concentration en Ni augmente dans la solution. Cependant, on constate des différences de teneurs importantes entre les deux cultivars : avec les faibles concentrations en Ni en solution, les racines de XL 94 en contiennent davantage que celles de Hycorn 80, tandis que c'est l'inverse qui apparaît avec des solutions de concentrations supérieures à 50  $\mu\text{M}$ . Dans ce cas, les racines de Hycorn 80 atteignent des teneurs très élevées (près de 4000  $\mu\text{g.g}^{-1}$  MS) alors que leur croissance est moins affectée que celles de XL 94.

Au niveau des parties aériennes, celles de Hycorn 80 contiennent toujours moins de Ni que celles de XL 94. Cependant, les différences sont faibles avec 65  $\mu\text{M}$  de Ni.

**Tableau 6.8. Teneurs en nickel dans les plantules de maïs XL 94 et Hycorn 80.** Les plants ont été cultivés pendant 12 jours sur solution de Hoagland diluée au quart, contenant différentes concentrations en  $\text{NiCl}_2$ . Les analyses ont porté sur des lots de 15 à 20 plants. Le pourcentage de croissance par rapport au témoin est déterminé sur les poids de matière sèche des plants. Les valeurs sont les moyennes calculées sur 3 répétitions.

	XL 94				HYCORN 80			
	Ni ( $\mu\text{M}$ )	Croissance (%)	Teneurs en Ni $\mu\text{g.g}^{-1}$ MS ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MS)		Croissance (%)	Teneurs en Ni $\mu\text{g.g}^{-1}$ MS ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MS)		
Racines	0	100	19	(0,3)	100	16	(0,3)	
	20	100	1290	(22,0)	103	535	(9,1)	
	50	54	1455	(24,8)	86	1660	(28,3)	
	65	31	1780	(23,5)	53	3800	(64,7)	
Parties aériennes	0	100	4	(0,07)	100	4	(0,07)	
	20	100	71	(1,2)	100	52	(0,9)	
	50	63	125	(2,1)	98	70	(1,2)	
	65	40	136	(2,0)	92	130	(2,2)	

*Teneurs en acides organiques des deux cultivars*

Chez XL 94, l'augmentation de la concentration en Ni de 0 à 60  $\mu\text{M}$  se traduit par une augmentation de 23,7 % de la teneur totale en acides organiques dans les racines (tableau 6.9). Chez Hycorn 80, la teneur en acides organiques augmente de 70,8 % dans les racines. Ces augmentations sont dues pour une grande part à celles de la teneur en malate. Par contre, les teneurs varient peu dans les parties aériennes chez les deux cultivars.

**Tableau 6.9. Effet du nickel sur les teneurs en acides organiques, exprimées en  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  MS, des racines et des parties aériennes des maïs XL 94 et Hycorn 80.** Les plants ont été cultivés pendant 12 jours sur solution de Hoagland diluée au quart et contenant différentes concentrations de  $\text{NiCl}_2$ . Le pourcentage de croissance (Croiss.) par rapport au témoin est déterminé sur les poids de matière sèche des plants. Les analyses ont porté sur des échantillons de 12 plants.

	Ni ( $\mu\text{M}$ )	Croiss. (%)	Malate	Citrate	Iso- citrate	Cis- aconitate	Trans- aconitate	Malonate	Oxalate	TOTAL
<b>XL 94 :</b>										
Racines	0	100	9,2	9,4	0,9	0,2	0,2	0,4	5,3	25,6
	20	102	10,8	16,6	1,8	0,2	1,1	0,4	3,0	33,9
	40	75	13,6	11,1	0,7	0,2	0,5	0,5	2,7	29,3
	60	40	17,8	9,4	0,5	0,2	0,5	0,7	2,6	31,7
Parties aériennes	0	100	39,8	14,3	18,8	6,5	53,4	0,7	9,3	142,8
	20	98	47,8	14,7	19,3	6,6	54,9	1,7	9,9	154,9
	40	80	42,7	11,3	16,9	5,7	45,3	0,9	8,7	131,5
	60	48	45,9	12,8	17,2	5,7	46,7	0,7	7,5	136,5
<b>Hycorn 80 :</b>										
Racines	0	100	11,9	11,2	0,6	0,2	0,9	1,1	3,6	29,5
	20	104	10,8	7,6	0,6	0,2	3,0	0,8	4,0	27,0
	40	100	11,9	10,3	0,3	0,2	6,5	0,8	5,1	35,1
	60	72	26,2	13,4	2,2	0,2	2,1	1,8	4,5	50,4
Parties aériennes	0	100	32,0	11,8	18,8	4,5	39,3	1,1	8,5	116,0
	20	102	38,0	16,1	11,7	5,2	49,7	1,1	8,9	130,7
	40	100	38,5	11,5	14,0	5,0	40,9	1,1	6,8	117,8
	60	98	31,6	11,3	14,8	5,0	43,6	1,4	7,6	115,3

### *Activité peroxydase impliquée dans la lignification chez les deux cultivars*

L'activité peroxydase utilisant la syringaldazine comme substrat (S-peroxydase), et correspondant aux peroxydases impliquée dans la lignification des parois cellulaires, a été déterminée sur les fractions solubles et ioniques des apex racinaires, des bases de radicule et des feuilles des deux cultivars de maïs. La fraction soluble contient les peroxydases non liées de l'espace libre et du cytoplasme, tandis que la fraction ionique contient les peroxydases liées aux parois par force ionique.

On constate (Fig. 6.14) que seules les racines du cultivar XL 94 (Ni-sensible) montrent une augmentation de l'activité S-peroxydase soluble au niveau des racines et surtout de l'apex (Fig. 6.14 c, e). Remarquons que l'activité au niveau de la base de la radicule est nettement supérieure chez le témoin de Hycorn 80 (environ  $72 \Delta\text{DO}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de protéines) que chez le témoin de XL 94 ( $48 \Delta\text{DO}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de protéines) (Fig. 6.14 c, d).

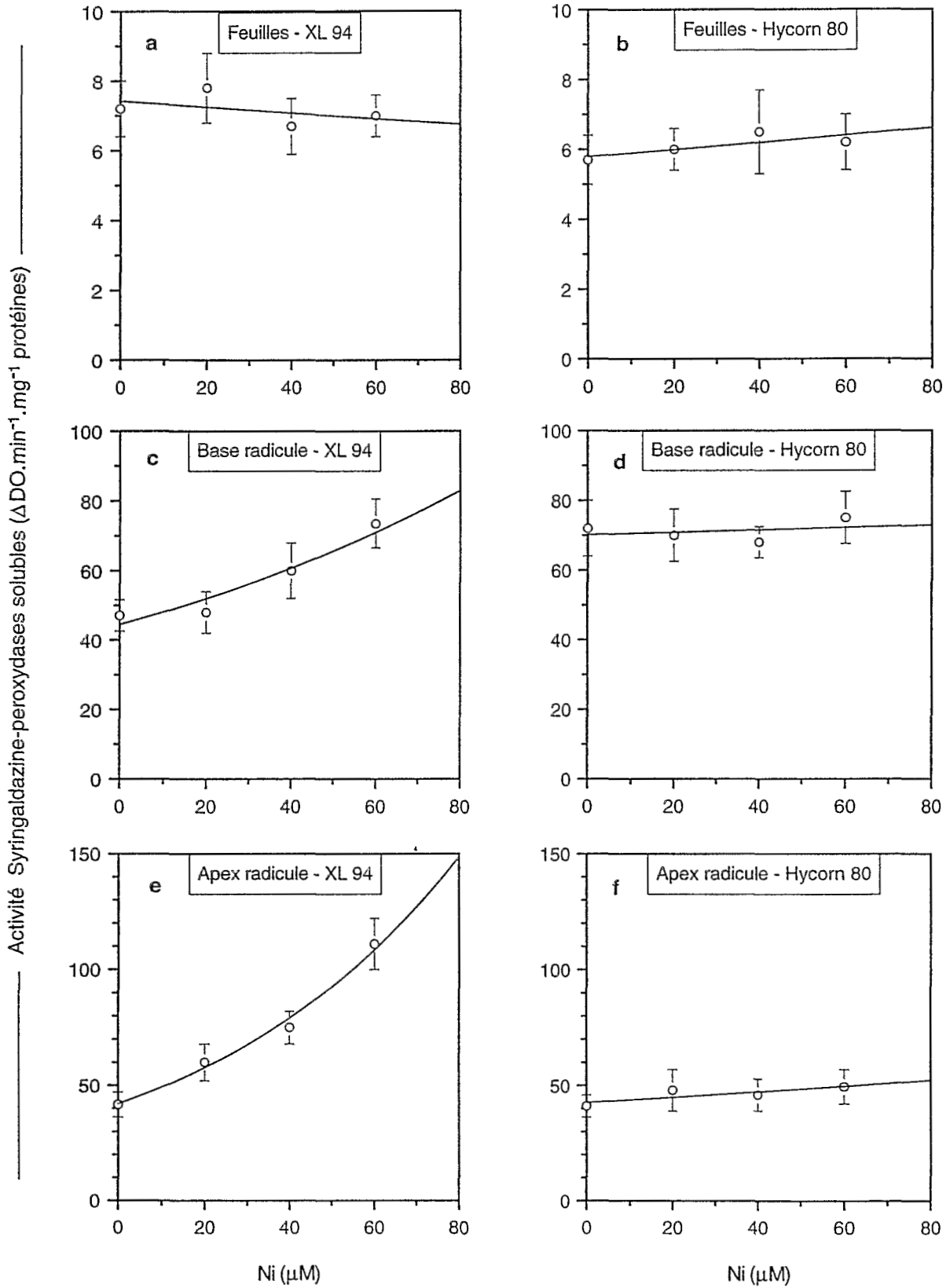
L'activité S-peroxydase ionique (Fig. 6.15) montre les mêmes variations que sur la fraction soluble : l'activité du cultivar XL 94 augmente nettement au niveau de la base et de l'apex de la radicule, tandis que celle de Hycorn 80 varie peu, hormis une faible augmentation au niveau de la base de la racine.

Par ailleurs, la figure 6.16, qui est le résultat de la séparation par l'électrophorèse des différentes formes de peroxydases solubles dosées avec le gaïacol (activité totale), montre que Ni n'induit pas de variations dans le nombre de ces formes, indiqué par le nombre et la position invariable des bandes (Fig. 6.16). Toutefois, on constate que les activités dans les racines du cultivar XL 94 sont globalement plus fortes en présence de nickel. De plus, on constate au niveau des racines qu'une forme acide est nettement plus active chez le témoin de Hycorn 80 que chez le témoin de XL 94 (Fig. 6.16, flèches).

### **6.4.3. Discussion et conclusion**

Les figures 4.7 et 4.8 du chapitre 4 ont montré que le cultivar de maïs XL 94 est plus sensible au nickel que le cultivar Hycorn 80. Cela se traduit par une diminution plus importante de la croissance en longueur des racines. Il nous a donc paru important de tenter de comprendre les origines des différences de sensibilité.

XL 94 s'est avéré capable d'absorber des quantités de nickel plus importantes que Hycorn 80 lorsque la concentration en Ni dans la solution est relativement faible ( $20 \mu\text{M}$ , cf. tableau 6.8). Cette différence essentielle entre les deux cultivars est vraisemblablement la cause majeure du ralentissement de la croissance des racines de XL 94 au-delà de  $20 \mu\text{M}$  de Ni. L'origine de cette absorption plus forte s'explique difficilement. Il est possible, toutefois, qu'elle provienne d'une plus grande affinité du transporteur à Ni de XL 94 ( $K_m = 13,3 \mu\text{M}$  pour XL 94,  $K_m = 15,0$  pour Hycorn 80; cf. § 6.1).



**Fig. 6.14.** Effet du nickel sur l'activité des peroxydases solubles dosée avec la syringaldazine, au niveau de différents organes des maïs XL 94 et Hycorn 80. Les plants ont été cultivés pendant 8 jours, sur solution de Hoagland diluée au quart, avec différentes concentrations de  $\text{NiCl}_2$ . Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  leurs écarts-types calculés sur 3 répétitions.



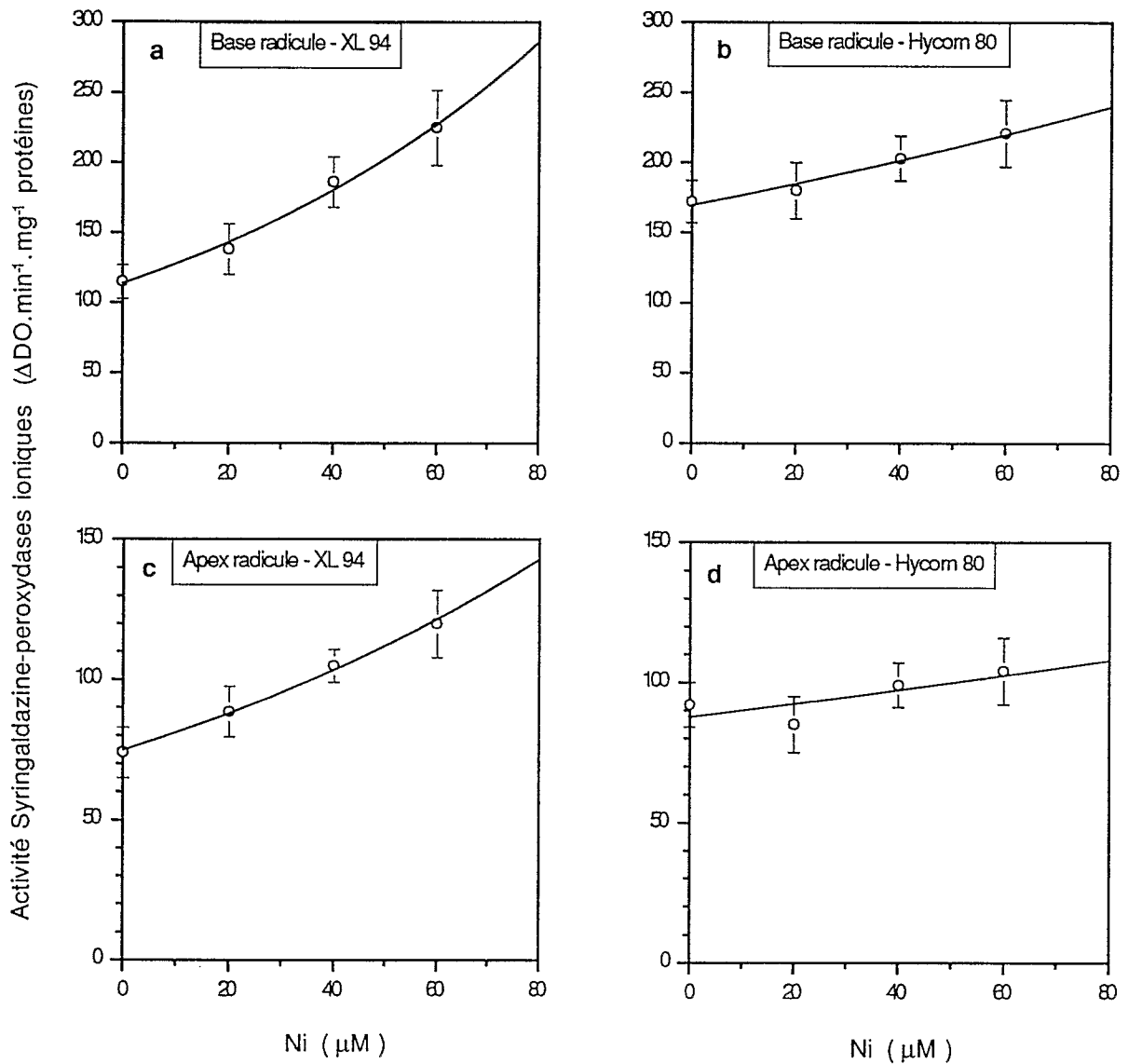
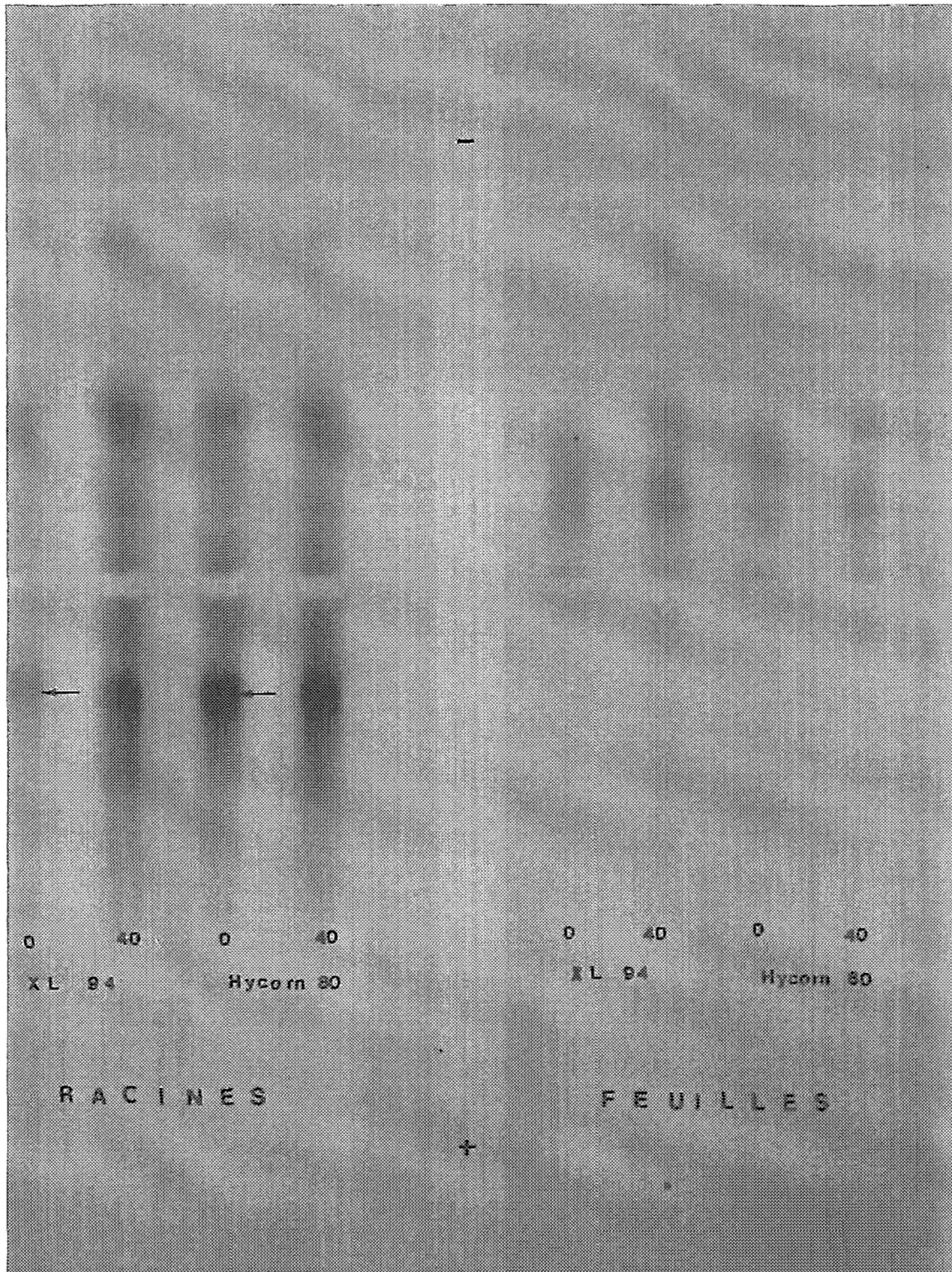


Fig. 6.15. Effet du nickel sur l'activité des peroxydases ioniques, dosée avec la syringaldazine, au niveau des racines de maïs XL 94 et Hycorn 80. Les plants ont été cultivés pendant 8 jours sur solution de Hoagland diluée au quart et contenant différentes concentrations de  $\text{NiCl}_2$ . Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  leurs écarts-types calculés sur 3 répétitions par traitement.



**Fig. 6.16.** Electrophorèse sur gel d'agarose d'isoperoxydases solubles révélées au gaiacol, extraites des racines et des parties aériennes des maïs XL 94 et Hycorn 80. Les plants ont été cultivés pendant 8 jours sur solution de Hoagland diluée au quart contenant 0 ou 40  $\mu\text{M}$  de  $\text{NiCl}_2$ . Environ 3  $\mu\text{g}$  de protéines ont été déposés dans les puits.

Par contre, à des concentrations plus fortes en Ni dans la solution (supérieures à 50  $\mu\text{M}$ , cf. tableau 6.8), le cultivar Hycorn 80 montre une capacité d'absorption très supérieure à XL 94, les teneurs en Ni des ses racines étant environ 2 fois plus fortes avec 65  $\mu\text{M}$  de Ni (3800  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MS chez Hycorn 80 contre 1780  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MS chez XL 94, cf. tableau 6.8). Pourtant, la croissance du cultivar Hycorn 80 est toujours supérieure à celle de XL 94. Cette différence remarquable suggère un piégeage du nickel, au moins en partie, sous une ou des forme(s) inactive(s) chez le cultivar Hycorn 80.

Il pourrait s'agir d'un mécanisme d'exclusion, telle qu'une fixation sur les parois cellulaires comme cela a été montré sur le tabac avec Mn et Cu (Wang *et al.*, 1992), ou d'un mécanisme de tolérance, tel qu'un stockage dans les vacuoles (McCain *et al.*, 1990) en association avec des acides organiques ou une complexation par des protéines de type phytochélatines (cf. synthèse bibliographique, chapitre 1, pages 11-12).

L'analyse des acides organiques contenus dans les racines et les parties aériennes des deux cultivars exposés au nickel (tableau 6.9) montre que leur teneur totale augmente nettement dans les racines, surtout chez le cultivar Hycorn 80 (23,8 % chez XL 94 et 70,8 % chez Hycorn 80). Ce cultivar disposerait par conséquent d'une plus grande capacité de complexation du nickel dans les racines, allant d'ailleurs de pair avec les fortes teneurs en Ni constatées (tableau 6.8). Il semble que le malate soit l'acide organique dont la synthèse est la plus activée en présence de Ni (tableau 6.9). Ce surplus de malate synthétisé pourrait être associé au nickel, comme le suggère leurs teneurs dans les racines (environ 20 à 60  $\mu\text{mol}$  de Ni.g<sup>-1</sup> MS pour 10 à 15  $\mu\text{mol}$  malate.g<sup>-1</sup> MS). Cette augmentation pourrait alors correspondre à une adaptation partielle de la plante à un milieu contenant du nickel en excès. Cela a été mis en évidence pour plusieurs espèces végétales hyperaccumulatrices de nickel : Ni est associé au malate dans les racines et les feuilles d'*Alyssum bertolonii* (Gabbrielli *et al.*, 1991), il est associé au citrate ou au malate dans les feuilles de plusieurs espèces accumulatrices en Nouvelle-Calédonie (Lee *et al.*, 1977, 1978; Kersten *et al.*, 1980), il est associé essentiellement au citrate et au malate dans les feuilles de *Dichapetalum gelonioides* (Homer *et al.*, 1991). Ainsi, les acides organiques pourraient également être synthétisés chez les végétaux non hyperaccumulateurs lorsqu'ils sont exposés au nickel, leur permettant de limiter l'apparition de la toxicité.

Cependant, entre 0 et 40  $\mu\text{M}$  de Ni, l'augmentation de la teneur en malate est plus forte chez le cultivar XL 94 que chez Hycorn 80 (tableau 6.9), alors que ce dernier est moins sensible au nickel. Par conséquent, cette augmentation ne peut rendre compte de la différence de tolérance au nickel des deux cultivars.

Il existe la possibilité d'une fixation de Ni sur les parois des cellules racinaires plus importante chez Hycorn 80. En effet, dans la mesure où l'on considère les lignines comme des fixateurs possible de Ni, on constate que les peroxydases à syringaldazine impliquées dans leur synthèse (Harkin et Obst, 1973; Imberty *et al.*, 1985) sont nettement plus actives en

l'absence de Ni chez Hycorn 80, que l'on prenne en compte les peroxydases solubles ou celles fixées de façon ionique à la paroi (Fig. 6.14 c, d et Fig. 6.15 a, b). Ainsi, en l'absence de nickel, les parois des cellules de la base de la racine, c'est à dire des tissus racinaires différenciés, seraient davantage lignifiées chez le cultivar Hycorn 80 que chez XL 94. Cette caractéristique pariétale pourrait procurer au cultivar Hycorn 80 la capacité de fixer préférentiellement Ni sur les composés constituant la paroi squelettique et de prévenir ainsi son passage travers le plasmalemme et par là même son action au niveau du métabolisme cellulaire. Cette hypothèse est supportée par les résultats du chapitre 5, lesquels ont montré, par analyse des tissus racinaires à la microsonde électronique, que Ni est fixé essentiellement sur l'endoderme du cultivar Hycorn 80, davantage que chez XL 94, et surtout au niveau des tissus différenciés, donc lignifiés. La figure 6.16 corrobore également cette interprétation, car ce sont les isoperoxydases acides qui sont impliquées dans la lignification (Mäder *et al.*, 1986) et l'activité de la première isoperoxydase acide est supérieure chez le témoin Hycorn 80 (Fig. 6.16 flèches). Cette hypothèse permettrait de rendre compte de la teneur en Ni plus faible dans les parties aériennes de Hycorn 80.

Par ailleurs, l'augmentation des activités S-peroxydases ioniques en présence de nickel au niveau de l'apex racinaire de XL 94 (Fig. 6.15 c) traduirait une augmentation de la lignification susceptible de diminuer l'extensibilité des parois cellulaires, et par là même de réduire l'élongation.

En conclusion, bien qu'une synthèse de malate semble activée en présence de Ni chez les deux cultivars de maïs, elle ne permet pas d'expliquer leur différence de sensibilité. Celle-ci pourrait provenir d'une lignification des racines précoce et plus intense chez le cultivar Hycorn 80 en l'absence de nickel, permettant de limiter l'absorption de Ni et son transfert vers les parties aériennes.

## 6.5. CONCLUSION

Les recherches relatées dans ce chapitre avaient comme premier objectif la caractérisation de l'absorption du nickel par le maïs. Leur résultat majeur est que, en plus d'une phase diffusive passive concernant le Ni absorbé dans l'espace libre, il existe une absorption active. Un tel résultat avait déjà été mis en évidence sur l'orge (Körner *et al.*, 1986), l'avoine (Aschmann et Zasoski, 1987) et le mimosa (Verlière et Heller, 1981). Il est donc possible qu'une absorption active du nickel puisse exister chez l'ensemble des végétaux supérieurs.

Un telle absorption suppose l'existence d'un transporteur protéique, donc d'un site saturable. L'inhibition compétitive de l'absorption de  $\text{Ni}^{2+}$  par  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$  suggère que Ni n'est pas absorbé par le biais d'un transporteur spécifique, mais que, au contraire, ces éléments sont absorbés par un ou des transporteurs communs donc peu spécifiques. D'après la littérature,  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  pourraient également être absorbés par le même transporteur que celui de  $\text{Ni}^{2+}$  (Cataldo *et al.*, 1978a). Ces résultats ont des conséquences pratiques importantes, car il implique que l'absorption de Ni puisse être fortement diminuée par la présence de cations divalents dans la rhizosphère, tels que Ca et Mg, voire Fe, Cu et Zn.

Le second objectif majeur de ces travaux était la caractérisation des effets toxiques du nickel sur la physiologie du maïs - se traduisant par un ralentissement général de la croissance, mais surtout des racines - afin de chercher à mettre en évidence un ou des mécanismes potentiels de toxicité. Il ressort que Ni, à des concentrations modérément à fortement toxiques pour la croissance du maïs, n'induit pas de diminution importante de la photosynthèse, pourtant souvent rapportée comme une action majeure des métaux. Ni ne semble pas non plus affecter le métabolisme de l'AIA et de l'éthylène, régulateurs endogènes de la croissance des végétaux. Par contre, des observations histologiques ont permis de constater que l'activité mitotique du méristème racinaire est fortement diminuée chez les plants intoxiqués. Leur faible index mitotique suffirait à rendre compte de la réduction de la croissance en longueur des racines. Un tel désordre au niveau méristématique est confirmé par une activité peroxydase particulièrement forte au niveau des apex racinaires.

Deux mécanismes potentiels paraissent intervenir dans l'inhibition de l'activité des méristèmes racinaires par Ni. Le premier serait une action directe du nickel au niveau des cellules méristématiques, comme l'indique sa concentration importante au niveau des apex mise en évidence au chapitre précédent. Néanmoins, une telle action demande d'être confirmée, car, à notre connaissance, une localisation du nickel dans les cellules méristématiques des racines n'a encore jamais été ni mise en évidence, ni précisée. Un second mécanisme serait un blocage du transport du saccharose à partir des feuilles vers les apex racinaires. On constate en effet une accumulation importante d'amidon dans les chloroplastes des cellules de la gaine périvasculaire en même temps qu'une absence apparemment totale de statolithes au niveau des cellules de la coiffe de la racine. Une déficience en carbohydrates, substrats majeurs de la respiration, au niveau des méristèmes pourrait diminuer la synthèse d'ATP et, par suite, tous les processus demandant de l'énergie, tels que les mitoses et les absorption actives d'ions. Même si une accumulation d'amidon dans les feuilles a déjà mise en évidence par d'autres auteurs (Rauser, 1978; Samarakoon et Rauser, 1979; Moya *et al.*, 1993), l'origine du blocage du transport du saccharose reste inconnu. Toutefois, l'accumulation d'amidon dans les chloroplastes de la gaine périvasculaire suggère qu'il existe un blocage dans la transformation de l'amidon en saccharose dans les cellules de la gaine périvasculaire.

Ce blocage pourrait provenir soit d'une inhibition des enzymes assurant la dégradation de l'amidon en glucose puis en triose-phosphates, soit d'une inhibition du translocateur assurant l'échange triose-phosphates / Pi sur la membrane chloroplastique, bloquant ainsi la possibilité de synthétiser le saccharose dans les cellules avant de l'exporter vers le phloème.

Un autre désordre physiologique important a été mis en évidence : il s'agit d'une inhibition de l'ATPase plasmalemmique pompe à protons des racines de maïs. Cette inhibition pourrait intervenir fortement dans l'apparition de la toxicité. En effet, la Force Motrice Protonique créée par l'efflux de protons résultant du fonctionnement de cette ATPase est responsable des transports actifs des éléments minéraux. Ainsi, l'inhibition de cette enzyme doit nécessairement diminuer l'absorption des éléments majeurs et de l'eau, et, par suite, la croissance et le développement de la plante. La rapidité de l'inhibition, mesurable après seulement 3 à 4 min de contact avec Ni, suggère une action du nickel directement au niveau du site catalytique de l'enzyme. Il serait souhaitable de préciser l'action du nickel sur l'ATPase plasmalemmique, aucune étude n'apportant de réponse déterminante à ce sujet.

S'agissant des différences de sensibilité au nickel entre les deux cultivars utilisés (XL 94 : Ni-sensible, et Hycorn 80 : Ni-tolérant), celles-ci ont été mises en évidence sur plusieurs paramètres. Ainsi, elles se traduisent par les effets suivants, plus importants chez le cultivar XL 94 :

- diminution de la croissance des racines ;
- diminution de la teneur en eau des racines et, surtout, des parties aériennes ;
- diminution de l'activité mitotique du méristème de la racine, observée en microscopie photonique ;
- augmentation de l'activité des peroxydases au niveau de l'apex racinaire,

Il était donc important de chercher à comprendre les mécanismes à l'origine de ces différences. Ainsi, il apparaît que le cultivar Hycorn 80 peut accumuler davantage de nickel que XL 94 tout en étant moins affecté dans sa croissance. Ceci suggère un piégeage du nickel sous une ou des formes peu actives. Une analyse des acides organiques n'a pas permis de mettre en évidence des différences de teneur entre les deux cultivars, même si le malate pourrait intervenir dans une diminution de la toxicité chez ces deux plantes. Par contre, il semble qu'une lignification précoce et plus intense chez Hycorn 80 puisse favoriser une fixation du nickel sur les parois cellulaires et limiter son transfert vers les parties aériennes. Cette fixation pourrait se situer au niveau des parois de l'endoderme des tissus racinaires différenciés, tel que cela a été montré dans le chapitre précédent. Cette différence de lignification entre les deux cultivars a été mise en évidence après seulement 8 jours de croissance en solution. Il serait par conséquent intéressant de suivre l'évolution de la lignification et de la toxicité au cours du développement des deux plantes.

## RÉSUMÉ

En plus d'une absorption passive, le maïs présente une phase active dans l'absorption du nickel. Le transporteur protéique impliqué permettrait le transport d'au moins Ni, Ca et Mg, mis en évidence par une inhibition compétitive de l'absorption de Ni par ces deux derniers éléments.

L'action toxique majeure du nickel chez le maïs apparaît être une inhibition de l'activité mitotique du méristème racinaire. Ni semble pouvoir agir, soit directement en se fixant préférentiellement au niveau de l'apex, soit indirectement en diminuant l'apport de saccharose au méristème par un blocage de la dégradation de l'amidon dans les gaines périvasculaires des feuilles.

Ni pourrait également diminuer fortement l'absorption des éléments majeurs par une inhibition de l'ATPase pompe à protons plasmalemmique des racines diminuant ainsi tous les transports actifs, et par une dégradation du plasmalemme permettant une fuite des ions.

Les différences de sensibilité au nickel des cultivars de maïs XL 94 (Ni-sensible) et Hycorn 80 (Ni-tolérant), mises en évidence au chapitre 4 par la mesure de la croissance, ont été confirmées par des différences d'activité du méristème racinaire et de teneur en eau de la plante.

La plus grande tolérance au nickel du cultivar Hycorn 80 aurait comme origine une lignification plus importante des parois différenciées des racines. Cette caractéristique pariétale pourrait procurer à ce cultivar la capacité de fixer préférentiellement Ni sur les parois squelettiques et de prévenir ainsi son passage à travers le plasmalemme et par là même son action au niveau du métabolisme cellulaire.





---

**CONCLUSION  
GÉNÉRALE**

---



## CONCLUSION GÉNÉRALE

Cette étude a été motivée par l'extraordinaire richesse en nickel des sols ferrallitiques ferritiques de Nouvelle-Calédonie. Les objectifs que nous nous étions fixés au départ concernaient principalement la caractérisation de la biodisponibilité du nickel dans ces sols et de ses effets sur le développement du maïs pris comme plante-test. Mais, très rapidement, les nombreuses questions soulevées sur la toxicité de Ni nous ont amené à tenter de comprendre les facteurs de variations et les mécanismes de l'action toxique du nickel chez le maïs.

Ainsi, s'agissant de la biodisponibilité du nickel dans les sols ferrallitiques ferritiques de Nouvelle-Calédonie, son étude révèle l'existence de variations très importantes suivant la position du sol dans le paysage et suivant l'horizon. Dans les sols de piedmont, le nickel présent est très peu mobile et très peu disponible pour la plante, que ce soit en surface ou en profondeur. Seule une très faible fraction échangeable, liée à la présence de matière organique, existe dans les horizons de surface. Dans ces conditions, les risques de phytotoxicité sont certainement faibles. Par contre, dans les sols de plaine, et surtout dans les horizons de profondeur (40-60 cm), la faible croissance du maïs, associée à des teneurs en Ni dans les parties aériennes relativement élevées ( $8,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MS au stade 9 feuilles dégainées) suggère que les risques de phytotoxicité sont élevés. La fraction de Ni biodisponible en plaine serait constituée de nickel lié à de la matière organique et à de la goethite.

Ce dernier point nous semble essentiel à préciser, étant donné l'extrême richesse de ces sols en oxydes de fer (de 50 à 75 %) susceptible de gouverner pour une grande part la mobilité et la biodisponibilité du nickel. En effet, il conduit à s'interroger sur l'évolution potentielle de la mobilité de Ni, non seulement dans les sols de plaine, mais aussi de piedmont sous l'influence des techniques culturales. Cette biodisponibilité ne pourrait-elle pas augmenter sous l'action acidifiante des racines, sous celle des engrais, des amendements organiques ou, plus simplement, de l'accroissement des résidus de végétation dus aux cultures ? Dans ces conditions, seul un suivi organisé et attentif de cette mobilité permettra de répondre à la question.

Par ailleurs, les problèmes soulevés par le nickel des sols ferrallitiques ferritiques du Sud calédonien pourraient concerner d'autres types de sols du Territoire. En effet, les massifs de roches ultrabasiqes, d'où provient Ni, influencent de nombreux sols en contrebas de ces massifs. Les vertisols et les sols bruns peuvent ainsi contenir plus de 0,3 % de nickel total. En outre, des expérimentations agronomiques sur vertisols hyper-magnésiens ont montré que le maïs en fin de cycle pouvait présenter des teneurs en Ni supérieures à  $15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MS dans ses parties aériennes (Bonzon *et al.*, 1991b). Par suite, la situation des cultures sur les

nombreux sols de Nouvelle-Calédonie, ou du monde, riches en nickel mériterait d'être étudiés.

Même si la présomption d'une intoxication du maïs par Ni dans les sols ferrallitiques ferritiques de plaine était très forte, le seul moyen que nous ayons eu de le vérifier était de définir rigoureusement le seuil de toxicité de Ni pour le maïs. Dans d'excellentes conditions nutritionnelles - sur un sol naturellement très fertile mais auquel on a ajouté du nickel -, celui-ci apparaît avec  $12 \pm 3 \mu\text{g.g}^{-1}$  MS dans les parties aériennes du maïs GH 5010, au stade 9 feuilles dégainées et mesurant 75 cm de haut au niveau de l'emplacement de la ligule de la dernière feuille dégainée. Dans ces conditions de milieu favorable, la croissance en hauteur au 34<sup>ème</sup> jour est diminuée de 14 %. Au même stade de développement, maïs cultivé sur un sol ferrallitique ferritique de plaine et peut-être très légèrement carencé en potassium, le même maïs se développe aussi lentement que celui intoxiqué sur le sol alluvial, mais avec seulement  $8,5 \mu\text{g}$  de Ni.g<sup>-1</sup> MS. Ainsi, le seuil défini plus haut pour des plants correctement alimentés en éléments majeurs pourrait-il être abaissé en cas de statut nutritionnel moins favorable. Ce point devra être vérifié.

De plus, nous avons constaté que la production de grains était plus affectée par Ni que la croissance. Le seuil toxique du nickel pourrait donc être inférieur si on tient compte de la production de la plante comme critère d'intoxication et non de sa croissance.

En culture hydroponique, un seuil indice de toxicité peut-être défini tenant compte des concentrations en nickel, calcium et magnésium. Basé sur les activités de ces éléments dans la solution, cet indice est le suivant :

$$I_{\text{tox}} = 100 \times \{ \text{Ni}^{2+} \} / ( \{ \text{Ca}^{2+} \} + \{ \text{Mg}^{2+} \} ).$$

Aucun symptôme d'intoxication n'apparaît sur le maïs lorsque que  $I_{\text{tox}} < 2$ . À notre connaissance, ces résultats sont les premiers à montrer la possibilité de définir un seuil de toxicité du nickel en solution qui fasse abstraction des variations de la composition minérale du milieu de culture. De même, il ne semble pas exister, hormis pour Al, d'indice de toxicité équivalent pour les autres métaux. Il serait intéressant d'expérimenter la validité de cet indice pour d'autres types de solutions nutritives et d'autres métaux.

Dans le cas des solutions de sol, il n'a pas été possible de définir une concentration toxique précise, celle-ci dépendant trop du type de sol. Néanmoins, dans le cas des sols ferrallitiques ferritiques, il est probable que des concentrations de l'ordre de  $0,7 \text{ mg.l}^{-1}$  soient légèrement toxiques. Par contre, même si les valeurs de  $I_{\text{tox}}$  en culture hydroponique ne concordent pas avec celles issues des solutions de sols, une échelle différente pour ces derniers pourrait vraisemblablement être définie à partir de la même formule. Si tel était le cas, nous disposerions alors d'une méthode intéressante pour diagnostiquer un risque de toxicité avant la mise en culture d'un sol.

S'agissant des effets toxiques du nickel sur le maïs, nous avons constaté un ralentissement nettement plus important de la croissance des racines que des parties aériennes, ce qui suggère une possible action toxique du nickel au niveau racinaire. Sur un cycle complet de végétation, le ralentissement de la croissance, même modéré, aboutit à une diminution significative de la production du maïs, essentiellement par une diminution du nombre de grains par épi. Le nickel pourrait alors soit perturber la fécondation, soit réduire le transfert des assimilats - sucres et/ou des acides aminés - de la source vers le puit que constitue le grain, ce qui serait en accord avec les résultats de Setia *et al.* (1988) sur le blé.

L'accumulation importante de nickel constatée au niveau des racines du maïs, au stade de plantule comme chez le plant plus âgé (70 à 90 % du Ni immobilisé), conforte l'hypothèse d'une action du nickel à ce niveau. L'utilisation de plusieurs techniques de localisation (autoradiographie, coloration par le diméthylglyoxime et par la méthode au sulfure d'argent) a permis de mettre en évidence une localisation préférentielle de Ni au niveau des apex racinaires. Ce résultat déterminant suggère que Ni puisse diminuer la croissance des racines en diminuant l'activité mitotique du méristème racinaire. Une diminution de l'index mitotique a d'ailleurs été confirmée par observation en microscopie photonique. Il est ainsi possible que Ni, fixé au niveau du méristème, puisse en perturber gravement le fonctionnement.

Les techniques de localisation utilisées, y compris l'analyse des rayons-X à la microsonde couplée à la microscopie électronique à balayage ou à transmission, n'ont cependant pas permis, par manque de sensibilité et de précision, d'affiner la localisation du Ni au niveau de l'apex racinaire. On peut penser qu'une localisation très fine du nickel dans ces méristèmes pourrait contribuer à comprendre son mode d'action à ce niveau. À cet égard, la SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry) pourrait être une technique pleine de promesses, sa limite de détection étant inférieure à  $1 \mu\text{g.g}^{-1}$  MS (voire de l'ordre de  $1 \text{ ng.g}^{-1}$  MS si l'échantillon est très plat) et la surface analysée de quelques  $\mu\text{m}^2$ .

Les observations histologiques ont montré que le maïs intoxiqué par Ni présente une accumulation considérable d'amidon dans les feuilles au niveau des chloroplastes des cellules des gaines périvasculaires. La photosynthèse ne serait donc pas inhibée, depuis l'incorporation du  $\text{CO}_2$  dans les cellules du mésophylle jusqu'à la formation d'amidon dans les cellules de la gaine périvasculaire, ce que tend à confirmer la mesure directe de la vitesse d'assimilation du  $\text{CO}_2$ . Par contre, l'absence d'amidon constatée dans les cellules de la coiffe de la racine, sous forme de statolithes, associée à son accumulation dans les cellules de la gaine périvasculaire suggère fortement un blocage de sa dégradation à ce niveau. Le nickel pourrait alors inhiber indirectement l'activité du méristème racinaire par une diminution de l'apport de carbohydrates. Cette hypothèse est d'ailleurs corrélée avec le faible remplissage des grains du maïs intoxiqué, suggérant une déficience générale dans le transfert des assimilats carbonés des sources vers les puits, qu'il s'agisse des grains, des méristèmes ou des statolithes.

Se pose alors la question de l'origine du blocage de la dégradation de l'amidon chloroplastique. Il peut s'agir d'une inhibition du translocateur de la membrane chloroplastique assurant l'échange triose-phosphates / Pi (et consécutivement la synthèse cytoplasmique du saccharose avant que d'être exporté par le phloème). Le fonctionnement de ce translocateur pourrait être inhibé soit en lui-même par Ni, soit par une carence de Pi cytoplasmique. Il pourrait également s'agir d'une inhibition d'une ou de plusieurs enzymes assurant la dégradation de l'amidon. Dans ce cas, l'inhibition concernerait probablement les enzymes impliquées dans les premières réactions de la dégradation de l'amidon, telles que les amylases et/ou la phosphorylase (on sait que cette dernière est inhibée par  $Al^{3+}$  qui bloque le Pi nécessaire à son fonctionnement en le précipitant sous forme  $(PO_4)_3Al_2$ ). L'hypothèse d'inhibitions enzymatiques est supportée par la présence relativement importante de nickel au niveau des chloroplastes des cellules de la gaine périvasculaire, laquelle a été mise en évidence par la méthode au sulfure d'argent. Toutefois, ces hypothèses demandent à être vérifiées, d'autant plus que de telles inhibitions n'apparaissent pas signalées dans la littérature (Van Assche et Clijsters, 1990).

Un désordre physiologique majeur que nous avons pu mettre en évidence tient à l'inhibition par Ni de l'ATPase plasmalemmique pompe à protons des racines de maïs. Cette inhibition pourrait intervenir fortement dans l'apparition de la toxicité. En effet, la Force Motrice Protonique créée par l'efflux de protons résultant du fonctionnement de cette ATPase est responsable de l'absorption et des transports actifs des éléments minéraux. Ainsi, une diminution de l'activité pompe à protons des ATPases du plasmalemme racinaire, à des concentrations en Ni toxiques pour la croissance, pourrait ralentir le développement de la plante par une diminution générale de l'absorption des éléments nutritifs majeurs, mais aussi par la moindre acidification de la paroi squelettique classiquement impliquée dans le processus d'élongation cellulaire. La rapidité de l'inhibition, mesurable après seulement 3 à 4 min de contact avec Ni, suggère une action du nickel directement au niveau du site catalytique de l'enzyme. Il serait donc souhaitable de préciser l'action du nickel sur l'ATPase plasmalemmique, aucune étude n'apportant de réponse déterminante à ce sujet.

En outre, nous avons pu montrer que le maïs présente une phase active dans l'absorption du nickel et que le transporteur protéique impliqué permettrait le transport d'au moins Ni, Ca et Mg mis en évidence par une inhibition compétitive de l'absorption de Ni par ces deux derniers éléments. Les conséquences pratiques de ces résultats sont importantes : ces derniers impliquent que l'absorption de Ni pourrait être fortement diminuée par la présence de cations divalents dans la rhizosphère, tels que Ca et Mg, voire d'autres éléments antagonistes. On constate d'ailleurs que les fortes applications d'amendements calciques sur les vertisols hyper-magnésiens, destinées initialement à réduire leur déséquilibre calcomagnésien,

contribuent dans le même temps à diminuer les teneurs en Ni dans les parties aériennes et les grains du maïs (Bonzon *et al.*, 1991b).

Par ailleurs, des différences significatives de sensibilité ont été mises en évidence entre deux cultivars de maïs, XL 94 étant sensible et Hycorn 80 tolérant. Elles pourraient provenir de différences de propriété de l'endoderme (composition chimique ou importance relative des cellules de passage). En effet, il ressort de nos observations que Ni se fixe essentiellement au niveau de l'endoderme différencié de la racine, et ce davantage chez Hycorn 80 que XL 94. Les formes fixées pourraient être en partie inactivées, conférant ainsi à Hycorn 80 la capacité de prévenir le passage du nickel à travers le plasmalemma et par là même son action au niveau du métabolisme cellulaire. Bien que les acides polygalacturoniques des lamelles moyennes des parois squelettiques soient probablement impliquées dans la fixation de Ni à ce niveau, le type de liaison reste inconnu et mériterait d'être précisé. Toutefois, l'activité peroxydase à syringaldazine, impliquée dans la lignification des parois squelettiques, est plus élevée chez Hycorn 80 que XL 94 en l'absence de Ni au niveau de la base de la racine, ce qui suggère que la plus grande tolérance au nickel du cultivar Hycorn 80 aurait comme origine une lignification constitutive plus importante des parois différenciées des racines. Un tel résultat mérite d'être confirmé, en particulier en suivant l'évolution de la lignification de ces deux cultivars au cours de leur développement.

Des différences de sensibilité au nickel encore plus importantes ont été constatées entre diverses espèces en culture sur solution : le haricot, la tomate et le squash sont apparus bien plus sensibles que le sorgho et plus encore que le maïs.

Il est possible que d'autres mécanismes de tolérance à Ni puissent entrer en jeu, telle qu'une excrétion spécifique d'acides organiques dans la rhizosphère, comme cela a été montré avec l'aluminium et le malate chez le blé (Delhaize *et al.*, 1993). Nous n'avons pas pu corrélérer nettement une plus grande résistance à la toxicité au nickel à une plus grande synthèse d'acides organiques, alors que la littérature fait parfois état de ce mécanisme de détoxification. Par ailleurs, la corrélation élevée entre la teneur en nickel et en soufre, mise en évidence dans cette étude par la microsonde électronique, suggère une complexation de Ni avec des protéines soufrées, tel que cela a été montré pour d'autres métaux, en particulier Cd, avec les phytochélatines (Gupta et Goldsbrough, 1991; Obata et Umebayashi, 1993). Cependant, il semble qu'une liaison Ni-phytochélatine n'ait encore jamais été mise en évidence et cela mériterait d'être vérifié.

La compréhension de tels mécanismes de résistance au nickel, et aux métaux lourds en général, est d'un très grand intérêt. Elle doit, en effet, permettre de raisonner la recherche d'espèces végétales tolérantes au nickel pour des sols riches en cet élément, naturellement ou artificiellement par suite de pollution.

Sur un plan pratique plus immédiat, les tests de sensibilité au nickel en culture sur solution offrent la possibilité à la recherche appliquée de sélectionner les espèces cultivables - et les variétés au sein de ces mêmes espèces - les plus tolérantes au nickel. On pourrait imaginer aussi qu'ils soient utilisés par les sélectionneurs pour l'élaboration de nouvelles variétés moins sensibles au nickel, et aux métaux lourds d'une façon plus générale.

Finalement, si nous avons le sentiment d'avoir progressé dans la mise en évidence d'une éventuelle phytotoxicité du nickel dans les sols ferrallitiques ferritiques du Sud calédonien, ainsi que dans la connaissance des mécanismes de cette toxicité chez le maïs, nous constatons aussi que nous avons soulevé de nombreuses questions. Le problème du nickel dans les sols cultivables de Nouvelle-Calédonie n'est pas épuisé, même si, pour le court terme, des tests rapides de sensibilité spécifique et variétale et des améliorations dans les techniques culturales permettent de contourner partiellement et pour un temps cet obstacle insidieux à l'intensification agricole.



---

**RÉFÉRENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

---



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADAMS F. 1971. Ionic concentrations and activities in soil solutions. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 35: 420-426.
- ADEME et INRA de Bordeaux. 1994. Les micropolluants métalliques dans les boues d'épuration destinées à la fertilisation des sols agricoles. Brochure de l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, collection valorisation agricole des boues d'épuration, 200 pp.
- AFNOR. 1985. Matières fertilisantes - Boues des ouvrages de traitement des eaux usées urbaines. Dénominations et spécifications. Norme NF U 44-041. Afnor, Paris La Défense.
- AGARWALA S. C., A. KUMAR and C. P. SHARMA. 1961. Effect of excess supply of heavy metals on barley during germination, with special reference to catalase and peroxidase. *Nature* 191:726-727.
- ALLER A. J., J. L. BERNAL, M. J. DEL NOZAL and L. DEBAN. 1990. Effects of selected trace elements on plant growth. *J. Sci. Food Agric.* 51: 447-479.
- ALLINSON D. W. and C. DZIALO. 1981. The influence of lead, cadmium and nickel on the growth of ryegrass and oats. *Plant and Soil* 62: 81-89.
- ALVA A. K., D. G. EDWARDS, C. J. ASHER and F. P. C. BLAMEY. 1986. Relationship between root length of soybean and calculated activities of aluminium monomers in nutrient solution. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50: 959-962.
- ANDERSON A. J., D. R. MEYER and F. K. MAYER. 1973. Heavy metal toxicities : levels of nickel, cobalt and chromium in the soil and plant associated with visual symptoms and variations in growth of an oat crop. *Aust. J. Agric. Res.* 24: 557-571.
- ANDERSON A. J. , D. R. MEYER and F. K. MAYER. 1979. Effects of the environment on the symptom pattern of nickel toxicity in the oat plant. *Ann. Botany* 43: 271-284
- ANDERSON P. R. and T. H. CHRISTENSEN. 1988. Distribution coefficient of Cd, Co, Ni and Zn in soils. *Journal of Soil Science* 39: 15-22.
- ANGELONE M. and C. BINI. 1992. Trace elements concentrations in soils and plants of Western Europe. In: *Advances in trace metal research, Biogeochemistry of trace metals*, D. C. Adriano, ed., Lewis Pub., pp. 19-60.
- APELBAUM A., J. D. ANDERSON, T. SOLOMOS and M. LIEBERMAN. 1981. Some characteristics of the system converting ACC to ethylene. *Plant Physiol.* 67: 80-84.
- ASCHMANN S. G. and R. J. ZASOSKI. 1987. Nickel and rubidium uptake by whole oat plants in solution culture. *Physiologia Plantarum* 71: 191-196.
- ASTHANA R. K., S. P. SINGH and R. K. SINGH. 1992. Nickel effects on phosphate uptake, alkaline phosphatase and ATPase of a cyanobacterium. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 48: 45-54.
- AZPIAZU M. N. , F. ROMERO and J. M. DIAZ. 1986. Metal distribution and interaction in plant cultures on artificial soil. *Water, Air, and Soil Pollution* 28: 1-26.
- BAGATTO G. and J. D. SHORTHOUSE. 1991. Accumulation of copper and nickel in plants tissues and an insect gall of lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium*, near an ore smelter at Sudbury, Ontario, Canada. *Canadian Journal of Botany* 69: 1483-1490.

- BAKER A. J. M. and P. L. WALKER. 1989. Physiological responses of plants to heavy metals and the quantification of tolerance and toxicity. *Chemical Speciation and Bioavailability* 1: 7-17.
- BARCELÓ A. R. and R. MUÑOZ. 1992. Peroxidases : their role in the control of plant cell growth. *In* : C. Penel, Th. Gaspar, H. Greppin, eds, *Plant peroxidases 1980-1990, Topics and Details of Literature on Molecular, Biochemical, and Physiological Aspects*, University of Geneva, Geneva, Switzerland, pp. 71-89.
- BARCELÓ J. and CH. POSCHENRIEDER. 1990. Plant water relations as affected by heavy metals stress: a review. *Journal of Plant Nutrition* 13: 1-37.
- BARCELÓ J., P. GUEVARA and CH. POSCHENRIEDER. 1993. Silicon amelioration of aluminium toxicity in teosinte (*Zea mays* L. ssp. *mexicana*). *Plant and Soil* 154: 249-255.
- BASTA N. T. and M. A. TABATABAI. 1992. Effect of cropping systems on adsorption of metals by soils : II. Effect of pH. *Soil Science* 153: 195-204.
- BAZZAZ F. A., G. L. ROLFE and R. W. CARLSON. 1974. Effect of Cd on photosynthesis and transpiration of excised leaves of corn and sunflower. *Physiol. Plant.* 32: 373-376.
- BECKETT P. H. T. and R. D. DAVIS. 1977. Upper critical concentration of toxic elements in plants. *New Phytologist* 79: 95-106.
- BECKETT P. H. T. and R. D. DAVIS. 1978. The additivity of the toxic effects of Cu, Ni and Zn in young barley. *New Phytol.* 81: 155-173.
- BECQUER T., J-P. BOUDOT, D. MERLET et J. ROULLIER. 1992. Incidence des cycles de l'azote et du soufre sur le bilan de protons d'un écosystème forestier déperissant. Relation avec la toxicité aluminique. *C. R. Acad. Sci. Paris*, t. 314, Série II: 527-532.
- BENNET R. J., C. M. BREEN and M. V. FEY. 1987. The effects of aluminium on root cap function and root development in *Zea mays* L. *Environmental and Experimental Botany* 27: 91-104.
- BERRY W. L. and A. WALLACE. 1989. Interaction of the yield response surface of lettuce with high and toxic concentration of zinc and nickel. *Soil Science* 147: 398-400.
- BISHNOI N. R., I. S. SHEORAN and R. SINGH. 1993a. Influence of cadmium and nickel on photosynthesis and water relations in wheat leaves of different insertion level. *Photosynthetica* 28: 473-479.
- BISHNOI N. R., I. S. SHEORAN and R. SINGH. 1993b. Effect of cadmium and nickel on mobilisation of food reserves and activities of hydrolitic enzymes in germinating pea seeds. *Biologia Plantarum* 35: 583-589.
- BOLDT J. R. 1967. The winning of nickel. Its geology, mining, and extractive metallurgy. P. Queneau (ed.), D. Van Nostrand Company, Inc., Canada, 487 pp.
- BONZON B. et C. MAURY. 1982. *In* : Rapport annuel du Centre de Recherches et d'Expérimentations Agronomiques de Nouvelle-Calédonie. 235 pp.
- BONZON B., P. PODWOJEWSKI, E. BOURDON, L. L'HUILLIER et P. DE MONPEZAT. 1991a. Recherches préliminaires pour le développement de la culture du cocotier sur les petits archipels du Pacifique Sud. 1. Adaptation à l'espèce des tests de fertilité sur vases de végétation. 2. Identification des sols sous cocoteraies présentant des carences difficiles à éliminer. Problématique de la mise en valeur de tels sols. Nouméa : ORSTOM. Con.; Sci. Vie; Agropédol., 8: 275 pp.

- BONZON B., L. COLLET, C. BOUCARON, F. GOURDON, P. DE MONPEZAT et L. L'HUILLIER. 1991b. Etude des effets des amendements calciques sur un vertisol hyper-magnésien. Résultats du cinquième cycle cultural de l'expérimentation au champ. Nouméa : ORSTOM. Con.; Sci. Vie; Agropédol., 10: 75 pp.
- BOURDON E. et T. BECQUER. 1992. Etude de l'organisation pédologique des sols ferrallitiques des massifs du Sud de la Grande Terre : zones de la Coulée et de la Lembi. Caractérisation physico-chimique des sols. Nouméa : ORSTOM. Con.; Sci. Vie; Agropédol., 16: 88 pp.
- BOWEN J. E. 1969. Absorption of copper, zinc, and manganese by sugar cane leaf tissue. *Plant Physiol.* 44: 255-261.
- BRADFORD M. H. 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- BRADY D. J., D. G. EDWARDS, C. J. ASHER and F. C. P. BLAMEY. 1993. Calcium amelioration of aluminium toxicity effects on root hair development in soybean (*Glycine max.* (L.) Merr.). *New Phytol.* 123: 531-538.
- BROOKS, R. R. 1987. Serpentine and its vegetation. A multidisciplinary approach. Diocorides Press, Portland, OR, 454 pp.
- BROWN P. H, R. M. WELCH and E. E. CARY. 1987. Nickel : A micronutrient essential for higher plants. *Plant Physiol.* 85: 801-803.
- BROWN P. H, L. DUNNEMAN, R. SCHULZ, and H. MARSCHNER. 1989. Influence of redox potential and plant species on the uptake of nickel and cadmium from soils. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd.* 152: 85-91.
- BRUNE A., W. URBACH and K-J. DIETZ. 1994. Compartmentation and transport of zinc in barley primary leaves as basic mechanisms involved in zinc tolerance. *Plant, Cell and Environment* 17: 153-162.
- BUATIER C. 1994. Caractérisation et analyse de la mobilité et de la biodisponibilité du nickel présent dans les sols du Pays de Gex (Ain). Contrainte à la valorisation agricole des boues d'épuration. Mémoire Ingénieur, INPSA-ENESAD, 180 pp.
- BURTON K.W., E. MORGAN and A. ROIG. 1986. Interactive effects of cadmium, copper and nickel on the growth of Sitka spruce and studies of metal uptake from nutrient solutions. *New Phytol.* 103: 549-557.
- CARLSON R. W., F. A. BAZZAZ and G. L. ROLFE. 1975. The effect of heavy metals on plants. II. Net photosynthesis and transpiration of whole corn and sunflower plants treated with Pb, Cd, Ni and Tl. *Environmental Research* 10: 113-120.
- CASTILLO F. J. 1986. Extracellular peroxidases as markers of stress ? In : H. Greppin, C. Penel, Th. Gaspar, eds, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases, Université de Genève, Genève, Switzerland, pp. 419-426.
- CATALDO D.A. and R. E. WILDUNG. 1978. Soil and plant factors influencing the accumulation of heavy metals by plants. *Environmental Health Perspectives* 27: 149-159.
- CATALDO D. A., T. R. GARLAND and R. E. WILDUNG. 1978a. Nickel in plants. I. Uptake kinetics using intact soybean seedlings. *Plant Physiol.* 62: 563-565.
- CATALDO D. A., T. R. GARLAND, R. E. WILDUNG and H. DRUCKER. 1978b. Nickel in plants. II. Distribution and chemical form in soybean plants. *Plant Physiol.* 62: 566-570.

- CATALDO D. A., K. M. MCFADDEN, T. R. GARLAND and R. E. WILDUNG. 1988. Organic constituents and complexation of nickel (II), iron (III), cadmium (II), and plutonium (IV) in soybean xylem exudates. *Plant Physiol.* 86: 734-739.
- CATHALA N. et L. SALZAC. 1975. Absorption du cuivre par les racines de maïs (*Zea mays* L.) et de tournesol (*Helianthus annuus* L.). *Plant and Soil* 42: 65-83.
- CEC : Commission of the European Communities. 1986. Council directive n°86/278 of 12 June 1986 on the protection of the environment and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture. *Official Journal of the European Communities* L181(1A): 6-12.
- CHANG A. C., T. C. GRANATO and A. L. PAGE. 1992. A methodology for establishing phytotoxicity criteria for chromium, copper, nickel and zinc in agricultural land application of municipal sewage sludges. *Journal of Environmental Quality* 21: 521-536.
- CHARLOT G. 1963. *L'analyse qualitative et les réactions en solution*. Masson et Cie, pp. 259-263.
- CLIJSTERS H. and F. VAN ASSCHE. 1985. Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynthesis Research* 7: 31-40.
- COCUCCI S. M., S. MORGUTTI, P. FERRARI-BRAVO and P. L. GENEVINI. 1981. Effects of nickel on proton extrusion in segments of maize roots. *J. Plant Nutr.* 4: 57-64.
- COCUCCI S. M. and S. MORGUTTI. 1986. Stimulation of proton extrusion by  $K^+$  and divalent cations ( $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) in maize root segments. *Physiol. Plantarum* 68: 497-501.
- COSSON L. 1992. Composés caféoylquiniques et résistance du tournesol cultivé et sauvage vis-à-vis de *Sclerotinia sclerotiorum*. Thèse de l'Université de Montpellier I, 223 pp.
- C.P.C.S. 1967. Classification des sols. 87 pp.
- COSTA G. and J. L. MOREL. 1994. Efficiency of  $H^+$ -ATPase activity on cadmium uptake by four cultivars of lettuce. *Journal of Plant Nutrition* 17: 627-637.
- CROOKE W. M. 1954. Effect of nickel versenate on oat plants. *Nature* 173: 403-404.
- CROOKE W. M. 1956. Effect of soil reaction on uptake of nickel from a serpentine soil. *Soil Sci.* 81: 269-276.
- CROOKE W. M. 1958. Effect of heavy metal toxicity on the cation exchange capacity of plant roots. *Soil Science* 86: 231-241.
- CROOKE W. M., J. G. HUNTER and O. VERGNANO. 1954. The relationship between nickel toxicity and iron supply. *Ann. Appl. Biol.* 41: 311.
- CROOKE W. M. and R. H. E. INKSON. 1955. Relation between nickel toxicity and major nutrient supply. *Plant and Soil* 6: 1-15.
- CROOKE W. M. and A. H. KNIGHT. 1955. The relationship between nickel toxicity symptoms and the absorption of iron and nickel. *Ann. Appl. Biol.* 43: 454-464.
- CUMMING J. R. and G. J. TAYLOR. 1990. 15. Mechanisms of metal tolerance in plants : physiological adaptations for exclusion of metal ions from the cytoplasm. *In* : Stress responses in plants : adaptation and acclimatation mechanisms, R. G. Alscher and J. R. Cumming, eds. Wiley-Liss, Inc., New-York, pp. 329-356.
- DALTON D. A., S. A. RUSSEL and H. J. EVANS. 1988. Nickel as a micronutrient element for plants. *Biofactors* 1(1): 11-16.

- DANSCHER G. 1981. Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electromicroscopy. *Histochemistry* 71: 1-16.
- DAVIS R. D. and P. H. T. BECKETT. 1978. Upper critical levels of toxic elements in plants. II. Critical levels of copper in young barley, wheat, rape, lettuce and ryegrass, and of nickel and zinc in young barley and ryegrass. *New Phytol.* 80: 23-32.
- DE KOCK P. C. 1956. Heavy metal toxicity and iron chlorosis. *Ann. Bot.* 20: 133-141.
- DE KOCK P. C. and R. L. MITCHELL. 1957. Absorption of metal chelates by plants. *Soil Sci.* 84: 55-62.
- DEL CASTILHO P. 1993. Ammonium acetate extraction for soil heavy metal speciation; model aided soil test interpretation. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 51: 59-64.
- DELHAIZE E., S. CRAIG, C. D. BEATON, R. J. BENNET, V. C. JAGADISH and P. J. RANDALL. 1993. Aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). I. Uptake and distribution of aluminium in root apices. *Plant Physiol.* 103: 685-693.
- DELHAIZE E., P. R. RYAN and P. J. RANDALL. 1993. Aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Aluminium-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol.* 103: 695-702.
- DERRY D. R. 1980. World atlas of geology and mineral deposits. Mining Journal Books, London, 110 pp.
- DIEUAIDE M., R. BROUQUISSE, A. PRADET and P. RAYMOND. 1992. Increased fatty acid  $\beta$ -oxidation after glucose starvation in maize root tips. *Plant Physiol.* 99: 595-600.
- DIXON N. E., E. C. GAZZOLA, R. L. BLAKELEY and B. ZARER. 1975. Jack bean urease (E.C. 3.5.1.5), a metalloenzyme. A simple biological role for nickel? *J. Am. Chem. Soc.* 97: 4131.
- DUNEMANN L., N. VON WIRÉN, R. SCHULZ and H. MARSCHNER. 1991. Speciation analysis of nickel in soil solutions and availability to oat plants. *Plant and Soil* 133: 263-269.
- EDIGHOFFER S. 1993. Mise en valeur des sols ferrallitiques des massifs du Sud de la Nouvelle-Calédonie. Enquête sur le statut des nutriments et des métaux lourds chez les végétaux cultivés sur différents faciès ferritiques. ORSTOM. Con.; Sci. Vie; Agropédol., 23: 115 pp.
- ELKHATIB E. A. 1994. Evaluation of six soil extractants for assessing nickel availability to wheat. *Arid Soil Research and Rehabilitation* 8: 137-145.
- EL-SHEEKH M. M. 1993. Inhibition of photosystem II in the green alga *Scenedesmus obliquus* by nickel. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 188: 363-372.
- ERNST W. 1976. Physiological and biochemical aspects of metal tolerance. In: Effects of Air Pollutants on Plants, Mansfield T. A., ed., Cambridge University Press, London, pp. 115-133.
- ESKEW D. L., R. M. WELCH and E. E. CARY. 1983. Nickel : an essential micronutrient for legumes and possibly all higher plants. *Science* 222: 621-623.
- ESTAÑ M., M. C. BOLARIN and M. G. GUILLEN. 1988. Efectos del niquel en pimiento (*Capsicum annum* L). *Agrochimica* XXXII:379-390.
- ESTERBAUER H., E. SCHWARZL and M. HAYN. 1977. A rapid assay for catechol oxydase and laccase using 2-nitro-5-thiobenzoic acid. *Analytical Biochemistry* 77: 486-494.
- FAIVRE P. 1988. Lessivage et planosolisation dans les séquences de sols caractéristiques des milieux intrandins de Colombie (Amérique du Sud). Thèse, Université de Nancy I, 563 pp.

- FALAVIER P. 1985. Densité de charge variable et point de charge nulle dans les sols tropicaux. Définition, mesure et utilisation. *L'Agronomie Tropicale* 40 - 3: 239-245.
- FERRETTI M., R. GHISI, L. MERLO, F. DALA VECCHIA and C. PASSERA. 1993. Effect of cadmium on photosynthesis and enzymes of photosynthetic sulphate and nitrate assimilation pathways in maize (*Zea mays* L.). *Photosynthetica* 29: 49-54.
- FISHER D. B. 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemica* 16: 92-96.
- FLETCHER P. and P. H. BECKETT. 1987. The chemistry of heavy metals in digested sewage sludge - II. Heavy metal complexation with soluble organic matter. *Wat. Res.* 21: 1163-1172.
- FOSTER W. A. 1954. Toxic effect of heavy metals on crop plants grown in soil culture. *Ann.Appl.Biol.* 41: 637-641.
- FOY C. D., R. L. CHANEY and M. C. WHITE. 1978. The physiology of metal toxicity in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29: 511-566.
- FRANK R., K. I. STONEFIELD, P. SUDA and J. W. POTTER. 1982. Impact of nickel contamination on the production of vegetables on an organic soil, Ontario, Canada. *The Science of the Total Environment* 26: 41-65.
- FUHRER J. 1982. Ethylene biosynthesis and cadmium toxicity in leaf tissue of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol.* 70: 162-167.
- GABBRIELLI R. and T. PANDOLFINI. 1984. Effect of Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> on the response to nickel toxicity in a serpentine endemic and nickel-accumulating species. *Physiol. Plant* 62: 540-544.
- GABBRIELLI R., T. PANDOLFINI, O. VERGNANO and M. R. PALANDRI. 1990. Comparison of two species with different nickel tolerance strategies. *Plant and Soil* 122: 271-277.
- GABBRIELLI R., C. MATTIONI and O. VERGNANO. 1991. Accumulation mechanisms and heavy metal tolerance of a nickel hyperaccumulator. *Journal of Plant Nutrition* 14: 1067-1080.
- GADD G. M. 1993. Tansley Review No. 47. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol.* 124: 25-60.
- GASPAR TH., C. PENEL, T. THROPE and H. GREPPIN. 1982. Peroxidases 1970-1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Université de Genève, Centre de Botanique, Suisse, 324 p.
- GASPAR TH., C. PENEL, F. J. CASTILLO and H. GREPPIN. 1985. A two step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiologia Plantarum* 64: 418-423.
- GERZABEK M. H. and S. M. ULLAH. 1990. Influence of fulvic and humic acids on Cd- and Ni-toxicity to *Zea mays* (L.). *Bodenkultur* 41: 115-124.
- GOLOVCHENKO V. P. and C. V. CHEREDNICHENKO. 1962. Content of trace elements in various plant organs. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* 146: 1223-1226.
- GORA L. and H. CLIJSTERS. 1989. Effect of copper and zinc on the ethylene metabolism in *Phaseolus vulgaris* L. In : H. Clijsters et al., eds, Biochemical and Physiological Aspects of Ethylene Production in Lower and Higher Plants, pp. 219-228.
- GORDON S. A. and R. P. WEBER. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol.* 26: 192-195.



- GOURDON F. G. PUJOL, C. BOUCARON, B. BONZON, L. L'HUILLIER et L. COLLET. 1991. Mise en valeur des sols ferrallitiques ferritiques des massifs du Sud de la Grande Terre. Carences en phosphore et en silice : résultats des deux premières études expérimentales en serre. Nouméa : ORSTOM. Con.; Sci. Vie; Agropédol., 9: 53 pp.
- GRAHAM R. D., R. M. WELCH and C. D. WALKER. 1985. A role of nickel in the resistance of plants to rust. *Austr. Agron. Soc. Proc.* 159: 337.
- GREGER M., E. BRAMMER., S. LINDBERG, G. LARSSON and J. IDESTAM-ALMQUIST. 1991. Uptake and physiological effects of cadmium in sugar beet (*Beta vulgaris*) related to mineral provision. *Journal of Experimental Botany* 42: 729-737.
- GRILL E., E.-L. WINNACKER and M. H. ZENK. 1985. Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230: 674-676.
- GRILL E., E.-L. WINNACKER and M.H. ZENK. 1987. Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 439-443.
- GUHA M. M. and R. L. MITCHELL. 1966. Trace and major elements composition of the leaves of some deciduous trees. II. Seasonal changes. *Plant and Soil* 24: 90-112.
- GUILLOIN J. H. 1975. Les massifs péridotitiques de Nouvelle-Calédonie. Type d'appareil ultrabasique stratiforme de chaîne récente. Mémoire ORSTOM n°76, 120 pp.
- GUPTA S. C. and P. B. GOLDSBROUGH. 1991. Phytochelatin accumulation and cadmium tolerance in selected tomato cell lines. *Plant Physiol.* 97: 306-312.
- HALSTEAD R. L., B. J. FINN and A. J. MCLEAN. 1969. Extractibility of nickel added to the soils and its concentration in plants. *Can. J. Soil. Sci.* 49: 335-342.
- HAQ A. V., T. E. BATES and Y. K. SOON. 1980. Comparison of extractants for plant-available Zn, Cd, Ni and Cu in contaminated soils. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 44: 772-777.
- HARKIN J. M. and J. R. OBST. 1973. Lignification in trees : indication of exclusive peroxidase participation. *Science* 180: 296-297.
- HARMENS H, P. L. M. KOEVOETS, J. A. C. VERKLEIJ and W. H. O. ERNST. 1994. The role of low molecular weight organic acids in the mechanism of increased zinc tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. *New Phytol.* 126: 615-621.
- HARTER R. D. 1983. Effect of soil pH on adsorption of lead, copper Zinc and nickel. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47: 47-51.
- HASELHOFF E. 1893. Versuche über die schädliche Wirkung von nickel-haltigem wasser auf pflanzen. *Landw. Jahrb.* 22: 1862-1868.
- HASENSTEIN K. H. and M. L. EVANS. 1988. Effects of cations on hormone transport in primary roots of *Zea mays*. *Plant Physiol.* 86: 890-894.
- HEIKAL M. M. D., W. L. BERRY , A. WALLACE and D. HERMAN. 1989a. Alleviation of nickel toxicity by calcium salinity. *Soil Science* 147: 413-415.
- HEIKAL M. M. D., W. L. BERRY and A. WALLACE. 1989b. Interactions in plant growth response between the osmotic effect of sodium chloride and high concentration of the trace element nickel. *Soil Science* 147: 422-425.
- HELLER R. 1990. Rôle des oligo-éléments chez le végétal. *C. R. Acad. Agric. Fr.* 76: 7-16.

- HELLER R., R. ESNAULT et C. LANCE. 1989. Physiologie végétale. 1. Nutrition. Quatrième édition, Masson, éd., 273 pp.
- HEWITT E. J. 1948. Relation of manganese and some other metals to the iron status of plants. *Nature* 161: 489-490
- HEWITT E. J. 1953. Metal interrelationships in plant nutrition. I. Effects of some metal toxicities on sugar beet, tomato, oat plant, potato and narrow stem kale grown in sand culture. *J. Exptl. Botany* 4: 59-64.
- HIRNER A. V. 1991. Trace element speciation in soils and sediments using sequential chemical extraction methods. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 00: 00-00.
- HOAGLAND, D. R., and D. I. ARNON. 1950. The water culture method for growing plants without soil. California Agriculture Experimental Station, Circ. 347, 1-32. Univ. of California, Berkeley, CA.
- HOLMGREN G. G. S., M. W. MEYER, R. L. CHANEY and R. B. DANIELS. 1993. Cadmium, lead, zinc, copper and nickel in agricultural soils of the United States of America. *J. Environ. Qual.* 22: 335-348.
- HOMER F. A., R. D. REEVES, R. R. BROOKS and A. J. M. BAKER. 1991. Characterization of the nickel-rich extract from the nickel hyperaccumulator *Dichapetalum gelonioides*. *Phytochemistry* 30: 2141-2145.
- HOMÈS J. 1975. La préparation des tissus végétaux pour l'observation au microscope électronique à balayage. *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.* 108: 219-231.
- HUGHES J. C. and NOBLE A. D. 1991. Extraction of chromium, nickel and iron and the availability of chromium and nickel to plants from some serpentinite-derived soils from the eastern Transvaal as revealed by various single and sequential extraction techniques. *Commun. Soil. Sci. Plant Anal.* 22: 1753-1766.
- HUNTER J. G. and O. VERGNANO. 1952. Nickel toxicity in plant. *Ann. Appl. Biol.* 39: 279-284.
- HUTCHINSON T. C. 1981. Nickel. In : N. W. Lepp, ed., Effect of heavy metal pollution on plants. Vol 1. Effect of trace metals on plant function. Applied Science Publishers Ltd, Barking, UK, pp. 171-203.
- IMBERTY A., R. GOLDBERG AND A. M. CATESSON. 1985. Isolation and characterization of *Populus* isoperoxidases involved in the last step of lignin formation. *Planta* 164: 221-226.
- IRVING H. and R. J. P. WILLIAMS. 1948. Order of stability of metal complexes. *Nature* 162: 746-747.
- JACKSON P. J., P. J. UNKEFER, E. DELHAIZE and N. J. ROBINSON. 1990. Mechanism of trace metal tolerance in plants. Chapter 10. In: Environmental Injury to plants, Acad. Press, pp. 231-255.
- JAFFRÉ T. 1980. Etude écologique du peuplement végétal des sols dérivés de roches ultrabasiques en Nouvelle-Calédonie. *Travaux et Documents de l'ORSTOM*, N°124, 273 pp.
- JAFFRÉ T. et M. SCHMID. 1974. Ecophysiologie. Accumulation du nickel par une Rubiacée de Nouvelle Calédonie, *Psychotria douarrei* (G Beauvisage) Däniker. *C.R. Acad. Sc., Paris*, sér. D, t. 278: : 1727-1730.
- JAFFRÉ T., R. R. BROOKS, J. LEE and R. D. REEVES. 1976. *Sebertia acuminata* : a hyperaccumulator of nickel from New caledonia. *Science* 193: 579-580.

- JUSTE C. 1983. Problèmes posés par l'évaluation de la disponibilité pour la plante des éléments-traces du sol et de certains amendements organiques [compost urbain, boue de décantation]. *Bulletin de l'Association Française pour l'étude du Sol* 2: 109-122.
- JUSTE C. 1988. Appréciation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments en traces du sol. *Science du Sol* 26: 103-112.
- JUSTE C., A. GOMEZ and C. DESENFANTS. 1989. Nutrient solution temperature effect on uptake of cadmium and nickel by maize (*Zea mays*) seedlings. In : H. Vernet, ed, Heavy Metals in the Environment, vol. 2, Geneva, pp. 201-205.
- JUSTE C. et J. TAUZIN. 1992. Comparaison de la biodisponibilité du cadmium contenu dans différentes matières fertilisantes. *C. R. Acad. Agric. Fr.* 78: 71-79.
- KABATA-PENDIAS A. and H. PENDIAS. 1992. Trace elements in soils and plants. 2nd edition, CRC Press, Boca Raton Ann. Arbor., London, pp. 272-293.
- KARATAGLIS S., M. MOUSTAKAS and L. SYMEONIDIS. 1991. Effect of heavy metals on isoperoxidases of wheat. *Biologia Plantarum* 33: 3-9.
- KEENEY D. R. and L. M. WALSH. 1975. Heavy metal availability in sewage sludge amended soils. In : Internat. Conf. on Heavy Metals in the Environment, vol. 2, Pathways and Cycling; T.C. Hutchinson ed., Institute for Environmental Studies, University of Toronto, pp. 379-403.
- KERSTEN W. J., R. R. BROOKS, R. D. REEVES and T. JAFFRÉ. 1980. Nature of nickel complexes in *Psychotria douarrei* and other nickel-accumulating plants. *Phytochemistry* 19: 1963-1965.
- KHALID B. Y. and J. TINSLEY. 1980. Some effects of nickel toxicity on rye grass. *Plant and Soil* 55:139-144.
- KHAN D. H., J. G. DUCKETT, B. FRANKLAND and J. B. KIRKHAM. 1984. An X-ray microanalytical study of the distribution of cadmium in roots of *Zea mays* L. *J. Plant Physiol.* 115: 19-28.
- KIELLAND J. 1937. Individual activity coefficients of ions in aqueous solutions. *J. Amer. Chem. Soc.* 59: 1675-1678.
- KINRAIDE T. B. and D. R. PARKER. 1987. Cation amelioration of aluminium toxicity in wheat. *Plant Physiol.* 83: 546-551.
- KJELDAHL I. 1883. Neue methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen körpern. *Z. Anal. Chem.* 22: 366-382.
- KNIGHT A. H. and W. M. CROOKE. 1956. Interaction between nickel and calcium in plants. *Nature* 178: 220.
- KÖRNER L. E., I. M. MØLLER and P. JENSÉN. 1986. Free space uptake and influx of Ni<sup>2+</sup> in excised barley roots. *Physiol. Plant.* 68: 583-588.
- KRUPA Z., A. SIEDLECKA, W. MAKSYMIEC and T. BASZYNSKI. 1993. *In vivo* response of photosynthetic apparatus of *Phaseolus vulgaris* L. to nickel toxicity. *J. Plant Physiol.* 142: 664-668.
- KSIAZEK M. and A. WOZNY. 1990. Lead movement in poplar adventitious roots. *Biol. Plant.* (Prague) 32: 54-57.
- KUNST L. and G. M. ROOMANS. 1985. Intracellular localization of heavy metals in yeast by X-Ray microanalysis. *Scanning electron microscopy* I: 191-199.

- LATHAM M. 1978. Carte Pédologique n° 14, Atlas de Nouvelle-Calédonie et dépendances. Editions ORSTOM, Paris, 1981.
- LATHAM M. 1985. Altération et pédogénèse sur roches ultrabasiqes en Nouvelle-Calédonie. Génèse et évolution des accumulations du fer et de silice en relations avec la formation du modelé. Thèse, Université de Dijon, 331 pp.
- LATHAM M., P. QUANTIN et G. AUBERT. 1978. Etude des sols de la Nouvelle-Calédonie. Notice explicative n° 78, ORSTOM, Paris.
- LAU O-L. and S. F. YANG. 1976a. Inhibition of ethylene production by cobaltous ion. *Plant Physiol.* 58: 114-117.
- LAU O-L. and S. F. YANG. 1976b. Stimulation of ethylene production in the mung bean hypocotyls by cupric ion, calcium ion, and kinetin. *Plant Physiol.* 57: 88-92.
- LE BOT J., M. J. GOSS, M.J.G.P.R. CARVALHO and M. L. VAN BEUSICHEM. 1990. The significance of the magnesium to manganese ratio in plant tissues for growth and alleviation of manganese toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum*) and Wheat (*Triticum Aestivum*) plants. *Plant Nutrition-Physiology and applications*: 223-228.
- LEE J., R. R. BROOKS, R. D. REEVES C. R. BOSWELL and T. JAFFRÉ. 1977. Plant-soil relationships in a New Caledonian serpentine flora. *Plant and Soil* 46: 675-680.
- LEE J., R. D. REEVES, R. R. BROOKS and T. JAFFRÉ. 1977. Isolation and identification of a citrato-complex of nickel from nickel-accumulating plants. *Phytochemistry* 16: 1503-1505.
- LEE J., R. D. REEVES, R. R. BROOKS and T. JAFFRÉ. 1978. The relation between nickel and citric acid in some nickel-accumulating plants. *Phytochemistry* 17: 1033-1035.
- L'HUILLIER L., J. D'AUZAC, M. DURAND and N. MICHAUD-FERRIÈRE, en préparation. Maize and nickel toxicity. Effects of nickel on structure and physiology of two maize cultivars (soumis à publication à *American Journal of Botany*).
- LICHTENTHALER H. K. and R. R. WELLBURN. 1983. Determination of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* 603: 591-592.
- LIDON F. C. AND F. S. HENRIQUES. 1993. Effects of copper toxicity on growth and the uptake and translocation of metals in rice plants. *Journal of Plant Nutrition* 16: 1449-1464.
- LINDBERG S. and G. GRIFFITHS. 1993. Aluminium effects on ATPase activity and lipid composition of plasma membranes in sugar beet roots. *Journal of Experimental Botany* 44: 1543-1550.
- LINDSAY W. L. and W. A. NORVELL. 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42: 421-428.
- LÜBBEN S. and D. SAUERBECK. 1991. The uptake and distribution of heavy metals by spring wheat. *Water, Air, and Soil Pollution* 57-58: 239-247.
- LUBET E. et J-C. TAUREAU. 1990. Diagnostic de nutrition par analyse de la plante. *C. R. Acad. Agric. Fr.* 76: 151-165.
- MA J. F. and K. NOMOTO. 1993. Inhibition of mugineic acid-ferric complex uptake in barley by copper, zinc and cobalt. *Physiologia Plantarum* 89: 331-334.
- MAAS E. V. and G. OGATA. 1971. Absorption of magnesium and chloride by excised corn roots. *Plant Physiol.* 47: 357.

- MÄDER M., A. NESSEL and P. SCHLOSS. 1986. Cell compartmentation and specific roles of isoenzymes. *In* : H. Greppin, C. Penel and Th. Gaspar, eds., *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*, pp. 247-260. University of Geneva, Switzerland.
- MAIER R. J., TODD D. P., L. STULTS and W. SRAY. 1990. Nickel accumulation and storage in *Bradyrhizobium japonicum*. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 1905-1911.
- MANCEAU A. 1984. Localisation du nickel dans les phyllosilicates. Application aux minerais de nickel de Nouvelle-Calédonie. Thèse, Université Paris VII, 103 pp.
- MARRÈ M. T., G. ROMANI, M. COCCUCCI, M. M. MOLONEY and E. MARRE. 1982. Divalent cation influx, depolarization of the transmembrane electric potential and proton extrusion in maize root segments. *In* : D. Marmé, E. Marre and R. Hertel, eds, *Plasmalemma and tonoplast : their functions in the plant cell.*, pp. 3-13.
- MATSUMOTO H., Y. YAMAMOTO and M. KASAI. 1992. Changes of some properties of the plasma membrane-enriched fraction of barley roots related to aluminium stress : membrane-associated ATPase, aluminium and calcium. *Soil Sci. Plant Nutr.* 38: 411-419.
- MCCAIN D. C., K. B. MARSH and L. A. PETERSON. 1990. Excess manganese accumulates in the vacuoles of potato leaves. *Potato Research* 33: 389-397.
- MCLEAN A. J. and A. J. DEKKER. 1978. Availability of zinc, copper, and nickel to plants grown in sewage-treated soils. *Can. J. Soil. Sci.* 58: 381-389.
- MEHARG A. A. 1993. The role of the plasmalemma in metal tolerance in angiosperms. *Physiologia Plantarum* 88: 191-198.
- MENCH M. 1990. Transfert des oligo-éléments du sol à la racine et absorption. *C. R. Acad. Agric. Fr.* 76: 17-30.
- MENCH M., C. JUSTE et P. SOLDA. 1992. Effets de l'utilisation de boues urbaines en essai de longue durée : accumulation des métaux par les végétaux supérieurs. *Bull. Soc. bot. Fr.* 139, *Actual. bot.* : 141-156.
- MESJASZ-PRZYBYLOWICZ J. K. BALKWILL, W. J. PRZYBYLOWICZ and H. J. ANNEGARN. 1994. Proton microprobe and X-ray fluorescence investigations of nickel distribution in serpentine flora from South Africa. *Nucl. Instr. and Meth.* B 89: 208-212.
- METWALLY A. I. and M. H. RABIE. 1989. Effect of Ni addition on plant growth and nutrient uptake in two soils. *Egypt. J. Soil Sci.* 29: 261-274.
- MISHRA D. and M. KAR. 1974. Nickel in plant growth and metabolism. *The Botanical Review* 40: 395-452.
- MIYASAKA S., J. G. BUTA, R. K. HOWELL and C. D. FOY. 1991. Mechanism of aluminium tolerance in snapbeans. Root exudation of citric acid. *Plant Physiol.* 96: 737-743.
- MIZUNO N. 1968. Interaction between iron and nickel, and copper and nickel, in various plant species. *Nature* 219: 1271-1272.
- MOREL J.L., J.C. PIERRAT et A. GUCKERT. 1988. Effet et arrière-effet de l'épandage de boues urbaines conditionnées à la chaux et au chlorure ferrique sur la teneur en métaux lourds d'un maïs. *Agronomie* 8: 107-113.
- MORGUTTI S., P. FERRARI-BRAVO, M. T. MARRÈ and S. COCCUCCI. 1981. Effects of Ni<sup>2+</sup> on proton extrusion and related transport processes and on the transmembrane electrical potential in maize roots. *Plant Sci. Lett.* 23: 123-128.

- MORGUTTI S., G. A. SACCHI and S. M. COCUCCI. 1984. Effects of Ni<sup>2+</sup> on proton extrusion, dark CO<sub>2</sub> fixation and malate synthesis in maize roots. *Physiol. Plant.* 60: 70-74.
- MOYA J. L., R. ROS and I. PICAZO. 1993. Influence of cadmium and nickel on growth, net photosynthesis and carbohydrate distribution in rice plants. *Photosynthesis Research* 36: 75-80.
- MSSP : Ministère de la Solidarité, de la Santé et de la Protection sociale. 1989. Décret n° 89-3 du 3 janvier 1989 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine à l'exclusion des eaux minérales naturelles.
- NALOVIC LJ et P. QUANTIN. 1972. Evolution géochimique de quelques éléments majeurs et traces dans un sol ferrallitique ferritique de Nouvelle-Calédonie issu de péridotites. Interprétation d'observations à l'aide de la microsonde de Castaing. *Cah. ORSTOM, sér. Pédol.* X: 389-410.
- NELLESSEN J. A. AND J. S. FLETCHER. 1993. Assessment of published literature on the uptake, accumulation, and translocation of heavy metals by vascular plants. *Chemosphere* 27: 1669-1680.
- NEU R. 1956. A new reagent for differentiating and determining flavones on paper chromatograms. *Naturwissenschaften* 43: 82.
- NEUMANN P. M. and A. CHAMEL. 1986. Comparative phloem mobility of nickel in non senescent plants. *Plant Physiol.* 81: 689-691.
- NEUZIL E. 1990. Les oligo-éléments chez l'animal : de l'atomistique à la physiologie. *C. R. Acad. Agric. Fr.* 76: 61-78.
- NH & MRC : National Health and Medical Research Council. 1980. Standard for metals in food. *In: Approved Food Standards and Approved Food Additives*, M5, pp. 1-3, Australia.
- NICHOL B. E., L. A. OLIVEIRA, A. D. M. GLASS and M. SIDDIQI. 1993. The effects of aluminium on the influx of calcium, potassium, ammonium, nitrate and phosphate in an aluminium-sensitive cultivar of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiol.* 101: 1263-1266.
- NISSEN P. 1973. Multiphasic uptake in plants. II. Mineral cations, chloride, and boric acid. *Physiol. Plant.* 29: 298-354.
- NMILA R. 1992. Absorption, transport et accumulation du cadmium chez la plante de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Thèse, USTL, Montpellier, 146 pp.
- NOBLE A. D. and J. C. HUGHES. 1991. Sequential fractionation of chromium and nickel from serpentinite-derived soils from the eastern Transvaal. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 22: 1963-1973.
- NORSETH, T. 1994. Measuring strategies for the nineties. Future needs from the health point of view. *Analyst* 119: 3-7.
- NRIAGU J. O. 1979. Global inventory of natural and anthropogenic emissions of trace metals to the atmosphere. *Nature* 279: 409-411.
- OBATA H. and M. UMEBAYASHI. 1993. Production of SH compounds in higher plants of different tolerance to Cd. *Plant and Soil* 155/156: 533-536.
- ODAWARA S., A. WATANABE and H. IMASEKI. 1977. Involvement of cellular membrane in regulation of ethylene production. *Plant Cell Physiol.* 18: 569-575.

- OLSEN S. R., C. V. COLE, F. S. WATANABE and L. A. DEAN. 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. U. S. Dep. of Agric. Circ. 939.
- PANDOLFINI T. and R. MAIER. 1985. Ni<sup>2+</sup> effect on peroxidase and esterase isoenzyme variation. *Giornale Botanico Italiano* 119: 55-56.
- PANDOLFINI T., R. GABBRIELLI and C. COMPARINI. 1992. Nickel toxicity and peroxidase activity in seedling of *Triticum aestivum* L. *Plant Cell and Environment* 15: 719-725.
- PANDOLFINI T. and R. GABBRIELLI. 1993. Changes in the activity and the isozyme pattern of peroxidases from different cellular fractions in Ni-treated plants. In : Plant Peroxidases : Biochemistry and Physiology, K. G. Welinder, S. K. Rasmussen, C. Penel, H. Greppin, eds., University of Geneva, Geneva, Switzerland, pp. 417-421.
- PARIS J. P. 1981. Géologie de la Nouvelle-Calédonie. Mémoire BRGM n° 113, Orléans, 278 pp.
- PENNAZIO S. and P. ROGGERO. 1992. Effect of cadmium and nickel on ethylene biosynthesis in soybean. *Biologia Plantarum* 34: 345-349.
- PÉTARD J. 1993a. Les méthodes d'analyses. Tome 1. Analyses de sols. Nouméa : ORSTOM. Notes Tech.; Lab. Com. d'Anal., 5: 196 pp.
- PÉTARD J. 1993b. Les méthodes d'analyses. Tome 2. Analyses d'eaux. Nouméa : ORSTOM. Notes Tech.; Lab. Com. d'Anal., 6: 87 pp.
- PÉTARD J. 1993c. Les méthodes d'analyses. Tome 3. Analyses de végétaux. Nouméa : ORSTOM. Notes Tech.; Lab. Com. d'Anal., 7: 50 pp.
- PHIPPS D. A. 1981. Chemistry and biochemistry of trace metals in biological systems. In : Effect of heavy metal pollution on plants. Vol 1. Effect of trace metals on plant function, N. W. Lepp, ed., Applied Science Publishers Ltd, Barking, UK, pp. 1-54.
- PICCINI D. F. and E. MALAVOLTA. 1992. Effect of nickel on two common bean cultivars. *Journal of Plant Nutrition* 15: 2343-2350.
- PRIOUL J. L. 1983. Transport des assimilats. Transport et distribution des assimilats chez le maïs : mécanismes, rôle des facteurs externes. In : INRA (éd.), Physiologie du maïs. Communications au colloque "Physiologie du maïs", organisé par l'INRA, le CNRS et l'AGPM, Royan 15-17 mars 1983, pp. 303-319.
- PROCTOR J. and S. J. WOODDELL. 1975. The ecology of serpentine soils. *Adv. Ecol. Res.* 9: 255-366.
- PROCTOR J. and I. D. MC GOWAN. 1976. Influence of magnesium on nickel toxicity. *Nature* 260:134.
- PUNZ W.F. and H. SIEGHARDT. 1993. The response of roots of herbaceous plant species to heavy metals. *Environmental and Experimental Botany* 33: 85-98.
- QUINTINA C., A. OLMEDILLA, N. ANTOINE and A. OLLACARIZQUETA. 1987. The occurrence of metals Al, Fe, Ni, Cu, Zn in the nuclei of animal cells : an ultrastructural, *in situ*, X-ray microanalytical study. *Biology of the cell* 61: 115-119.
- RAUSER W. E. 1978. Early effects of phytotoxic burdens of cadmium, cobalt, nickel and zinc in white beans. *Can. J. Bot.* 56: 1744-1749.
- RAUSER W. E. and E. B. DUMBROFF. 1981. Effects of excess cobalt, nickel and zinc on the water relations of *Phaseolus vulgaris*. *Environmental and Experimental Botany* 21: 249-255.

- REEVES R. D. 1992. In: The Vegetation of Ultramafic (Serpentine) Soils. A. J. M. Baker, J. Proctor and R. D. Reeves, eds., Intercept, Andover, Hampshire, UK, Chap. 20, p. 253.
- ROBERTSON A. I. 1985. The poisoning of roots of *Zea mays* by nickel ions, and the protection afforded by magnesium and calcium. *New Phytol.* 100: 173-189.
- ROBERTSON A. I. and M. E. R. MEAKIN. 1980. The effect of nickel on cell division and growth of *Brachystegia spiciformis* seedlings. *Kirkia* 12: 115-125.
- RÖMHELD V. 1987. Different strategies for iron acquisition in higher plants. *Physiol. Plantarum* 70: 231-234.
- ROS R., D. T. COOKE, R. S. BURDEN and C. S. JAMES. 1990. Effects of the herbicide MCPA, and the heavy metals, cadmium and nickel on the lipid composition, Mg<sup>2+</sup>-ATPase activity and fluidity of plasma membranes from rice, *Oryza sativa* (cv. Bahia) shoots. *Journal of Experimental Botany* 41: 457-462.
- ROS R., A. MORALES, J. SEGURA and I. PICAZO. 1992a. *In vivo* and *in vitro* effects of nickel and cadmium on the plasmalemma ATPase from rice (*Oryza sativa* L.) shoots and roots. *Plant Science* 83: 1-6.
- ROS R., D. T. COOKE, C. MARTINEZ-CORTINA and I. PICAZO. 1992b. Nickel and cadmium-related changes in growth, plasma membrane lipid composition, ATPase hydrolytic activity and proton pumping of rice (*Oryza sativa* L. cv. Bahia) shoots. *Journal of Experimental Botany* 43: 1475-1481.
- ROTH J. A., E. F. WILLIHAM and R. G. SHARPLESS. 1971. Uptake by oats and soybeans of copper and nickel added to a peat soil. *Soil Sci.* 112: 338-342.
- ROUSTAN J. P., A. LATCHE and J. FALLOT. 1989. Stimulation of *Daucus carota* somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene synthesis : cobalt and nickel. *Plant Cell Reports* 8: 182-185.
- RUBÁNYI G., I. BALOGH, E. SOMOGYI, A. G. B. KOVÁCH and P. SOTONY. 1980. Effect of nickel ions on ultrastructure of isolated perfused rat heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 12: 609-618.
- RUBIO M. I., I. ESCRIG, C. MARTÍNEZ-CORTINA, F. J. LÓPEZ-BENET and A. SANZ. 1994. Cadmium and nickel accumulation in rice plants. Effects on mineral nutrition and possible interactions of abscisic and gibberellic acids. *Plant Growth Regulation* 14: 151-157.
- RUIZ L. 1992. Mobilisation du phosphore des apatites dans la rhizosphère. Role de l'excrétion de protons par les racines. Thèse, USTL, Montpellier, 125 pp.
- SALIM R., M. HADDAD and I. EL-KHATIB. 1988. Effect of nickel treatment on the growth of eggplant. *J. Environ. Sci. Health* A23: 369-379.
- SALZAC L. 1970. Absorption du calcium par les racines de Féverole (calcicole) et de Lupin jaune (calcifuge). Thèse de Doctorat d'État, Université de Paris-VII, Paris.
- SAMARAKOON A. B. and W. E. RAUSER. 1979. Carbohydrate levels and photoassimilate export from leaves of *Phaseolus vulgaris* exposed to excess cobalt, nickel and zinc. *Plant Physiol.* 63: 1165-1169.
- SAUERBECK D. R. and A. HEIN. 1991. The nickel uptake from different soils and its prediction by chemical extractions. *Water, Air, and Soil Pollution* 57-58: 861-871.



- SCHELLER H. V., B. HUANG, E. HATCH and P. B. GOLDSBROUGH. 1987. Phytochelatin synthesis and glutathione levels in response to heavy metals in tomato cells. *Plant Physiol.* 85: 1031-1035.
- SCHNITZER M. and S. I. M. SKINNER. 1967. Organo-metallic interactions in soils. 7. Stability constants of  $Pb^{++}$ ,  $Ni^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Co^{++}$ ,  $Ca^{++}$ , and  $Mg^{++}$  -fulvic acid complexes. *Soil Sci.* 103: 247-252.
- SCHWERTMANN U. and M. LATHAM. 1986. Properties of iron oxides in some new Caledonian oxisols. *Geoderma* 39: 105-123.
- SETIA R. C., J. KAILA and C. P. MALIK. 1988. Effects of  $NiCl_2$  toxicity on stem growth and ear development in *Triticum Aestivum* L. *Phytomorphology* 38: 21-27.
- SEVERNE B. C. 1974. Nickel accumulation by *Hybanthus floribundus*. *Nature* 248: 807-808.
- SHEORAN I. S., H. R. SINGAL and R. SINGH. 1990. Effect of cadmium and nickel on photosynthesis and the enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Photosynthesis Research* 23: 345-351.
- SIEGEL B. Z. 1993. Plant peroxidases - an organismic perspective. *Plant Growth Regulation* 12: 303-312.
- SIEGEL S. M. and B. Z. SIEGEL. 1986. Peroxidase activity and stress : a complex relationship. In: H. Greppin, C. Penel, Th. Gaspar, eds, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases, Université de Genève, Genève, Switzerland, pp. 427-431.
- SIGEE D. C. 1982. Localised uptake of  $^{63}Ni$  into Dinoflagellate chromosomes : an autoradiographic study. *Protoplasma* 110: 112-120.
- SINGH B. and R. J. GILKES. 1992. Properties and distribution of iron oxides and their association with minor elements in the soils of south-western Australia. *Journal of Soil Science* 43: 77-98.
- SOANE B. D. and D. H. SAUNDER. 1959. Nickel and chromium toxicity of serpentine soils in southern rhodesia. *Soil Science* 88: 322-330.
- SOON Y. K., T. E. BATES and J. R. MAYER. 1980. Land application of chemically treated sewage sludge. III. Effects on soil and plant heavy metal content. *J. Environ. Qual.* 49: 497-504.
- SPOSITO G. and S. V. MATTIGOD. 1980. GEOCHEM : a computer program for the calculation of chemical equilibria in soil solution and other natural water systems. Kearney Foundation of Soil Science, Univ. of California, Riverside, CA.
- SPURR, A. R. 1969. A low-viscosity epoxy-resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructural Research* 26: 31-43.
- STEFFENS J. C. 1990. The heavy metal binding peptides of plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 553- 575.
- STEPHAN U. W. and G. SCHOLZ. 1993. Nicotianamine : mediator of transport of iron and heavy metals in the phloem ? *Physiologia Plantarum* 88: 522-529.
- STRANGE J. and MACNAIR M. R. 1991. Evidence for a role for the cell membrane in copper tolerance of *Mimulus guttatus* Fischer ex DC. *New Phytol.* 119: 383-388.
- SUHAYADA C. G. and A. HAUG. 1986. Organic acids reduce aluminium toxicity in maize root membranes. *Physiol. Plantarum* 68: 189-195.

- TANG T. and D. M. MILLER. 1991. Growth and tissue composition of rice grown in soil treated with inorganic copper, nickel and arsenic. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 22: 2037-2045.
- TAUREAU J. C., F. LAURENT et G. THEVENET. 1989. Diagnostic des carences sur blé, maïs et pois. Perspectives Agricoles, ITCF, supplément du n°132, janvier 1989, 62 pp.
- TAYLOR G. J. 1989. Multiple metal stress in *Triticum aestivum*, differentiation between additive, multiplicative, antagonistic and synergistic effects. *Can. J. Bot.* 67: 2272-2276.
- TAYLOR G. J. and K. J. STADT. 1990. Interactive effects of cadmium, copper, manganese, nickel and zinc on root growth of wheat (*Triticum aestivum*) in solution culture. *Plant nutrition - physiology and applications*: 317-322.
- TAYLOR G. J., K. J. STADT and M. R. T. DALE. 1991. Modelling the phytotoxicity of aluminium, cadmium, copper, manganese, nickel and zinc using the Weibull frequency distribution. *Can. J. Bot.* 69: 359-367.
- TEMPLE P. J. and S. BISESSAR. 1981. Uptake and toxicity of nickel and other metals in crops grown on soil contaminated by a nickel refinery. *Journal of Plant Nutrition* 3: 473-482.
- TERRY N. 1981. Physiology of trace element toxicity and its relation to iron stress. *J. Plant Nutr.* 3: 561-578.
- TIFFIN L. O. 1971. Translocation of nickel in xylem exudate of plants. *Plant Physiol.* 48: 273-277.
- TINKER P. B. 1986. Trace elements in arable agriculture. Hills bequest lecture of the Royal Agricultural Society of England, 9 october 1985. *Journal of Soil Science* 37: 587-601.
- TOMSETT A. B. and D. A. THURMAN. 1988. Molecular biology of metal tolerances of plants. *Plant, Cell and Environment* 11: 383-394.
- TRESCASE J. J. 1975. L'évolution géochimique supergène des roches ultrabasiques en zone tropicale. Formation des gisements nickélifères de Nouvelle-Calédonie. Paris : ORSTOM. Mémoires ORSTOM n° 78: 259 pp.
- TRIPATHY B. C., B. BHATIA and P. MOHANTY. 1981. Inactivation of chloroplast photosynthetic electron-transport activity by Ni<sup>2+</sup>. *Biochimica et Biophysica Acta* 638: 217-224.
- TU S. and J. N. BROUILLETTE. 1987. Metal ion inhibition of corn root plasma membrane ATPase. *Phytochemistry* 26: 65-69.
- TURINA B. 1968. Absorption of selenium, sulfur, tellurium, potassium, magnesium, iron, nickel and chromium ions by plant roots. *Agron. Glas.* 30: 919-950.
- TURNQUIST T. D., B. M. URIG and J. K. HARDY. 1990. Nickel uptake by the water Hyacinth. *Journal Environ. Sci. Health A25*: 897-912.
- URE A. M., PH. QUEVAUVILLER, H. MUNTAU and B. GRIEPINK. 1993. Speciation of heavy metals in soils and sediments. An account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the Commission of the European Communities. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 51: 135-151.
- UREN N. C. 1992. Forms, reactions, and availability of nickel in soils. *Advances in Agronomy* 48: 141-203.
- US EPA : US Environment Protection Agency. 1993. Standards for the use or disposal of sewage sludge. *Federal Register* 58: 9248-9415.

- VAN ASSCHE F. and H. CLIJSTERS. 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell and Environment* 13: 195-206.
- VANSELOW A. P. 1966. Nickel. In : Diagnostic criteria for plants and soils, H. D. Chapman [ed.], pp. 302-309. University of California, Citrus Research Center and Agric. Experiment Station., Riverside, CA.
- VARNER J. E. and R. TAYLOR. 1989. New ways to look at the architecture of plant cell walls. *Plant Physiol.* 91: 31-33.
- VÀZQUEZ M. D., C. POSCHENRIEDER and J. BARCELÓ. 1992a. Ultrastructural effects and localization of low cadmium concentrations in bean roots. *New Phytologist* 120: 215-226.
- VÀZQUEZ M. D., J. BARCELÓ, C. POSCHENRIEDER, J. MÀDICO, P. HATTON, A. J. M. BAKER AND G. H. COPE. 1992b. Localization of zinc and cadmium in *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae), a metallophyte that can hyperaccumulate both metals. *J. Plant physiol.* 140: 350-355.
- VEERANJANEYULU K. and V. S. R. DAS. 1982. Intrachloroplast localization of  $^{65}\text{Zn}$  and  $^{63}\text{Ni}$  in a Zn-tolerant plant, *Ocimum basilicum* Benth. *Journal of Experimental Botany* 137: 1161-1165.
- VERGNANO O. and J. G. HUNTER. 1953. Nickel and cobalt toxicities in oat plants. *Ann. Botany* 17: 317-328.
- VERGNANO GAMBI O., R. GABBRIELLI and L. PANCARO. 1982. Nickel, chromium and cobalt in plants from Italian serpentine areas. *Acta Oecologica Oecol. Plant* 3: 291-306.
- VERKLEIJ J. A. C. and H. SCHAT. 1990. Mechanisms of metal tolerance in higher plants. In: Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects, Shaw, A. J., ed., CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, pp. 179-193.
- VERLIÈRE G. et R. HELLER. 1981. Effets du nickel sur la croissance des racines isolées de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit et caractères de son absorption. *Physiol. Vég.* 19: 263-275.
- VÖGELI-LANGE R. and G. J. WAGNER. 1990. Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 92: 1086-1093.
- WALKLEY A. and I. A. BLACK. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science* 37: 29-38.
- WALLACE A. 1980. Effect of excess chelating agent on trace metals when chelating agents are applied to soil in contrast to when they are applied to solution cultures. *J. Plant Nutr.* 2: 171-175.
- WALLACE A. 1989a. Effect of liming on trace element interactions in plants. *Soil Science* 147: 416-421.
- WALLACE A. 1989b. Mineral composition for nineteen elements in young corn (*Zea mays*) plants grown in a acid soil with various treatments to overcome infertility of acid soils. *Soil Science* 147: 451-453.
- WALLACE A. 1989c. Evaluation of the cause for an acid soil infertility for a dicot plant species, *Phaseolus vulgaris*. *Soil Science* 147: 454-456.
- WALLACE A. 1989d. Plant responses to some hardly known trace elements and trace element composition and distribution in plants. *Soil Science* 147: 461-464.

- WALLACE A., E. M. ROMNEY, J. A. CHA, S. M. SOUFI and F. M. CHAUDRY. 1977. Nickel phytotoxicity in relationship to soil pH manipulation and chelating agents. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 8: 757-764.
- WALLACE A. and W. L. BERRY. 1989a. Cobalt interactions with zinc, cadmium and nickel in lettuce seedlings tests. *Soil Science* 147: 411-412.
- WALLACE A. and W. L. BERRY. 1989b. Dose-response curves for zinc, cadmium and nickel in combinations of one, two or three. *Soil Science* 147: 401-410.
- WALLACE A. AND M. ABOU-ZAMZAM. 1989. Low levels, but excesses, of five different trace elements, singly and in combination, on interactions in bush beans grown in solution culture. *Soil Science* 147: 439-441.
- WANG J., B. P. EVANGELOU and M. T. NIELSEN. 1992. Surface Chemical properties of purified root cell walls from two tobacco genotypes exhibiting different tolerance to manganese toxicity. *Plant Physiol.* 100: 496-501.
- WANG P. and E. QU. 1992. A preliminary study on the chemical forms and availability of nickel in manured loessial soil. *In: Proceedings of the international symposium on the role of sulphur, magnesium and micronutrients in balanced plant nutrition*, S. Portch, eds, pp. 306-313.
- WHEELER D. M., D. C. EDMEADES, R. A. CHRISTIE, J. PUTTERILL and R. GARDNER. 1992. Effect of aluminium and pH on relative yield and plant chemical concentrations of 7 dicotyledonous species grown in solution culture at low ionic strength. *Journal of Plant Nutrition* 15: 419-433.
- W.H.O. : World Health Organization. 1991. Nickel. Environmental Health Criteria 108, Geneva, 383 pp.
- WIERSMA D. and B. J. VAN GOOR. 1979. Chemical forms of nickel and cobalt in phloem of *Ricinus communis*. *Physiol. Plant.* 45: 440-442.
- WILDNER G. F. and J. HENKEL. 1979. The effect of divalent metal ions on the activity of Mg<sup>2+</sup> depleted ribulose-1,5-bisphosphate oxygenase. *Planta* 146: 223-228.
- WILDUNG R. E., T. C. GARLAND and H. DRUCKER. 1979. Nickel complexes with soil microbial metabolites - Mobility and speciation in soils. *In: Chemical Modeling in Aqueous Systems*, A. Jenne, ed., Amer. Chem. Soc. Series n°93, Washington, pp. 181-200.
- WILLAERT G. and M. VERLOO. 1988. Biological effects of nickel species and their determination in plant and soil. *Plant and Soil* 107: 285-292.
- WOOLHOUSE H. W. 1983. Toxicity and tolerance in the responses of plants to metals. *In: Encyclopedia of Plant Physiology*, vol. 12c, O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond and H. Ziegler, eds., pp. 245-300. Springer-Verlag, Berlin.
- XYLÄNDER M., H. AUGSTEN and K-J. APPENROTH. 1993. Influence of nickel on the life cycle of the duckweed *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden. *J. Plant Physiol.* 142: 208-213.
- YANG S. F. and N. E. HOFFMAN. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 155-189.
- ZABEL T. F. 1993. Diffuse sources of pollution by heavy metals. *J. IWEN* 7: 513-520.

---

# ANNEXES

---



## ANNEXE 1

**Composition minérale des solutions des sols ferrallitiques ferritiques sur vase de végétation.** Les solutions ont été analysées avant le semis du maïs, avant et après apport d'engrais, un intervalle de 8 jours séparant les deux prélèvements. L'engrais est celui décrit dans le tableau 2.1. Les solutions ont été recyclées tous les 2 jours pendant 8 jours en serre. Les valeurs correspondent à des solutions de sol (percolats) issues de 12 vases de végétation et réunies entre elles.

Analyse	Plaine 0-20 cm		Plaine 40-60 cm		Piedmont 0-20 cm		Piedmont 40-60 cm	
	avant engrais*	après engrais	avant engrais*	après engrais	avant engrais*	après engrais	avant engrais*	après engrais
pH	7,6	6,4	7,3	6,3	5,2	5,7	5,3	5,9
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	6,34	4,50	1,80	0,50	0,14	0,70	0,25	0,15
Cl <sup>-</sup> (meq.l <sup>-1</sup> )	0,69	0,71	0,22	0,21	0,83	1,03	0,63	0,79
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (meq.l <sup>-1</sup> )	2,95	26,06	3,13	26,08	9,33	11,78	15,81	22,25
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (meq.l <sup>-1</sup> )	0,49	6,23	0,37	5,27	0,10	4,51	0,02	3,61
P (mg.l <sup>-1</sup> )	1,45	0,70	0,49	0,26	0,01	0,01	0,02	0,01
Σ <sup>-</sup> (meq.l <sup>-1</sup> )	10,47	37,50	5,52	32,06	10,40	18,02	16,71	26,80
Ca <sup>2+</sup> (meq.l <sup>-1</sup> )	1,19	11,94	0,81	10,10	6,34	11,91	13,72	20,22
Mg <sup>2+</sup> (meq.l <sup>-1</sup> )	4,30	20,90	2,79	20,34	2,04	1,59	0,72	0,38
K <sup>+</sup> (meq.l <sup>-1</sup> )	0,37	0,99	0,08	0,39	0,32	0,85	0,19	0,77
Na <sup>+</sup> (meq.l <sup>-1</sup> )	1,00	1,19	0,53	0,91	1,02	1,69	0,88	0,94
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (meq.l <sup>-1</sup> )	0,45	1,97	0,53	1,02	0,31	1,00	0,29	2,34
Σ <sup>+</sup>	7,31	36,99	4,74	32,76	10,03	17,04	15,80	24,65
Fe (mg.l <sup>-1</sup> )	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Mn (mg.l <sup>-1</sup> )	0,04	0,20	< 0,02	< 0,02	1,65	2,38	0,10	0,09
Cr (mg.l <sup>-1</sup> )	< 0,06	< 0,06	< 0,06	< 0,06	< 0,06	< 0,06	0,20	0,25
Ni (mg.l <sup>-1</sup> )	0,15	0,71	0,06	0,44	0,07	0,09	0,04	0,04

\* hormis le superphosphate triple.

## ANNEXE 2

**Composition minérale des parties aériennes des maïs cultivés sur les quatre sols ferrallitiques ferritiques de l'étude et récoltés au même stade de développement.** Les plants ont été cultivés en serre jusqu'au stade 75 cm au niveau de la ligule de la 9<sup>ème</sup> feuille dégainée. Les résultats, exprimés par rapport à la matière sèche, sont les moyennes  $\pm$  leur écart-type calculés sur 10 répétitions.

Éléments	Plaine	Plaine	Piedmont	Piedmont
	0-20 cm	40-60 cm	0-20 cm	40-60 cm
Si (%)	1,66 $\pm$ 0,37	1,75 $\pm$ 0,16	1,57 $\pm$ 0,20	0,67 $\pm$ 0,12
N (%)	2,29 $\pm$ 0,52	2,53 $\pm$ 0,24	2,89 $\pm$ 0,44	3,07 $\pm$ 0,35
P (%)	0,30 $\pm$ 0,07	0,28 $\pm$ 0,04	0,22 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,02
K (%)	2,06 $\pm$ 0,40	1,59 $\pm$ 0,28	1,43 $\pm$ 0,12	1,25 $\pm$ 0,25
Ca (%)	0,19 $\pm$ 0,05	0,20 $\pm$ 0,03	0,57 $\pm$ 0,04	0,70 $\pm$ 0,06
Mg (%)	0,52 $\pm$ 0,12	0,73 $\pm$ 0,08	0,49 $\pm$ 0,03	0,26 $\pm$ 0,03
Fe ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	99,0 $\pm$ 27,6	82,0 $\pm$ 17,9	108,7 $\pm$ 31,2	88,3 $\pm$ 12,3
Mn ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	54,5 $\pm$ 9,5	58,6 $\pm$ 5,7	134,5 $\pm$ 22,1	68,0 $\pm$ 5,4
Co ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	3,3 $\pm$ 0,7	2,6 $\pm$ 0,5	2,8 $\pm$ 0,8	1,8 $\pm$ 0,4
Cr ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	1,6 $\pm$ 0,8	1,4 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,4	2,0 $\pm$ 0,6
Ni ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	5,6 $\pm$ 0,7	8,5 $\pm$ 1,0	4,3 $\pm$ 0,5	2,3 $\pm$ 0,3



## ANNEXE 3

**Effets du nickel sur la croissance du maïs GH 5010.** Les plants de maïs ont été cultivés pendant 36 jours sur le sol alluvial équilibré, additionné de quantités croissantes de NiSO<sub>4</sub>. Les valeurs sont les moyennes calculées sur 12 répétitions par traitement.

Paramètres	Doses de Ni (mg.kg <sup>-1</sup> de sol)						C.V. (%)	Proba- bilité
	0	40	80	160	320	640		
ETP9 (ml.h <sup>-1</sup> )	1,51	1,42	1,38	1,28	1,44	1,47	9,2	0,927
ETP12 -	1,81	1,68	1,54	1,51	1,47	1,49	13,4	0,930
ETP16 -	2,68	2,35	2,01	1,86	1,87	1,73	15,7	0,999
ETP19 -	2,65	2,11	1,90	1,64	1,60	1,34	15,1	1,000
ETP21 -	3,68	2,84	2,57	2,15	1,87	1,77	15,4	1,000
ETP23 -	3,59	2,44	2,40	1,98	1,75	1,41	18,5	1,000
ETP26 -	4,89	3,84	3,34	2,57	2,47	1,95	19,5	1,000
ETP28 -	6,05	5,70	4,65	3,73	3,61	2,68	23,0	0,999
ETP30 -	7,51	6,15	5,35	3,70	3,55	2,61	19,5	1,000
ETP33 -	8,06	7,29	6,13	4,40	4,08	2,76	29,6	0,999
ETP35 -	7,90	7,53	6,42	4,80	4,46	3,06	26,1	0,999
ETP36 -	8,93	8,40	7,07	6,69	5,89	3,49	32,6	0,996
H9 (cm)	9,19	9,37	8,75	8,77	8,70	7,87	8,8	0,958
H16 -	13,67	13,97	12,86	13,22	12,62	11,87	9,4	0,922
H19 -	20,08	18,42	17,09	16,71	16,04	14,64	5,7	1,000
H23 -	25,90	23,11	21,56	20,28	20,02	18,07	4,7	1,000
H26 -	32,34	27,50	24,85	24,75	23,36	21,29	5,3	1,000
H30 -	43,22	35,00	31,72	29,94	27,60	24,83	6,1	1,000
H33 -	56,34	43,92	38,55	36,07	32,02	28,52	6,9	1,000
H36 -	68,06	54,53	47,53	43,11	38,95	32,92	7,9	1,000
HT36 -	176,50	156,33	145,50	138,66	128,71	112,46	4,7	1,000
PPA (g.plt <sup>-1</sup> )	23,57	16,08	13,07	9,86	8,14	5,57	18,7	1,000
PRac -	3,64	2,66	1,65	1,94	1,30	0,56	48,3	0,999
PT -	27,21	18,74	14,73	11,81	9,44	6,14	21,6	1,000

C.V. : coefficient de variation; ETPn : évapotranspiration potentielle au n<sup>ème</sup> jour; Hn : hauteur au n<sup>ème</sup> jour à la ligule de la dernière feuille dégainée; HT36 : hauteur totale à 36 jours; PPA : poids de matière sèche des parties aériennes à 36 jours; PRac : poids de matière sèche des racines; PT : poids total de matière sèche.

## ANNEXE 4

**Teneurs en éléments des grains de maïs GH 5010.** Résultats exprimés par rapport à la matière sèche, et portant sur l'analyse d'un échantillon moyen de 100 grains.

N	P	K	Ca	Mg	Na	Fe	Mn	Cu	Zn	Ni
(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(µg.g <sup>-1</sup> )				
1,61	0,26	0,33	0,006	0,105	0,002	50	8	1	25	1

## ANNEXE 5

**Composition minérale de la solution du sol alluvial mélangé avec différentes quantités de NiSO<sub>4</sub>.**  
Les solutions (percolats des vases de végétation) ont été récoltées après 36 jours de végétation du maïs GH 5010. Les valeurs sont les moyennes calculées sur 12 répétitions par traitement. Le poids de matière sèche par plant des parties aériennes est reporté sur la première ligne pour information.

Paramètres	Doses de Ni (mg.kg <sup>-1</sup> de sol)						C.V. (%)	Proba- bilité
	0	40	80	160	320	640		
PMS (g.plt <sup>-1</sup> )	27,21	18,74	14,73	11,81	9,44	6,14	21,6	1,000
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (meq.l <sup>-1</sup> )	0,01	0,13	0,01	0,18	0,24	0,23	138,8	0,872
Cl <sup>-</sup> -	0,19	0,20	0,21	0,27	0,28	0,32	24,8	0,994
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -	14,38	19,07	18,97	22,08	22,53	26,74	11,8	1,000
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -	7,04	10,53	10,24	13,29	14,07	20,33	23,1	1,000
PO <sub>4</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	22,58	20,19	20,06	21,93	19,19	14,55	34,0	0,600
Ca <sup>2+</sup> (meq.l <sup>-1</sup> )	7,78	11,80	12,65	13,73	15,39	20,35	21,0	1,000
Mg <sup>2+</sup> -	9,09	13,88	14,89	16,13	18,19	24,07	20,9	1,000
K <sup>+</sup> -	0,87	0,75	0,69	0,94	0,86	0,74	38,2	0,278
Na <sup>+</sup> -	0,58	0,77	0,79	0,88	0,89	1,08	14,0	1,000
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -	4,10	3,57	2,41	4,51	2,87	1,58	62,2	0,862
Fe (mg.l <sup>-1</sup> )	0,34	0,14	0,28	0,12	0,26	0,41	117,3	0,431
Mn -	0,42	0,37	0,07	0,08	0,33	0,06	150,7	0,763
Ni -	0,12	3,81	5,87	22,48	41,08	60,49	81,5	0,999

C.V. : coefficient de variation; PMS : poids total de matière sèche des plants à 36 j.

## ANNEXE 6

CALCUL DE LA FORCE IONIQUE ET DES ACTIVITÉS IONIQUES  
PAR LE PROGRAMME GEOCHEM

⇒ La force ionique de la solution est calculée par la formule :

$$\mu = \frac{1}{2} \times \sum_i C_i \times Z_i^2$$

où  $C_i$  est la concentration de chaque ion dans la solution en mol.l<sup>-1</sup>

et  $Z_i$  la valence de chaque ion.

$\mu$  peut être exprimé en mol.l<sup>-1</sup> ou rester sans dimension.

⇒ L'activité des ions est calculée par la formule de Debye-Hückel :

$$\{\text{activité}\} = [\text{concentration de l'ion en mol.l}^{-1}] \times \text{coefficient d'activité}$$

$$\text{où coefficient d'activité} = 10 \exp \left( - \frac{A \times Z_i^2 \times \mu^{0,5}}{1 + B \times a_i \times \mu^{0,5}} \right)$$

avec  $\mu$  = force ionique de la solution ;  $Z_i$  = charge ionique de l'ion  $i$  ;  $A = 0,509$  et

$B = 0,329$  à 25 °C ;  $a_i$  = diamètre de l'ion  $i$  hydraté en Angström = 8 pour  $Mg^{2+}$  , et

6 pour  $Ca^{2+}$  et  $Ni^{2+}$ .

(Kielland, 1937; Adams, 1971).

## ANNEXE 7

**Influence du nickel sur l'évolution de l'acidification du milieu par les racines des maïs XL 94.** Les plants ont été cultivés pendant 3 jours sur solution de Hoagland diluée 10 fois à pH 5,3. Des lots de 36 racines excisées ont été ensuite mis à incuber dans 75 ml de solution fraîche de Hoagland 1/10 ajustée à pH 6,00, contenant différentes concentrations de NiCl<sub>2</sub>, ou 50 µM de vanadate. Température = 25 ± 0,5 °C.

Temps (min)	0 Ni	25 µM Ni	60 µM Ni	50 µM vanadate
0	5,9	5,9	5,95	5,96
1		5,86	5,89	
2	5,8	5,83	5,83	5,94
3		5,8	5,81	
4	5,7	5,77	5,78	5,93
5		5,75	5,76	
6		5,73	5,74	
7	5,55	5,71	5,72	5,91
8		5,69	5,7	
9			5,68	
10	5,46	5,66	5,67	
11	5,43		5,66	5,88
12	5,41	5,64	5,65	
14		5,62	5,64	
15	5,38		5,63	
16		5,6	5,62	5,87
18		5,58	5,61	
19			5,6	
20	5,35	5,56		
21			5,59	
22	5,34	5,54		
23			5,58	
24		5,53	5,57	5,85
25	5,33			
26		5,52	5,56	
28		5,5	5,55	
30	5,31		5,53	5,84
36			5,51	
65		5,42		
68			5,47	
90		5,4		
99	5,04			
100				5,77
117				5,75
142		5,37	5,46	
160				5,71
190	4,84	5,35		5,7
240	4,8	5,33	5,45	5,67
360	4,79	5,3	5,44	5,66
430	4,79	5,2	5,45	

**RÉSUMÉ** : La mobilité et la biodisponibilité du nickel ont été caractérisées dans les sols ferrallitiques ferritiques de Nouvelle-Calédonie. Il s'avère qu'elles sont plus élevées dans les sols de plaine qu'en piedmont. Cette différence proviendrait principalement de la présence de Ni lié à de la goethite en plaine.

En outre, des seuils de toxicité de Ni dans la plante et dans la solution ont été définis. Ainsi, la croissance du maïs, au stade 75 cm de haut au niveau de la ligule de la 9<sup>e</sup> feuille dégainée, est significativement ralentie lorsque ses parties aériennes contiennent plus de  $12 \pm 3 \mu\text{g}$  de Ni.g<sup>-1</sup> MS. Dans la solution, le seuil défini est un indice de toxicité tenant compte des activités de Ni, Ca et Mg.

Les effets toxiques du nickel sur la physiologie du maïs sont nombreux. Il apparaît que Ni diminue principalement l'activité mitotique du méristème racinaire, soit par une réduction de l'apport de saccharose suite à un blocage de la dégradation de l'amidon dans les chloroplastes des cellules de la gaine périvasculaire, soit par une fixation au niveau du méristème pour en perturber gravement le fonctionnement. Par ailleurs, Ni diminue également l'activité pompe à protons de l'ATPase plasmalemmique des racines. D'autre part, des différences de sensibilité au nickel ont été mises en évidence entre deux cultivars de maïs. Les implications de ces résultats sur la physiologie du maïs sont discutées.

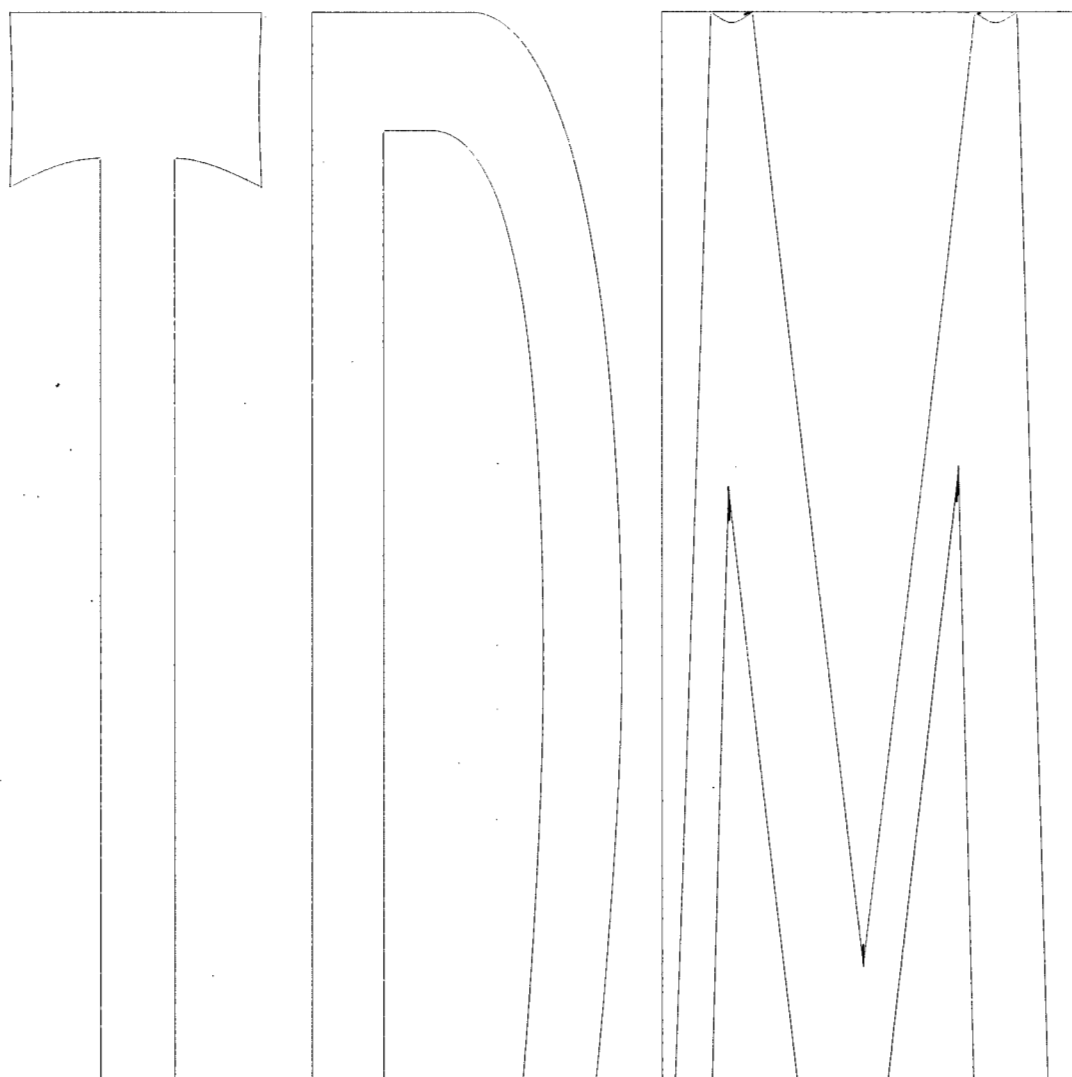
**Mots-clés** : Nickel, Toxicité, Sols ferrallitiques ferritiques, Biodisponibilité, Développement, Physiologie, Maïs.

**ABSTRACT** : Nickel mobility and bio-availability have been characterised in Oxisols (sols ferrallitiques ferritiques) in New Caledonia. It turns out that they are higher in plains when comparing to piedmonts. This difference could be the result of Ni bound to goethite in plain soils.

Furthermore, the upper critical Ni concentration in the plant and in solution have been established. Maize growth is significantly reduced with  $12 \pm 3 \mu\text{g}$  Ni. g<sup>-1</sup> DW in the shoots when their height is 75 cm at the level of the 9th leave ligule. The toxic threshold in solution is a toxicity index depending on the activity of Ni, Ca and Mg.

Ni toxic effects on maize physiology are numerous. It appears that Ni mainly reduces root meristem mitotic activity, either by a reduction of sucrose supply due to an inhibition of starch degradation in the bundle sheath cell chloroplasts, or by a Ni-binding at the meristem level leading to a serious disturbance of its functioning. Moreover, Ni also decreases H<sup>+</sup>-pump activity of root plasmalemma ATPases. Differences in Ni sensitivity have been found between two maize cultivars. Physiological implications of Ni toxicity are discussed.

**Key-words** : Nickel, Toxicity, Oxisols, Bioavailability, Development, Physiology, Maize.



## Thèses et documents microfichés

**Mots-clés**

Nickel, Toxicité, Sols ferrallitiques, Biodisponibilité, Développement, Physiologie, Maïs.



209-213, rue La Fayette  
75480 Paris cedex 10

ISSN : 0767-922X  
ISBN : 2-7099-1328-3

Diffusion :  
32, avenue Henri Varagnat  
93143 Bondy cedex