

CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES  
EN SCIENCES AGRONOMIQUES  
(Montpellier SupAgro)

ECOLE DOCTORALE  
Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosiences et Environnement  
(SIBAGHE)

**DOCTORAT**

Discipline : Sciences du sol

**Aurélia MICHAUD**

**Interaction entre biodisponibilité, phytotoxicité du cuivre  
et nutrition en fer de graminées  
- mécanismes physiologiques et rhizosphériques -**

Thèse dirigée par Philippe HINSINGER

Soutenue le 4 octobre 2007

**Membres du Jury :**

Jean-François BRIAT	Directeur de Recherche, CNRS Montpellier	Président
Michel MENCH	Directeur de Recherche, INRA Bordeaux	Rapporteur
Erik SMOLDERS	Professeur, Katholieke Universiteit Leuven, Belgique	Rapporteur
Marc BENEDETTI	Professeur, Université Paris 7 – Denis Diderot	Examineur
Pierre CZERNIC	Maître de Conférence, Université de Montpellier 2	Examineur
Philippe HINSINGER	Directeur de Recherche, INRA Montpellier	Directeur de thèse

## Résumé

---

La contamination en cuivre (Cu) des sols à antécédent viticole soulève la question des risques écotoxicologiques associés à la phytotoxicité de Cu pour des cultures succédant à la vigne. L'objectif de cette étude était de préciser le déterminisme de la biodisponibilité et de la phytotoxicité de Cu en sols calcaires chez le blé dur, en étudiant l'interaction avec la nutrition en fer (Fe). Cette étude a mis en évidence *in situ* une phytotoxicité de Cu chez le blé dur cultivé en sols calcaires à antécédent viticole visible au travers de chloroses ferriques et reliée à un antagonisme entre Fe et Cu. Sous conditions contrôlées au laboratoire, un excès de Cu a été relié à la mise en place d'une déficience en Fe et à l'augmentation de la libération induite par les racines de complexants. Des seuils de phytotoxicité de Cu ont été déterminés au niveau des racines concordant avec ceux obtenus *in situ* au champ (teneurs en Cu dans la matière sèche racinaire de 100-150 et 250-300 mg kg<sup>-1</sup> correspondant respectivement à une phytotoxicité de Cu modérée et sévère). D'autre part, la biodisponibilité de Cu a augmenté sous déficience en Fe, en lien possible avec l'augmentation de la libération par les racines de complexants de Cu (vraisemblablement des phytosidérophores susceptibles de complexer Cu, voire de favoriser son absorption). La biodisponibilité de Cu était reliée à des changements d'extractibilité de Cu (diminution de Cu extractible à l'eau et au pyrophosphate de potassium) dans la rhizosphère. Ce travail a montré qu'il existait une interaction complexe entre biodisponibilité, phytotoxicité de Cu et nutrition en Fe chez les céréales pouvant expliquer la mise en place d'une phytotoxicité de Cu chez du blé dur cultivé en sols calcaires à antécédent viticole.

### *Mots clés*

Biodisponibilité, céréale, cuivre, fer, phytosidérophore, phytotoxicité, rhizosphère

### **Thèse réalisée à :**

INRA – Montpellier SupAgro  
UMR 1222 Biogéochimie du Sol et de la Rhizosphère  
2 Place Viala  
34060 Montpellier cedex 1

# **Interaction between copper bioavailability, phytotoxicity and iron nutrition in Gramineous species - physiological and rhizospheric mechanisms -**

## **Abstract**

---

Soil copper (Cu) contamination of former vineyard soils raised the question of ecotoxicological risks associated with Cu phytotoxicity for succeeding crops. The aim of the present work was to study the determinism of Cu bioavailability and phytotoxicity for durum wheat cropped in former vineyard calcareous soils, as related to iron (Fe) nutrition. This study showed *in situ* that Cu phytotoxicity was induced in durum wheat cropped in Cu-contaminated former vineyard, calcareous soils as evidenced by Fe chlorosis and as related to an antagonism between Fe and Cu. Under controlled conditions in the laboratory, excess Cu was related to induced Fe-deficiency and to increased root-induced release of complexing compounds. Threshold values of Cu phytotoxicity were determined in roots and agreed with those obtained *in situ* in field-grown plants (Cu concentrations in the root dry matter of 100-150 and 250-300 mg kg<sup>-1</sup> corresponding to moderate and severe phytotoxicity, respectively). Copper bioavailability which increased as a response to Fe-deficiency was possibly related to an increase in root-induced release of complexing compounds (presumably phytosiderophores which may complex Cu and possibly enhance its uptake). Copper bioavailability was associated to changes in Cu extractability (decrease in water-extractable Cu and potassium pyrophosphate-extractable Cu) in the rhizosphere. This work showed that a complex interaction between Cu bioavailability, phytotoxicity and Fe nutrition occurs in cereals which may explain that Cu phytotoxicity occurred in durum wheat cropped in former vineyard, calcareous soils.

### *Keywords*

Bioavailability, cereal, copper, iron, phytosiderophore, phytotoxicity, rhizosphere

# SOMMAIRE

---

<b>Introduction</b>	9
<b>Chapitre I : Analyse Bibliographique</b>	11
<b>I.1. Concept de biodisponibilité</b>	11
I.1.1. Définition	11
I.1.2. Evaluation de la biodisponibilité	12
Mesures chimiques – évaluation de la disponibilité environnementale	
Mesures biologiques – évaluation de la biodisponibilité	
<b>I.2. Le cuivre dans le sol</b>	15
I.2.1. Fond pédogéochimique et sources de contamination des sols en cuivre	15
I.2.2. Spéciation du cuivre dans le sol	16
Spéciation du cuivre en solution	
Spéciation du cuivre en phase solide	
I.2.3. Facteurs gouvernant la disponibilité environnementale du cuivre	18
<b>I.3. Le cuivre dans la plante</b>	21
I.3.1. Le cuivre, oligo-élément	21
Absorption	
Distribution dans la plante	
Rôles physiologiques	
I.3.2. Le cuivre, élément phytotoxique	23
Rhizotoxicité	
Déficience induite en fer et chloroses	
Tolérance	
I.3.3. Activités rhizosphériques et biodisponibilité environnementale du cuivre	27
La rhizosphère	
Activités racinaires et biodisponibilité environnementale du cuivre	
Activités microbiennes et biodisponibilité environnementale du cuivre	
<b>I.4. Acquisition du fer chez les graminées</b>	31
I.4.1. La stratégie des graminées	33
Synthèse des phytosidérophores	
Sécrétion des phytosidérophores	
Propriétés des phytosidérophores et mobilisation du fer	
Transport du complexe fer-phytosidérophore	
Méthodes de détermination des phytosidérophores	

I.4.2. Différence de sensibilité à la déficience en fer inter- et intraspécifique chez les céréales	37
I.4.3. Interaction avec la biodisponibilité environnementale des métaux	38
<b>I.5. Hypothèses et objectifs</b>	41
I.5.1. Hypothèses de travail	41
I.5.2. Objectifs de l'étude	41
Premier objectif	
Deuxième objectif	
Stratégie de recherche	

## **Chapitre II : Phytotoxicité de Cu en sols calcaires chez les céréales**

---

<b>Introduction</b>	43
<b>'Copper uptake and phytotoxicity as assessed <i>in situ</i> for durum wheat (<i>Triticum turgidum durum</i> L.) cultivated in Cu-contaminated, former vineyard soils'</b>	44
Abstract	45
II.1.1. Introduction	46
II.1.2. Materials and methods	47
<i>In situ</i> sampling of soils and plants	
Plant analyses	
Soil analyses	
Statistical analyses	
II.1.3. Results	49
Soil Cu concentration	
Plant Cu and Fe concentration	
Relationships between plant Cu concentration and soil properties	
Chemical changes in the rhizosphere	
II.1.4. Discussion	57
Plant Cu uptake and Cu phytotoxicity in field-grown plants	
Interaction between Fe nutrition and Cu phytotoxicity	
Plant Cu concentration <i>versus</i> soil properties	
Root-induced changes in the rhizosphere of field-grown plants	
II.1.5. Acknowledgments	60
II.1.6. References	60

**“Differential response to induced Fe-deficiency among 20 genotypes of durum wheat, bread wheat and triticale cropped in Cu-contaminated, calcareous soils”** 63

Abstract 64

II.2.1. Introduction 65

II.2.2. Materials and methods 66

Soils and plants

Field experimental design and plant sampling

Plant analyses

Statistical analyses

II.2.3. Results 69

Plant growth

Plant Cu and Fe contents

Cu and Fe accumulated in shoots and 1000-grain weight

II.2.4. Discussion 77

Differential sensitivity to induced Fe-deficiency

Plant growth and Cu phytotoxicity

Variation between the two study sites

II.2.5. Acknowledgments 80

II.2.6. References 80

**Chapitre III : Caractérisation de la phytotoxicité de Cu chez le blé dur** 83

---

**Introduction** 83

**‘Copper phytotoxicity affects root elongation and iron nutrition in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.)’** 84

Abstract 85

III.1. Introduction 86

III.2. Materials and methods 87

Plant growth conditions

Collection and quantification of root exudates

Plant analyses

Statistical analyses

III.3. Results 90

Copper speciation in nutrient solutions

Visual symptoms and plant growth

Plant Cu and Fe concentration

Root elongation

Plant Cu and Fe uptake

Estimated root-induced release of complexing compounds

III.4. Discussion	99
Plant Cu uptake	
Root elongation as affected by Cu phytotoxicity	
Iron nutrition as affected by Cu phytotoxicity	
III.5. Acknowledgments	103
III.6. References	103

## **Chapitre IV : Biodisponibilité de Cu chez le blé dur, effet de la déficience en Fe et modifications chimiques induites dans la rhizosphère**

---

<b>Introduction</b>	106
<b>‘Copper uptake and phytotoxicity as affected by Fe deficiency in durum wheat (<i>Triticum turgidum durum</i> L.)’</b>	107
Abstract	108
IV.1.1. Introduction	109
IV.1.2. Materials and methods	110
Plant growth conditions	
Hydroponic experiment	
Soil experiment	
Collection and quantification of root exudates	
Plant analyses	
Statistical analyses	
IV.1.3. Results	112
Visual symptoms and biomass	
Cu and Fe concentration	
Amount of Cu accumulated in plants	
Copper complexing capacity of root exudates	
Root elongation	
IV.1.4. Discussion	119
Cu uptake and phytotoxicity	
Cu uptake as affected by Fe deficiency	
IV.1.5. Acknowledgments	122
IV.1.6. References	122

<b>‘Cu bioavailability in a range of Cu-contaminated, neutral to alkaline soils as related to root-induced chemical changes in the rhizosphere of durum wheat’</b>	125
Abstract	126
IV.2.1. Introduction	127
IV.2.2. Materials and methods	128
Soils samples	
Plant growth conditions	
Plant analyses	
Soil analyses	
Statistical analyses	
IV.2.3. Results	131
Plant growth and visual symptoms	
Cu and Fe contents	
Cu bioavailability	
Relationships between Cu bioavailability and soil extractable Cu	
Chemical changes in the rhizosphere	
IV.2.4. Discussion	139
Plant Cu content and Cu bioavailability	
Root-induced changes in chemical properties in the rhizosphere	
IV.2.5. Acknowledgments	142
IV.2.6. References	142
<b>Conclusions et perspectives</b>	145
<hr/>	
<b>Remerciements</b>	163
<hr/>	
<b>Références bibliographiques</b>	165
<hr/>	
<b>Annexes</b>	178
<hr/>	



## Introduction

---

Le mildiou de la vigne fut introduit en Europe au cours du 19<sup>ème</sup> siècle par l'importation d'espèces de vigne issues du continent américain accompagnées du champignon phytopathogène *Plasmopara viticola*. L'application massive et répétée de fongicides à base de sels de cuivre (parmi lesquels la formulation la plus célèbre est la bouillie bordelaise) pour lutter contre cette maladie a conduit à l'accumulation de cuivre (Cu) dans les horizons superficiels des sols et à une pollution diffuse des sols viticoles. La crise viticole, engendrée dès les années 1970 par la concurrence internationale et la décroissance de la consommation de vin de table, a provoqué l'arrachage massif de vignes en France et particulièrement en Languedoc-Roussillon. Dans cette région historiquement viticole, où la vigne demeure encore la principale culture, plus du tiers de la surface viticole ont ainsi été arrachés, soit plus de 150 000 ha, et remplacés par d'autres cultures, principalement le blé dur. La crise viticole actuelle que connaît cette région et l'ensemble du vignoble européen face à la concurrence des vins du nouveau monde amène à une recrudescence de l'arrachage, qui devrait désormais toucher d'autres vignobles que le seul vignoble languedocien.

Le cuivre est à la fois un fongicide et un bactéricide puissant capable d'altérer la structure des communautés et les processus microbiens (comme la respiration) et un métal particulièrement phytotoxique (Chaney 1980 ; Wheeler et Power 1995 ; Cetois et al. 2003 ; Ranjard et al. 2006 ; Sauvé 2006). Par conséquent, la pollution diffuse en Cu des sols viticoles entraîne un risque de toxicité élevé pour les organismes du sol et particulièrement de phytotoxicité pour les cultures. Bien que la vigne soit peu sensible à la contamination des sols en Cu du fait de son enracinement en profondeur, sous la couche d'accumulation de Cu, des problèmes de phytotoxicité sont apparus lors de replantations de jeunes plants de vignes (Brun 1998 ; Garcia 2004). D'autre part, des problèmes de phytotoxicité, visibles au travers de chloroses internervaires, sont apparus sur des céréales emblavées sur des sols à antécédent viticole, particulièrement du blé dur cultivé en sols calcaires en Languedoc-Roussillon (Braun 2006). Coullery (1997) avait rapporté antérieurement une sensibilité particulière des graminées en sols calcaires à antécédent viticole en Suisse. Se pose alors la question des risques écotoxicologiques d'une telle pollution qui nécessite de déterminer la biodisponibilité de Cu pour ces cultures, notamment en sols calcaires où sont observés les symptômes de phytotoxicité en Languedoc-Roussillon. D'ailleurs, cette question relève actuellement d'enjeux agronomiques et économiques dans cette région qui produit plus du cinquième de la production nationale de blé dur.

Les régions arides et semi arides, comme les régions méditerranéennes, sont caractérisées par une forte proportion de sols calcaires qui présentent une faible disponibilité en fer (Fe) et en zinc (Zn). Les graminées ont développé une stratégie particulière d'acquisition de Fe, et vraisemblablement de Zn, et qui est efficace y compris en sols calcaires : celle-ci repose sur la sécrétion de complexants du fer ferrique, les phytosidérophores (Cakmak et al. 1998 ; Römheld 1987 ; Suzuki et al. 2006). L'efficacité de cette stratégie diffère néanmoins entre espèces. Ainsi, l'efficacité du blé dur et sa résistance à la déficience en Fe, généralement induite en sols calcaires, sont inférieures à celles du blé tendre, de l'orge et du seigle (Cakmak et al. 1997, 1998 ; Kalayci et al. 1999 ; Rengel et Römheld 2000a, b). D'autre part, cette stratégie d'acquisition de Fe des céréales semble pouvoir augmenter la biodisponibilité d'éléments en traces métalliques comme le cadmium (Cd), le nickel (Ni) et Cu en sols calcaires (Treeby et al. 1989 ; Awad et Römheld 2000 ; Chaignon et al. 2002b ; Meda et al.

2007). A l'inverse, la complexation de métaux, particulièrement Cu, avec les phytosidérophores pourrait inhiber l'acquisition de Fe (Zhang et al. 1991 ; Ma et Nomoto 1993 ; Reichman et Parker 2005). De plus, la phytotoxicité de Cu et Ni est connue pour induire une rhizotoxicité pouvant être supérieure avec l'augmentation du pH (Lexmond et van der Vorm 1981 ; Zhao et al. 2006 ; Rooney et al. 2007) et parfois une déficience induite en Fe et des symptômes de chlorose ferrique (Marschner 1995 ; McBride 2001 ; Kopittke et Menzies 2006). Ceci suggère que la biodisponibilité et la phytotoxicité de Cu pourraient interagir avec la nutrition en Fe chez les céréales.

Dans ce contexte, l'objectif général de l'étude est de préciser le déterminisme de la biodisponibilité et de la phytotoxicité de Cu en sols calcaires chez les céréales, avec le blé dur comme plante modèle, en étudiant l'interaction avec la nutrition en Fe. Plus précisément, il s'agira de mettre en évidence la phytotoxicité de Cu en sols calcaires pour du blé dur cultivé *in situ* au champ et de préciser les mécanismes pouvant conduire à cette phytotoxicité, c'est-à-dire l'interaction entre la biodisponibilité de Cu et la nutrition en Fe chez les céréales.

# Chapitre I : Analyse Bibliographique

---

## I.1. Concept de biodisponibilité

### I.1.1. Définition

Les réponses des organismes (individus ou populations) à un contaminant du sol ne sont pas forcément affectées par la concentration totale du contaminant dans le sol, mais par la fraction qui est biologiquement disponible sur un temps donné en fonction des conditions particulières du sol (Harmsen et al. 2005). Ainsi, déterminer la biodisponibilité des contaminants organiques (e.g. hydrocarbures aromatiques polycycliques, pesticides) et minéraux (métaux, métalloïdes, radionucléides) est une étape nécessaire pour déterminer les risques écotoxicologiques pour les organismes vivants dans des sols contaminés naturellement (par exemple les sols développés sur des roches ultrabasiques telles que les serpentines) ou suite à des activités anthropiques (sols agricoles, friches industrielles).

Les définitions de Juste (1988) et de Thornton (1999) considéraient la biodisponibilité comme étant soit la fraction d'un élément (nutritif et/ou potentiellement toxique), présent dans le sol et disponible pour l'assimilation par des racines ou des microorganismes du sol et autre flore et faune, soit la fraction poussière et/ou nourriture qui est bioaccessible dans le sol. Depuis, une définition conceptuelle de la biodisponibilité a été donnée dans la norme ISO/DIS 11074 (International Organization for Standardization, 2004) : selon celle-ci, la biodisponibilité représente le degré par lequel des substances chimiques présentes dans le sol peuvent être absorbées ou métabolisées par un récepteur humain ou écologique, ou peuvent être disponibles pour une interaction avec des systèmes biologiques.

Ces définitions ne prennent pas clairement en compte des facteurs clés gouvernant la biodisponibilité, tels que la dépendance au temps d'exposition, le transfert du sol vers l'organisme cible, le flux pour des espèces biologiques spécifiques, l'accumulation, les effets ultérieurs du contaminant et une éventuelle acclimatation (Peijnenburg et al. 1997 ; Harmsen et al. 2005). Ainsi, la biodisponibilité devrait plutôt être considérée comme la résultante de processus dynamiques comprenant, un ensemble de processus physico-chimiques aboutissant au passage en solution du contaminant puis par des processus physiologiques propres à l'organisme et qui déterminent le prélèvement du contaminant. Elle est *in fine* décrite par les trois composantes suivantes (Peijnenburg et al. 1997, 2000 ; Peijnenburg et Jager 2003 ; Lanno et al. 2004) (Figure 1) :

- (1) la fraction du contaminant du sol qui est potentiellement disponible pour des organismes cibles et qui résulte de processus purement physico-chimiques : il s'agit de la disponibilité environnementale
- (2) la fraction du contaminant disponible pour l'absorption par un mécanisme physiologique par l'organisme cible : elle représente la biodisponibilité environnementale
- (3) l'accumulation et/ou l'effet du contaminant dans l'organisme : cette dernière correspond à la biodisponibilité toxicologique.

De telles considérations ont amené Harmsen et al. (2005) à proposer une définition opérationnelle de la biodisponibilité : la biodisponibilité correspond au prélèvement (aboutissant à une accumulation ou à un effet) d'un composé par un organisme donné pendant une période de temps fixée à partir d'une unité de masse de sol impliquée. C'est cette définition que nous retiendrons dans la suite de ce travail.

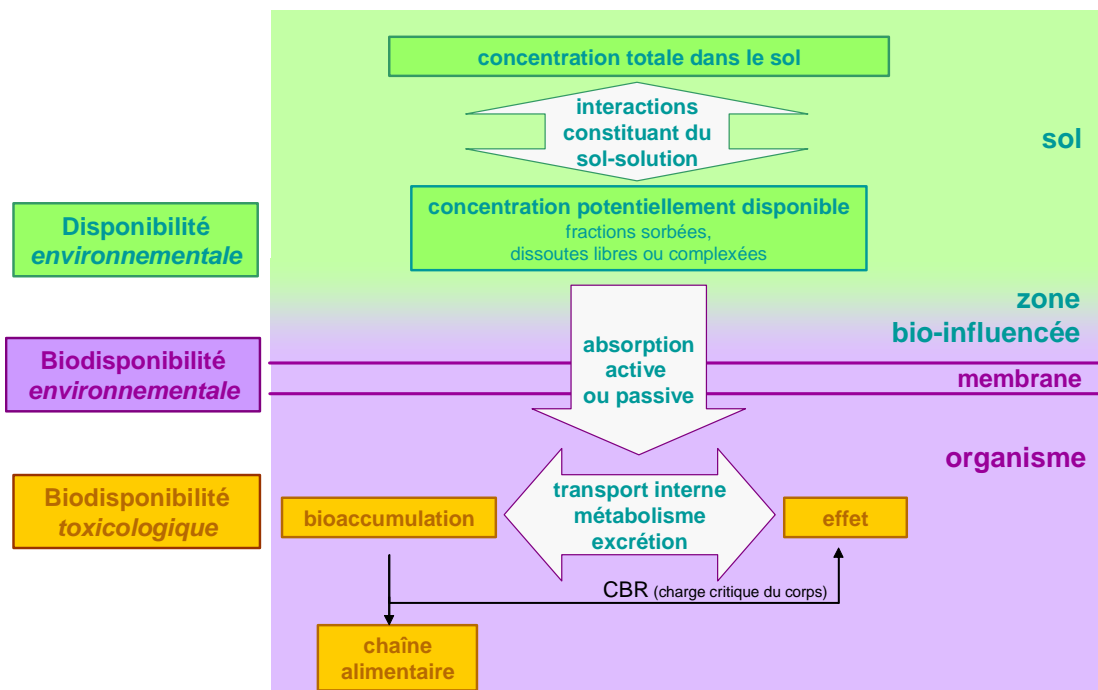


Figure 1 Concepts de biodisponibilité (d'après ISO/DIS17402, Lanno et al. 2004)

### I.1.2. Evaluation de la biodisponibilité

La biodisponibilité d'un composé peut être évaluée via des mesures chimiques permettant d'estimer la fraction disponible (disponibilité environnementale) et des mesures biologiques évaluant l'absorption, la bioaccumulation et la toxicité (biodisponibilité) (Figure 2).

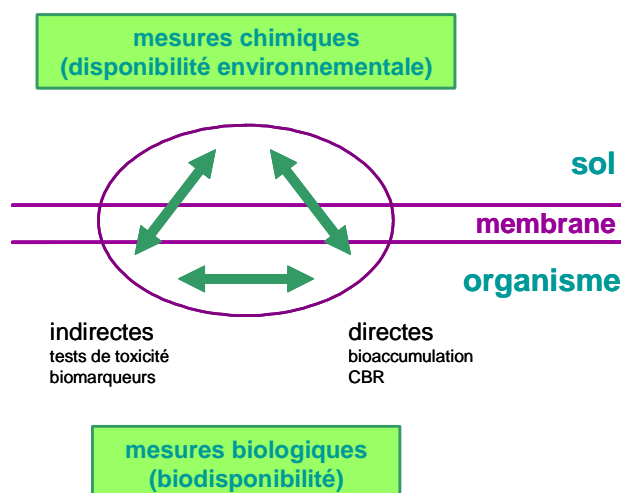


Figure 2 Les méthodes pour évaluer la biodisponibilité – relation entre mesures chimiques et biologiques (directes et indirectes) (d'après ISO/DIS 17402 ; Lanno et al. 2004)

## Mesures chimiques – évaluation de la disponibilité environnementale

Les mesures chimiques peuvent être groupées en deux catégories : (a) les mesures évaluant la fraction réellement disponible et accessible (disponibilité réelle) et (b) les mesures déterminant la fraction potentiellement disponible et accessible avec le temps en fonction des conditions chimiques (disponibilité potentielle) (Peijnenburg et Jager 2003 ; Harmsen et al. 2005).

### (a) Les mesures pour estimer la disponibilité réelle

- la centrifugation ainsi que l'extraction à l'eau ou avec des sels dilués ( $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) permettent d'extraire l'eau interstitielle du sol et d'estimer la concentration totale du contaminant présent dans la solution du sol (Lebourg et al. 1994, 1996, 1998 ; Harmsen et al. 2005 ; ISO/DIS 17402 2006)
- les électrodes sélectives d'ions (ISE), les résines échangeuses, la technique de la membrane de Donnan (DMT) permettent de déterminer la concentration en espèce ionique libre en solution pour certains métaux tels que Cu (Sauvé et al. 1995, 1996 ; Peijnenburg et Jager 2003 ; Zhang et Young 2006)
- les méthodes de voltamétrie (Differential-Pulse Polarography (DPP) et Differential-Pulse Anodic Stripping Voltammetry (DPASV)) et la technique de la DGT (Diffuse Gradient in Thin Films) permettent d'évaluer le pool labile de contaminants métalliques (Zhang et al. 1998, 2001 ; Peijnenburg et Jager 2003 ; Zhang et Young 2006).

### (b) Les mesures basées sur des extractions chimiques parmi les plus utilisées pour évaluer la disponibilité potentielle

- les extractions basées sur des solutions salines non tamponnées ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) permettent la mise en solution d'éléments en traces métalliques par des processus d'échange cationique. Elles miment la fraction de l'élément à la fois présent en solution et potentiellement mobilisable à partir de la phase solide, notamment la fraction dite échangeable par simple modification de pH et échange cationique.
- les extractions basées sur des complexants comme l'EDTA (éthylènediamine tétra-acétate) et le DTPA (diéthylènetriamine penta-acétate) sont couramment employées pour estimer la disponibilité des éléments en traces métalliques bien qu'elles surestiment les fractions potentiellement biodisponibles pour les organismes en extrayant une fraction plus fortement liée à la phase solide. Une extraction cinétique avec de l'EDTA a également été développée pour distinguer des pools plus ou moins labiles (Lebourg et al. 1994, 1996, 1998 ; Peijnenburg et Jager 2003 ; Bermond et al. 2005 ; Young et al. 2006).

Les méthodes fondées sur des extractions chimiques présentent néanmoins des inconvénients inhérents à leur faible sélectivité et à la redistribution des métaux pendant l'extraction. Outre ces méthodes, l'utilisation de modèles pour déterminer la spéciation en solution (par exemple GEOCHEM-PC, MINEQL, WHAM) et de méthodes physiques comme les techniques isotopiques (dilution isotopique) permettent également d'étudier la disponibilité des éléments en traces métalliques (Peijnenburg et Jager 2003 ; Young et al. 2006).

Les mesures chimiques relativement simples, rapides et peu onéreuses sont employées pour estimer la fraction disponible d'un composé dans un sol mais ne peuvent réellement

renseigner sa biodisponibilité sans corrélation préalable avec la réponse des organismes considérés qui peuvent présenter des systèmes d'absorption spécifiques et modifier leur environnement immédiat (la zone bio-influencée dans la Figure 1) et *in fine* la biodisponibilité (Figure 2). En effet, ces mesures sont souvent basées sur des extractions chimiques mimant les phénomènes contrôlant la disponibilité des composés et non leur biodisponibilité (Lebourg et al. 1996).

### **Mesures biologiques – évaluation de la biodisponibilité**

Les mesures biologiques de détermination de la biodisponibilité peuvent être divisées en mesures directes et indirectes (Figure 2).

Les mesures directes permettent d'évaluer (i) la quantité de contaminant prélevée (bioaccumulée) en considérant les facteurs biotiques (e.g. métabolisme) et abiotiques (e.g. pH, contenu en matière organique) qui modifient la biodisponibilité du contaminant et (ii) la concentration interne accumulée dans un tissu, organe ou le corps entier qui est corrélée avec un effet préjudiciable (effet léthal ou sub-léthal), c'est-à-dire la charge critique du corps en résidu (Critical Body Residue (CBR), biodisponibilité toxicologique) (Lanno et al. 2004). Chaignon et Hinsinger (2003) ont développé un biotest permettant de mesurer le prélèvement de contaminants minéraux en traces comme Cu à partir du sol pendant une période de temps fixée et d'évaluer la biodisponibilité environnementale.

Les mesures indirectes d'estimation de la biodisponibilité sont basées sur des méthodes de détermination de biomarqueurs (par exemple l'induction ou l'inhibition d'enzymes, l'induction de métallothionéines) et des tests d'écotoxicité (induction ou inhibition d'activités microbiennes, reproduction, mortalité, croissance) (Lanno et al. 2004). Ces méthodes indirectes peuvent être non spécifiques (par exemple la mortalité, les effets sur la reproduction) et spécifiques de groupes de contaminants (par exemple l'induction de métallothionéines). Par ailleurs, les tests écotoxicologiques peuvent prendre en compte différents niveaux d'effet : moléculaire (ADN), cellulaire, métabolique (activités enzymatiques, biomarqueurs), individuel (accumulation, mortalité, reproduction, motricité, activité), populationnel (abondance, diversité, distribution) et communautaire (diversité, dominance, succession). Pour les éléments en traces métalliques, des tests écotoxicologiques tels que le test de germination des graines, d'élongation racinaire et de biomasse relative des parties aériennes permettent d'évaluer le niveau de contamination d'un sol et la biodisponibilité (Rooney et al. 2006, 2007 ; Thakali et al. 2006a, b ; Zhao et al. 2006).

## I.2. Le cuivre dans le sol

### I.2.1 Fond pédogéochimique et sources de contamination des sols en cuivre

Le fond pédogéochimique moyen de cuivre (Cu) s'élève à 15-30 mg kg<sup>-1</sup> (Baker et Senft 1995 ; Baize et Tercé 2002 ; Adriano 2001). Des émissions naturelles de Cu dans l'atmosphère provenant de poussières et d'aérosols produits par l'érosion éolienne, les éruptions volcaniques, les sels marins et les feux de forêts peuvent parvenir aux sols et modifier leurs teneurs en Cu (Bourrelier et Berthelin 1998 ; Cetois et al. 2003).

Certaines activités anthropiques sont à l'origine d'un enrichissement des sols en éléments en traces métalliques comme le cadmium (Cd), le zinc (Zn), le nickel (Ni), le plomb (Pb) et Cu. Parmi les sources industrielles et urbaines de contamination des sols en Cu, l'activité minière et le traitement des minerais, l'utilisation d'installations électriques (câblages) en Cu ainsi que la production et l'incinération de déchets municipaux provoquent une pollution localisée des sols. D'autre part, l'épandage de boues de station d'épuration, de déchets municipaux et de déjections animales (volailles, porcs, bovins), pouvant contenir des éléments en traces métalliques comme Cu, peuvent provoquer une pollution diffuse des terres agricoles (Tiller et Merry 1981 ; Baker et Senft 1995 ; Bourrelier et Berthelin 1998).

Outre ces apports anthropiques, la source principale de pollution des sols en Cu est l'utilisation de fongicides à base de Cu dans les vignobles, les vergers et pour d'autres cultures sensibles à des maladies cryptogamiques (notamment pommes de terre, houblon et tomates) (Tiller et Merry 1981). L'action protectrice des sels de Cu contre le mildiou (champignon phytopathogène *Plasmopara viticola*) a été découverte fortuitement à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle. Depuis, l'utilisation de formulations à base de Cu (par exemple la bouillie bordelaise, Ca(OH)<sub>2</sub> + CuSO<sub>4</sub>) comme fongicides en viticulture s'est généralisée dans toutes les régions viticoles françaises et particulièrement en Languedoc-Roussillon, où la vigne fut de longue date la principale culture de la région (Tiller et Merry 1981 ; Chaignon 2001). Une telle utilisation de sels de Cu sur les vignes a conduit à l'accumulation continue de Cu dans les horizons superficiels des sols viticoles, multipliant ainsi par un facteur de 10 à 100 les teneurs naturelles des sols (Brun 1998 ; Chaignon 2001). D'ailleurs, des concentrations de 200 à 1000 mg kg<sup>-1</sup> souvent observées dans de tels sols, sont bien au-dessus des normes fixées en France pour l'épandage de boues de station d'épuration de 100 mg kg<sup>-1</sup> pour Cu (Flores-Vélez et al. 1996 ; NFU44-041 1999 ; Baize et Tercé 2002). Bien que la consommation de fongicides à base de Cu ait baissé depuis le développement de produits organiques de synthèse actifs contre le mildiou, leur utilisation s'est néanmoins maintenue du fait de leur plus forte persistance et efficacité. Les sels de Cu restent actuellement les seuls fongicides autorisés en agriculture biologique (Brun 1998). D'autres pays sont également concernés par la contamination en Cu des sols viticoles comme l'Espagne (Arias et al. 2004, 2005), l'Italie (Cattani et al. 2006), l'Allemagne et la Suisse (Scholl et Enkelmann 1984 ; Cetois et al. 2003) et l'Australie (Pietrzak et McPhail 2004). Le cuivre est à la fois un fongicide et bactéricide puissant capable d'altérer la structure des communautés et les processus microbiens (par exemple la respiration) et un métal particulièrement phytotoxique (Chaney 1980 ; Wheeler et al. 1993 ; Wheeler et Power 1995 ; Cetois et al. 2003 ; Ranjard et al. 2006 ; Sauvé 2006). Par conséquent, une telle contamination des sols viticoles en Cu entraîne un risque de toxicité élevé pour les organismes du sol et particulièrement de phytotoxicité pour les cultures. D'ailleurs, des problèmes de phytotoxicité ont été rencontrés après arrachage et replantation de jeunes plants de vignes et sur des cultures succédant à la

vigne, particulièrement sur céréales comme le blé dur (Coullery 1997 ; Brun 1998 ; Braun 2006).

### **I.2.2. Spéciation du cuivre dans le sol**

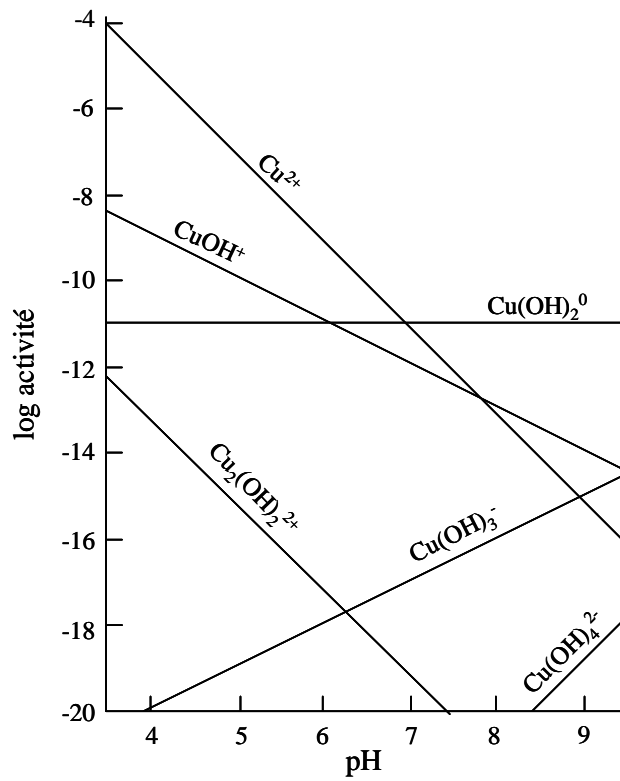
Le cuivre apporté au sol a tendance à s'accumuler près de la surface et à se répartir sous plusieurs formes dans la phase liquide, c'est à dire la solution du sol, et dans la phase solide (McBride 1981 ; Adriano 2001).

#### **Spéciation du cuivre en solution**

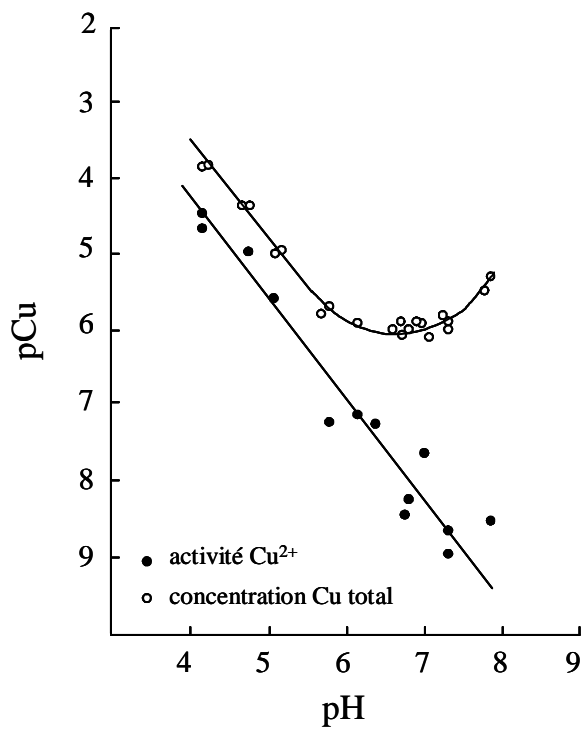
La spéciation est strictement définie (en chimie analytique de l'eau) comme l'identification et la quantification des différentes espèces chimiques d'un élément présent en solution (Ure 1995). Dans la solution du sol, Cu peut se trouver sous la forme de l'espèce ionique libre ou sous des formes complexées à des ligands inorganiques et organiques (McBride 1981). La somme de toutes ces espèces, c'est à dire Cu soluble total, représente généralement moins de 1 à 2 % de Cu total du sol (Sauvé et al. 1998 ; Agbenin et Felix-Henningsen 2004).

L'espèce non complexée de Cu correspond habituellement à l'ion cuprique  $\text{Cu}^{2+}$  ou à sa forme aqueuse ( $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ ). A pH alcalin, parmi les espèces hydrolysées de Cu (Figure 3), la forme majoritaire correspond à la forme  $\text{Cu}(\text{OH})_2^0$ , non chargée et plus mobile. Selon les conditions d'oxydo-réduction, Cu peut également être sous forme d'ion libre  $\text{Cu}^+$ , celle-ci devenant majoritaire sous conditions réductrices. Les espèces ioniques libres de Cu dans la solution du sol ne représentent souvent qu'une faible proportion de Cu soluble total, particulièrement à pH alcalin où leur proportion diminue fortement au profit d'espèces complexées (McBride 1989 ; Sauvé et al 1998 ; Nolan et al 2003) (Figure 4). Le cuivre sous forme complexée est lié avec des ligands inorganiques ( $\text{OH}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  et  $\text{S}^{2-}$ ) et organiques (acides aliphatiques simples, acides aminées, acides phénoliques, peptides, protéines, polysaccharides, acides humiques et fulviques) (McBride 1981). La capacité de complexation des ligands organiques résulte de leur contenu en groupes fonctionnels  $\text{COOH}$ ,  $\text{OH}$  et  $\text{C=O}$  qui sont des sites donneurs d'électrons capables éventuellement de chélater l'ion Cu (Lindsay 1979 ; Nolan et al. 2003). Le cuivre présent sous forme de complexes (ou chélates) formés avec de la matière organique dissoute représente généralement plus de 80 % de Cu soluble dans le sol et jusqu'à plus de 99 % dans la plupart des sols exceptés les plus acides (McBride et Bouldin 1984 ; Sauvé et al. 1997, 1998 ; Römkens et al. 1999 ; Vulkan et al. 2000 ; Aldrich et al. 2002).





**Figure 3** Spéciation de Cu, espèces chimiques résultant de l'hydrolyse de  $\text{Cu}^{2+}$  en équilibre avec Cu du sol en fonction du pH (Lindsay 1979)



**Figure 4** Concentration totale de Cu et activité de l'ion libre  $\text{Cu}^{2+}$  dans la solution du sol dans un sol acide en fonction du pH d'ajustement (McBride 1989).

## Spéciation du cuivre en phase solide

Le concept de spéciation, qui au sens strict s'applique uniquement à la chimie des solutions, a été étendu à la phase solide. Ainsi, la spéciation en phase solide est définie comme la distribution et la quantification des différentes formes d'un élément dans le sol, par exemple sa distribution entre les différents constituants dans la phase solide du sol capables de retenir cet élément (Cetois et al. 2003).

Les minéraux cupriques purs sont soit des minéraux primaires hérités du matériel parental soit des minéraux secondaires formés par des processus pédologiques ou hérités d'une roche parentale sédimentaire. En effet, Cu peut se substituer dans une certaine mesure à d'autres cations métalliques pendant la formation de minéraux primaires ou secondaires et être inclus dans des structures minérales ou co-précipiter avec des carbonates (magnésiens et calciques), des oxydes de fer, de manganèse et d'aluminium (McBride 1981 ; McBride 1989 ; Cetois et al. 2003). Les minéraux cupriques secondaires formés suite à la réaction d'ions Cu libres avec des anions inorganiques sont relativement solubles (McBride 1981).

Les minéraux argileux présentent des charges négatives permanentes, et, comme pour la matière organique et les oxyhydroxydes métalliques, des charges de surfaces dues à la protonation/déprotonation de leurs groupes fonctionnels de surface en fonction du pH. Pour maintenir l'électroneutralité, les charges négatives sont équilibrées par une quantité égale de cations métalliques (e.g.  $\text{Cu}^{2+}$ ) adsorbés via des forces électrostatiques non spécifiques (McBride 1989 ; Alloway 1995). En plus de l'adsorption non spécifique qui constitue un processus d'échange cationique réversible, Cu peut-être adsorbé spécifiquement, c'est à dire former des liaisons partiellement covalentes avec des ions à la surface de l'adsorbant comme les argiles minéralogiques, les oxydes de Fe, de manganèse (Mn) et d'aluminium (Al) et surtout la matière organique (McBride 1981 ; Ure 1995). D'autre part, Cu présente la particularité d'être majoritairement présent dans la phase solide sous des formes liées à de la matière organique, comme dans le cas des solutions du sol (McBride 1981, 1989 ; Sauvé et al. 1997 ; Schramel et al. 2000 ; Alva et al. 2000 ; Bolan et al. 2003 ; Arias et al. 2005 ; Khan et al. 2005).

### I.2.3. Facteurs gouvernant la disponibilité environnementale du cuivre

La disponibilité environnementale des éléments en trace métallique dépend de leur spéciation et de leur répartition entre la phase solide et la solution du sol. Elle va donc dépendre des processus (adsorption/désorption, précipitation/dissolution, complexation/dissociation de complexes) et des propriétés chimiques du sol et de la solution du sol (pH, contenu en carbone organique dissous, en matières organiques solides et en phases porteuses minérales) qui gouvernent la spéciation et la répartition des métaux entre la phase solide et la solution du sol (Peijnenburg et al. 1997 ; Sauvé et al. 1997, 2000 ; Rieuwerts et al. 1998 ; Peijnenburg et Jager 2003) (Figure 5).

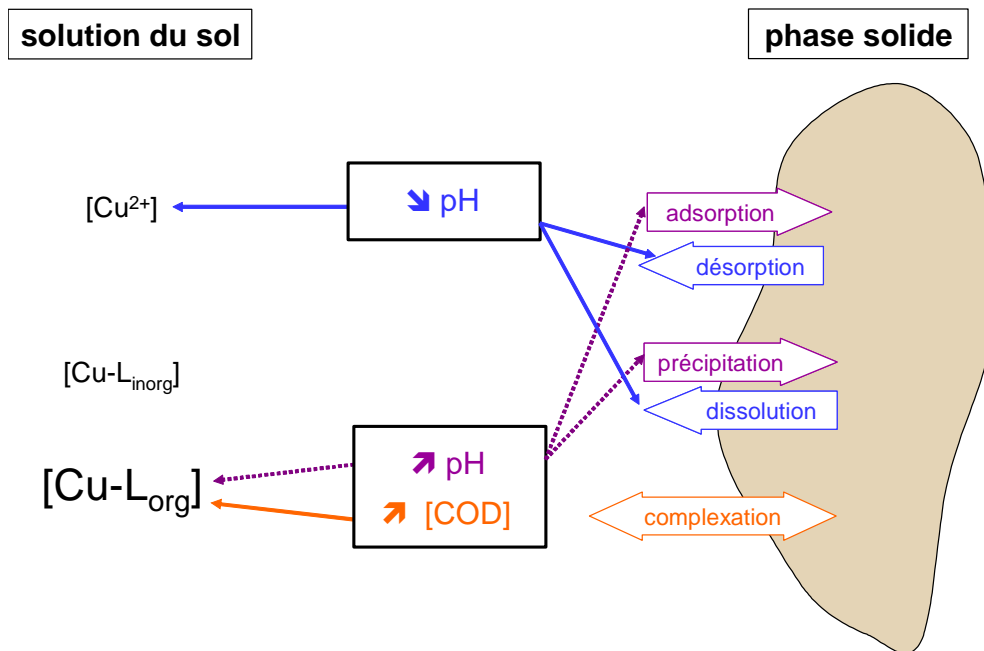
Le pH du sol est généralement connu pour être le principal facteur gouvernant la spéciation et la répartition des métaux dans le sol entre la phase solide et liquide, donc leur disponibilité environnementale (Peijnenburg et al. 1997 ; Rieuwerts et al. 1998). En effet, la concentration des métaux (e.g. Zn, Cd, Fe) en solution augmente généralement lorsque le pH diminue (Tyler et Olsson 2001) (Figure 6). Pour Cu, la concentration et le pourcentage en espèces ioniques libres diminuent lorsque le pH augmente (McBride et Bouldin 1984 ; Sauvé et al. 1997, 1998 ; Vulkan et al. 2000 ; Lofts et al. 2004) (Figure 4). En revanche, la concentration en Cu soluble

total ne semble pas augmenter avec la diminution du pH du sol (de pH 8 à 5), contrairement à Zn et Fe par exemple (Figure 6) (McBride 1989 ; Salam et Helmke 1998 ; Römkens et al. 1999 ; Tyller et Olsson 2001).

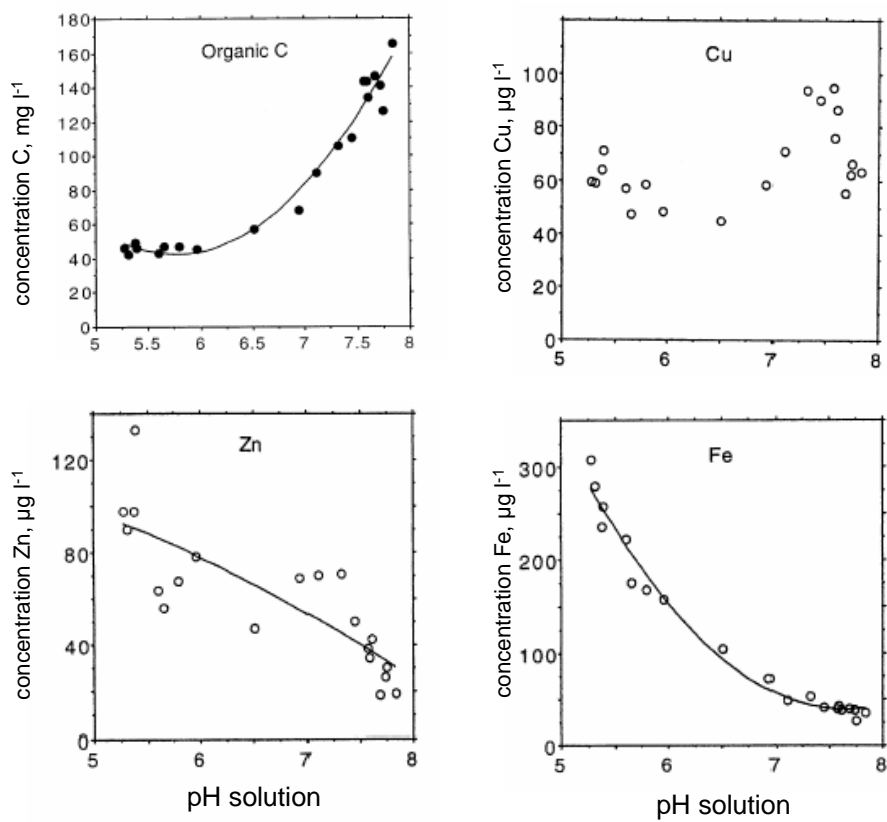
Le pH du sol influence la capacité d'adsorption des constituants du sol qui ont des charges dépendantes du pH (e.g. argiles, et surtout les oxydes métalliques et matières organiques) par protonation des sites d'adsorption à bas pH et déprotonation à pH plus élevé. L'augmentation du pH favorise donc les phénomènes d'adsorption et la précipitation sous forme d'hydroxydes métallique et de carbonates ( $\text{CuCO}_3(\text{OH})_2$ ) (McBride et Bouldin 1984 ; McBride 1989). Par conséquent, la concentration en espèces ioniques libres de Cu (particulièrement  $\text{Cu}^{2+}$ ) diminue lorsque le pH augmente, du fait d'une adsorption supérieure sur les constituants de la phase solide présentant des charges dépendantes du pH et par des réactions de précipitation (Figure 5). Ces phénomènes ne semblent par contre pas altérer les concentrations en Cu soluble total puisque l'augmentation du pH favorise également la dissolution de matières organiques et la formation de complexes métalliques solubles avec Cu (McBride et Bouldin 1984 ; Sauvé et al. 1997, 1998 ; Römkens et al. 1999 ; Vulkan et al. 2000 ; Tyller et Olsson 2001 ; Aldrich et al. 2002).

Avec l'augmentation du pH, la matière organique joue donc un rôle contrasté : (i) un ensemble de sites d'adsorption spécifique (matière organique particulaire) diminuant la solubilité et donc la disponibilité de Cu et, (ii) un agent complexant naturel (matière organique soluble) augmentant la solubilité de Cu et donc sa disponibilité, particulièrement à pH alcalin (McBride 1981, 1989 ; Vulkan 2000 ; Adriano 2001). Ainsi avec l'augmentation du pH, la concentration en espèce ionique libre décroît considérablement au profit d'espèces complexées avec de la matière organique dans la solution du sol qui peuvent représenter plus de 99% de Cu soluble (McBride et Bouldin 1984 ; Sauvé et al. 1997). Il est par conséquent souvent considéré que la biodisponibilité environnementale et la phytotoxicité de Cu diminuent avec l'augmentation du pH dans l'hypothèse où les plantes ne seraient sensibles qu'à l'espèce ionique libre. D'ailleurs, les travaux de Chaignon et al. (2002a) et de Cornu et al. (2007) sur la tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) et le colza (*Brassica napus* L.) ont mis en évidence une augmentation de la biodisponibilité de Cu en sols acides par rapport à des sols calcaires présentant un même niveau de Cu total. En revanche, les travaux de Brun et al. (2001) sur maïs (*Zea mays* L.) et de Hammer et Keller (2002) sur *Salix viminalis* et *Thlaspi caerulescens* montrent que la biodisponibilité de Cu ne serait pas supérieure en sols acides comparés à des sols calcaires, contrairement à d'autres métaux comme Cd et Zn. Par ailleurs, les travaux de Degryse et al. (2006) suggèrent que Cu complexé à des ligands organiques pourrait être disponible pour le prélèvement racinaire qui ne serait donc pas seulement dépendant de l'activité de l'ion libre. Ainsi, l'augmentation de la concentration en carbone organique dissous (COD) par augmentation du pH du sol et/ou exsudation racinaire et microbienne de complexants (acides organiques, sidérophores) (Bourrelier et Berthelin 1998 ; Hinsinger 1998, 2001) pourrait modifier la spéciation de Cu et probablement augmenter sa biodisponibilité.

En plus du rôle majeur du pH et surtout de la matière organique du sol, la force ionique, la concentration en Cu dans le sol, celle des autres éléments en traces métalliques et le potentiel d'oxydoréduction sont d'autres facteurs pouvant influencer la spéciation de Cu dans les sols et sa répartition entre la phase solide et liquide, donc *in fine* sa disponibilité environnementale (Rieuwerts et al. 1998 ; Sauvé et al. 2000 ; Cetois et al. 2003).



**Figure 5** Facteurs chimiques gouvernant la disponibilité environnementale de Cu (d'après McBride et Bouldin 1984 ; Peijnenburg et al. 1997 ; Sauvé et al. 1997, 2000)



**Figure 6** Concentration de carbone organique, Cu, Zn et Fe dans la solution du sol d'un sol acide en fonction du pH d'ajustement (Tyler et Olsson 2001)

### I.3. Le cuivre dans la plante

Le cuivre est l'un des sept oligoéléments essentiels à la nutrition des plantes, aux côtés de Zn, Mn, Fe, B, Mo et Cl, dont le caractère essentiel a été fermement établi dans les années 1930 (Adriano 2001). Cet oligoélément n'est requis qu'en très faible quantité et les teneurs adéquates de Cu dans les parties aériennes s'élèvent à 5-20 mg kg<sup>-1</sup> de matière sèche suivant le stade de développement et l'espèce considérés (Figure 7). Au-delà du seuil de toxicité de 15-30 mg kg<sup>-1</sup> dans les parties aériennes, Cu peut être phytotoxique (Davis et Beckett 1978 ; Macnicol et Beckett 1985 ; Marschner 1995 ; Reuter et Robinson 1997).

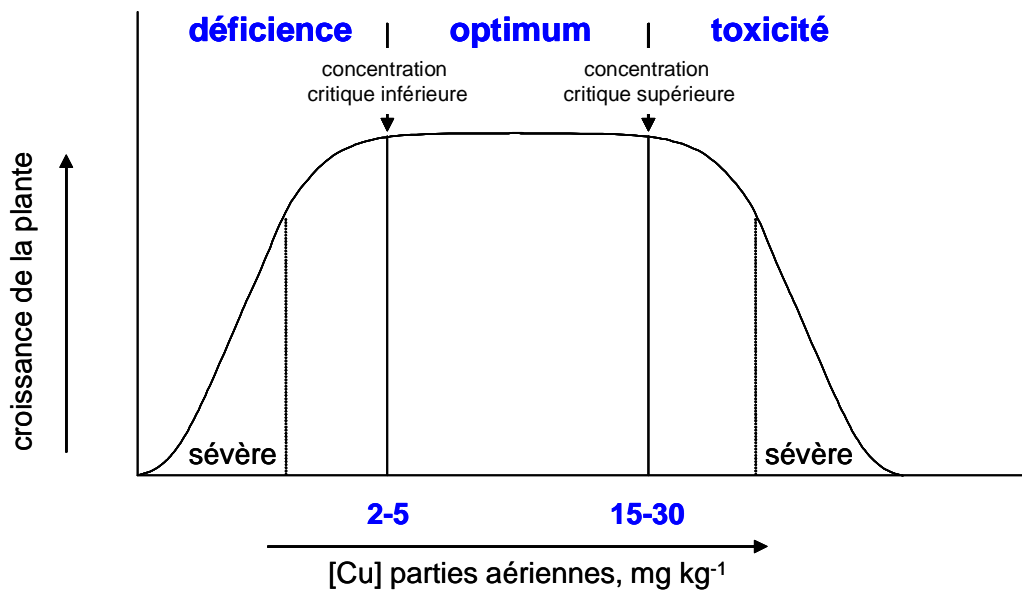


Figure 7 Courbe de croissance en réponse au statut nutritionnel de la plante (d'après Reuter et Robinson 1997)

#### I.3.1. Le cuivre, oligo-élément

##### Absorption

Bien que Cu soit majoritairement présent sous forme complexée par des exsudats racinaires ou des ligands organiques du sol dans l'environnement racinaire (Graham 1981), la forme libre semble être la seule absorbée par les racines conformément à la théorie de l'ion libre (Graham 1981 ; Kabata-Pendias et Pendias 1992 ; Adriano 2001). Cependant, des travaux suggèrent que Cu complexé par des ligands organiques (anions organiques, phytosidérophores) pourrait être prélevé directement sans dissociation préalable du complexe formé avec ces ligands (Parker et Pedler 1997 ; Xuan et al. 2006).

L'absorption racinaire et le transport de Cu à l'intérieur des cellules sont relativement méconnus chez les plantes (Yruela 2005). L'absorption de Cu à l'intérieur des cellules racinaires semble néanmoins dépendre de transporteurs spécifiques de la membrane plasmique présentant une haute affinité pour Cu<sup>+</sup>, les transporteurs COPT (Copper Transporter) (Puig et al. 2007). Ces transporteurs appartiennent à la famille CTR (Conserved

Copper Transporter) qui est impliquée dans le transport de Cu de l'extérieur vers le cytoplasme de cellules eucaryotes (e.g. levures, mammifères). Des travaux tendent d'ailleurs à mettre en évidence le rôle de COPT1 dans l'absorption racinaire de Cu chez *Arabidopsis* (Sancenon et al. 2004). Le transporteur IRT1 impliqué dans le prélèvement de  $\text{Fe}^{2+}$  et qui est capable de transporter d'autres cations métalliques divalents ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Cd}^{2+}$ ) ne semble par contre pas impliqué dans celui de  $\text{Cu}^{2+}$  (Dučić et Polle 2005 ; Puig et al. 2007). D'autre part, Cu est très fortement lié aux groupes fonctionnels de l'apoplasme dans les racines (Mengel et Kirkby 2001). L'adsorption spécifique de Cu sur les parois cellulaires pourrait être une étape préliminaire importante dans le processus d'absorption, et, à l'instar de Fe apoplasmique, Cu apoplasmique pourrait être mobilisé sous déficience en Cu (Graham 1981 ; Von Wirén et al. 1995).

### **Distribution dans la plante**

La distribution de Cu entre les racines et les parties aériennes varie selon l'espèce, le cultivar et les conditions environnementales (Loneragan 1981). De nombreux travaux ont mis en évidence une accumulation de Cu dans les racines chez diverses espèces : maïs (*Zea mays* L.) (McBride 2001 ; Ali et al. 2002), blé tendre (*Triticum aestivum* L.) (Chaignon et al. 2002b), colza (Chaignon et al. 2002a) tomate (Chaignon et al. 2002a ; Cornu et al. 2007), niébé (*Vigna unguiculata* L.) (Kopittke et Menzies 2006), *Chloris gayana* Knuth. (Sheldon et Menzies 2005). Le cuivre racinaire est principalement apoplasmique, donc non absorbé à l'intérieur des cellules (Graham 1981 ; Marschner 1995 ; Chaignon et al. 2002b). En effet, les parois cellulaires (ou pectocellulosiques) sont constituées d'un réseau de cellulose, pectines et glycoprotéines poreux et se comportent comme des échangeurs d'ions spécifiques (Allan et Jarrell 1989). Le cuivre peut ainsi être adsorbé sous forme cationique par les charges négatives des groupes fonctionnels des parois cellulaires qui sont déprotonés à pH neutre ou alcalin (particulièrement les groupes  $-\text{COOH}$ ). Le cuivre peut également être adsorbé sous forme non ionique par des réactions de coordination aux groupements contenant de l'azote également présents dans les parois cellulaires. L'adsorption de Cu au niveau des groupes fonctionnels des parois cellulaire dans l'apoplasme expliquerait son accumulation dans les racines et sa faible translocation vers les parties aériennes, particulièrement en cas de fortes concentrations dans le milieu. Lors de la translocation vers les parties aériennes, Cu serait principalement transporté dans le xylème complexé par des acides aminés (histidine, voire nicotianamine) (Pich et Scholz 1996 ; Liao et al. 2000) et des acides organiques (citrate) (Puig et al. 2007).

Le cuivre présente une mobilité limitée à la fois dans les racines et dans les parties aériennes. Les jeunes organes aériens sont par conséquent souvent les premiers sites à développer des symptômes de déficience en Cu (Kabata-Pendias et Pendias 1992). D'autre part, étant donné les propriétés rédox de Cu et ses fortes capacités de complexation, Cu est normalement présent à l'intérieur des cellules, dans le cytoplasme et principalement dans la vacuole, sous forme de complexes avec des chélateurs capables de tamponner la concentration en espèce ionique libre : anions organiques (citrate, malate), acides aminés (histidine, nicotianamine), métallothionéines et phytochélatines (Marschner 1995 ; Clemens 2001 ; Dučić et Polle 2005).

### **Rôles physiologiques**

Le cuivre divalent est facilement réduit en Cu monovalent instable. Ainsi, Cu lié enzymatiquement participe à des réactions d'oxydoréduction principalement dépendantes du changement de valence :  $\text{Cu}^{2+} + \text{e}^- \leftrightarrow \text{Cu}^+$  (Mengel et Kirkby 2001). Il est associé à de

nombreuses enzymes intervenant dans des processus physiologiques clés tels que la photosynthèse et la respiration (Bussler 1981 ; Walker et Webb 1981 ; Kabata-Pendias et Pendias 1992 ; Mengel et Kirkby 2001) :

- la plastocyanine des chloroplastes : protéine participant à la chaîne de transport des électrons au cours de la photosynthèse,
- la superoxyde dismutase : responsable de la détoxification de radicaux superoxydes,
- la cytochrome oxydase : oxydase terminale de la chaîne de transport d'électrons dans les mitochondries (respiration),
- l'ascorbate oxydase : catalysant les réactions d'oxydation de l'acide ascorbique,
- les peroxydases et les phénols oxydases : enzymes impliquées dans la synthèse des plastocyanines et de la lignine, respectivement.

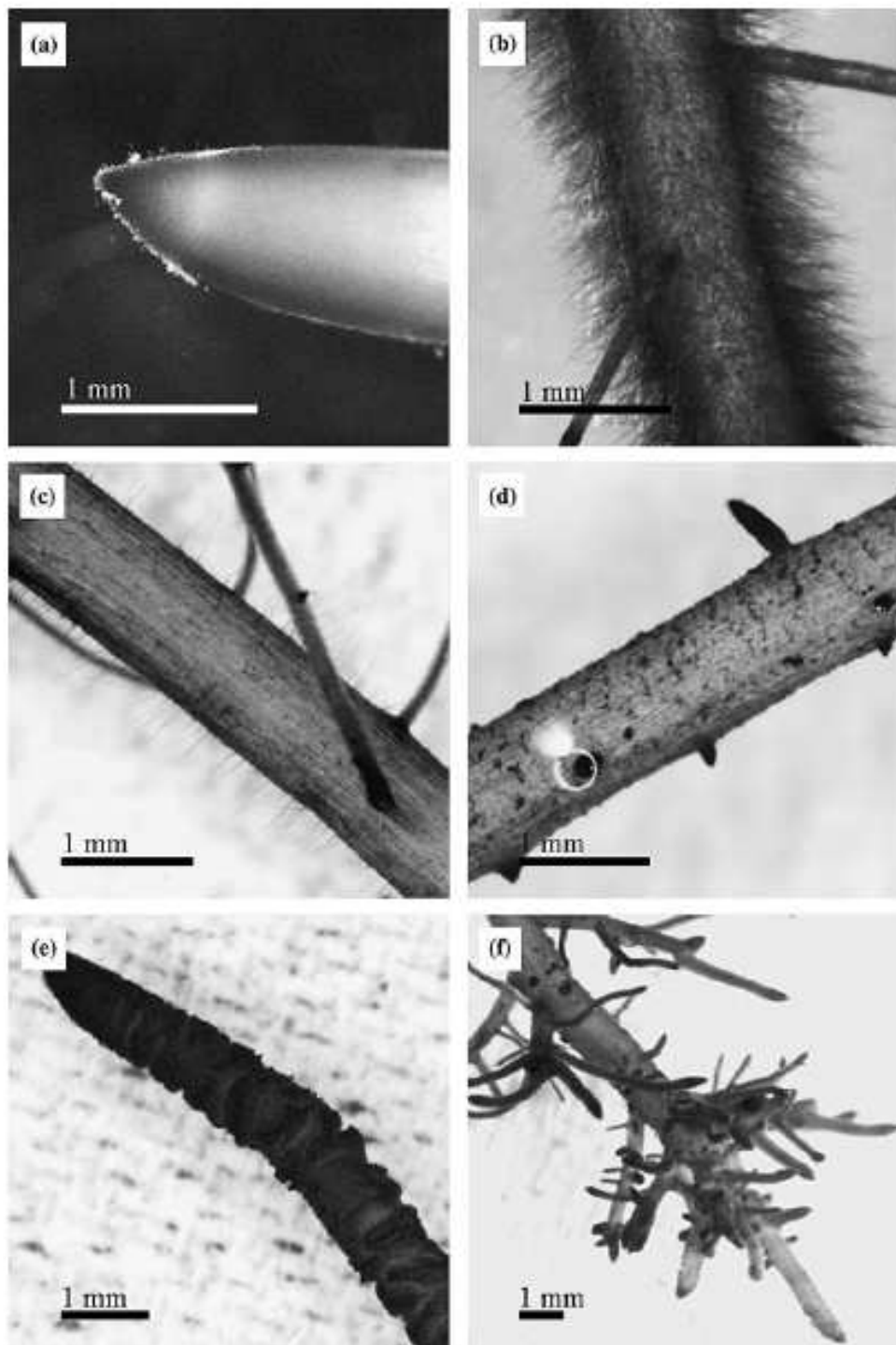
Le cuivre intervient également dans le métabolisme des hydrates de carbone, des lipides et de l'azote (Marschner 1995). Par ailleurs, Cu a un effet marqué sur la formation et la composition chimique des parois cellulaires via son rôle direct dans la biosynthèse de la lignine. D'ailleurs, chez des plantes souffrant de déficience en Cu sévère, les vaisseaux du xylème sont insuffisamment lignifiés (Bussler 1981 ; Kabata-Pendias et Pendias 1992).

### **I.3.2. Le cuivre, élément phytotoxique**

Le cuivre, comme les autres éléments essentiels B, Mn, Mo et Zn, est un oligoélément potentiellement phytotoxique en trop forte concentration. La phytotoxicité de Cu se manifeste principalement au travers de la rhizotoxicité et parfois de la mise en place d'une déficience induite en Fe. Par ailleurs, sa phytotoxicité semble altérer l'intégrité des membranes plasmiques des cellules racinaires et affecter la perméabilité membranaire provoquant ainsi la perte d'ions (e.g.  $K^+$ ,  $HPO_4^{2-}$ ) et de solutés (Woolhouse et Walker 1981 ; Kabata-Pendias et Pendias 1992 ; Marschner 1995).

#### **Rhizotoxicité**

Le cuivre s'accumule dans les racines et particulièrement dans l'apoplasme, ainsi, sa phytotoxicité agit principalement sur la croissance et la morphologie du système racinaire (Woolhouse et Walker 1981 ; Marschner 1995). Un excès de Cu dans le milieu environnant induit une rhizotoxicité visible au travers d'un épaissement et d'une coloration brune des racines, de la diminution de la ramification et du nombre de poils racinaires et de l'élongation racinaire globale (Figure 8) (Marschner 1995; Sheldon et Menzies 2005; Kopittke et Menzies 2006). Des lésions de l'épiderme sont également observées ainsi qu'un épaissement des apex et des dommages occasionnés sur les méristèmes. Les lésions de l'épiderme observées sous toxicité métallique, comme avec Al, pourraient être dues à une différence de taux d'élongation entre l'intérieur et l'extérieur des cellules. Les effets de la phytotoxicité de Cu sur l'élongation racinaire sont d'ailleurs similaires à ceux provoqués par Al (Blamey 2001). La liaison de Al avec des composés pectiques des parois cellulaires augmenterait la rigidité des parois cellulaires et déplacerait les cations basiques, particulièrement  $Ca^{2+}$ , diminuant ainsi l'expansion cellulaire et donc l'élongation racinaire. Comme pour les ions  $Al^{3+}$ , les ions  $Cu^{2+}$  pourraient inhiber l'élongation racinaire en réduisant l'expansion cellulaire et en augmentant la rigidité des parois cellulaires. D'autre part, la rhizotoxicité de Cu pourrait altérer la nutrition globale de la plante en réduisant le prélèvement d'éléments nutritifs à travers une diminution de la croissance racinaire.



**Figure 8** Effet de la toxicité du cuivre sur la morphologie racinaire de *Chloris gayana* Kunth. cultivée en hydroponie : (a) méristème, cuticule et (b) poils racinaires en bonne santé, (c) poils racinaires et cuticule endommagés, (d) cuticule endommagée et absence de poils racinaires, (e) méristème et cuticule endommagés, (f) morphologie du système racinaire globalement altérée (Sheldon et Menzies 2005).



La capacité d'échange cationique racinaire (CECr) augmente avec le pH du fait de la déprotonation des groupes fonctionnels des parois cellulaires (Dufey et al. 1985 ; Allan et Jarrell 1989). Ainsi, l'adsorption de Cu sur les constituants des parois cellulaires est fortement dépendante du pH et augmente avec le pH, comme observé par Linehan (1984). La compétition entre les protons et les ions  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Ni}^{2+}$  pour la liaison avec les groupes fonctionnels des parois cellulaires pourrait expliquer la diminution de la phytotoxicité de Cu et Ni lorsque le pH diminue (pour une même activité de l'ion libre) correspondant à un effet protecteur des protons à bas pH (Lexmond et Van der Vorm 1981 ; Weng et al. 2003 ; Thakali et al. 2006a, b ; Zhao et al. 2006 ; Rooney et al. 2007). Cependant, en dessous de pH 5 dans un sol, la concentration en ion libre de l'aluminium  $\text{Al}^{3+}$  augmente fortement, et devient fortement compétiteur de  $\text{Cu}^{2+}$ , avec des effets rhizotoxiques en tout point analogues de ceux causés par  $\text{Cu}^{2+}$ . Comme pour les protons, des cations comme  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  diminuent également la rhizotoxicité de Cu de par (i) la réduction de la charge négative induite à pH alcalin et de l'attraction électrostatique résultante de cations comme  $\text{Cu}^{2+}$  et (ii) la compétition pour les sites d'adsorption racinaire (Kinraide et al. 1992 ; Parker et al. 1998 ; Kinraide et al. 2004 ; Vulkan et al. 2004).

Bien que Cu soit majoritairement accumulé dans les racines et que l'effet majeur de la phytotoxicité de Cu soit la rhizotoxicité, les valeurs seuils de phytotoxicité mentionnées dans la littérature font souvent référence à des données obtenues dans les parties aériennes, beaucoup plus faciles d'accès pour la mesure (Davis et Beckett 1978; Macnicol et Beckett 1985; Reuter et Robinson 1997). D'ailleurs comme mentionné par Kopittke et Menzies (2006), les valeurs seuils de phytotoxicité connues dans les racines sont rares et fortement variables. Par exemple, Wheeler et Power (1995) ont obtenu une valeur critique de phytotoxicité de  $300 \text{ mg kg}^{-1}$  dans les racines pour du blé tendre cultivé en hydroponie avec  $0,5 \mu\text{M CuSO}_4$  et  $2,5 \text{ FeCl}_3$  correspondant à 50% de diminution de biomasse des parties aériennes et des racines, alors que Taylor et Foy (1985) ont obtenu une valeur seuil largement plus élevée de  $2300 \text{ mg kg}^{-1}$  dans les racines de blé tendre cultivé en hydroponie avec  $30 \mu\text{M CuSO}_4$  et  $17,9 \text{ FeHEDTA}$  pour une diminution de biomasse de 40% pour les parties aériennes et de plus de 50% pour les racines. La variabilité des seuils de phytotoxicité de Cu obtenus dans ces deux études peut résulter de variations des conditions expérimentales (forme d'apport de Fe et Cu, âge des plantes, espèce et cultivar).

### **Déficience induite en fer et chloroses**

En plus de la rhizotoxicité, la phytotoxicité de Cu est également connue pour induire dans certains cas une déficience en Fe et des symptômes de chlorose ferrique (Kabata-Pendias et Pendias 1992 ; Marschner 1995 ; Mengel et Kirkby 2001). Des travaux ont ainsi montré que les teneurs en Fe des parties aériennes diminuaient avec l'augmentation de la concentration en Cu en solution (Lexmond et Van der Vorm 1981; Taylor et Foy 1985) et dans le sol (McBride 2001) chez des céréales comme le maïs et le blé, avec l'apparition de symptômes de chlorose ferrique. Les travaux de Lexmond et van der Vorm (1981) ont également mis en évidence la diminution des teneurs en Fe des racines avec l'augmentation des concentrations en Cu en solution (à partir de pH 4.7) et Linehan (1984) a observé une diminution de l'adsorption de Fe sur les racines avec l'augmentation du pH et de la sorption de Cu.

Des niveaux élevés de Cu peuvent également induire la formation de radicaux libres et provoquer un stress oxydatif (Yruela 2005). Ceci peut agir sur la peroxydation des lipides et entraîner la destruction des membranes plasmiques, la détérioration de la structure et de la

composition des thylakoïdes et des chloroplastes, altérer les photosystèmes et ainsi inhiber la photosynthèse (Yruela et al. 1996 ; Quartacci et al. 2000 ; Ciscato et al. 1997 ; Yruela 2005). Le contenu en chlorophylle semble également être diminué par l'augmentation des teneurs en Cu (Mocquot et al. 1996 ; Ciscato et al. 1997). En plus de l'induction d'une déficience en Fe, la toxicité de Cu pourrait aussi agir directement sur la photosynthèse, en altérant notamment la chaîne de transport d'électrons, et induire des symptômes de chlorose.

D'autres déficiences en nutriments induites par un excès de Cu ont parfois été rapportées, telles que la déficience en phosphore (Lexmond et Van der Vorm 1981). Au champ, la réduction de l'élongation racinaire sous l'effet de la rhizotoxicité de Cu, a pour effet principal de diminuer fortement la capacité de la plante à couvrir ses besoins en eau et en nutriments, à l'instar de ce qui se passe dans le cas beaucoup plus documenté de la rhizotoxicité aluminique en sols acides (Marschner 1991 ; Rengel 1996 ; Kochian et al. 2004).

### **Tolérance**

Le cuivre est un élément fortement toxique capable de catalyser la production de radicaux libres qui sont de puissants oxydants. Par conséquent, les plantes ainsi que les autres organismes ont développé des mécanismes complexes d'homéostasie pour maintenir dans une gamme étroite les concentrations en oligoéléments tels que Cu et minimiser les risques de phytotoxicité (Clemens 2001). Les principaux composants de l'homéostasie des métaux dont Cu sont des processus de transport, de chélation et de séquestration.

Parmi les processus de tolérance envers Cu, la chélation de Cu dans le milieu externe via l'exsudation racinaire de ligands organiques susceptibles de complexer les ions  $\text{Cu}^{2+}$  permet de diminuer sa biodisponibilité, sous réserve que les complexes formés ne puissent être réabsorbés par la racine. D'ailleurs, la sécrétion d'anions organiques a été observée en réponse à de fortes teneurs externes en Cu et Al chez diverses espèces, dont le blé, ce qui diminuerait leur biodisponibilité (Rengel 1996 ; Murphy et al. 1999 ; Ma et al. 2001 ; Nian et al. 2002 ; Qin et al. 2007). Dans le cas de Al, cette adaptation a été étudiée en détail, jusqu'à l'identification moléculaire des gènes régulant l'activité des canaux ioniques impliqués dans l'exsudation du malate chez le blé (Sasaki et al. 2004). Un génotype sensible d'orge (*Hordeum vulgare* L.) a été transformé génétiquement à l'aide du gène ALMT1 de blés tolérants, lui conférant ainsi une résistance accrue à la rhizotoxicité de Al (Delhaize et al. 2004). Des recherches analogues portant sur l'exsudation du citrate sont conduites chez d'autres céréales telles que le maïs (Pineros et Kochian 2001 ; Pineros et al. 2002). Par ailleurs, la séquestration de Cu dans les vacuoles et/ou sa chélation avec des ligands dans le cytoplasme (e.g. métallothionéines, phytochélatines, acides organiques et aminés) sont d'autres mécanismes de tolérance qui détoxifient en tamponnant les concentrations de Cu cytosoliques (Marschner 1995; Clemens 2001; Yruela 2005). L'exclusion de Cu des parties aériennes par accumulation dans les racines, principalement par adsorption sur les parois cellulaires, est également un autre mécanisme de tolérance à la toxicité de Cu. Néanmoins, une telle accumulation racinaire de Cu, via l'immobilisation dans l'apoplasme, peut entraîner une rhizotoxicité comme mentionnée précédemment (Marschner 1995) et à l'instar de la rhizotoxicité aluminique qui est comparativement beaucoup plus abondamment documentée.

Par ailleurs, certaines plantes tolérantes aux métaux comme Pb, Zn, Ni, Co et Cu, sont capables d'accumuler dans leurs parties aériennes des quantités 100 fois supérieures aux teneurs normales. Par exemple, des plantes hyperaccumulatrices comme *Thlaspi caerulescens* et *Elsholtzia splendens* sont capables d'accumuler des concentrations supérieures à 1 000

mg g<sup>-1</sup> de Cu dans les parties aériennes, vraisemblablement par chélation et séquestration dans les vacuoles (Mulligan et al. 2001 ; Puig et al. 2007). Il a été observé que la flore hyperaccumulatrice de Cu était beaucoup moins diverse que celle capable d'hyperaccumuler Ni et davantage que celle capable d'hyperaccumuler Zn et Pb (Reeves 2003).

### **I.3.3. Activités rhizosphériques et biodisponibilité environnementale du cuivre**

L'acquisition des éléments (nutritifs et contaminants) par les racines est un phénomène comprenant trois étapes majeures capables d'influencer leur biodisponibilité : la mobilisation, le transport dans la rhizosphère et l'absorption à l'intérieur des cellules racinaires (Hinsinger 1998 ; Cetois et al. 2003 ; Hinsinger et al. 2004).

#### **La rhizosphère**

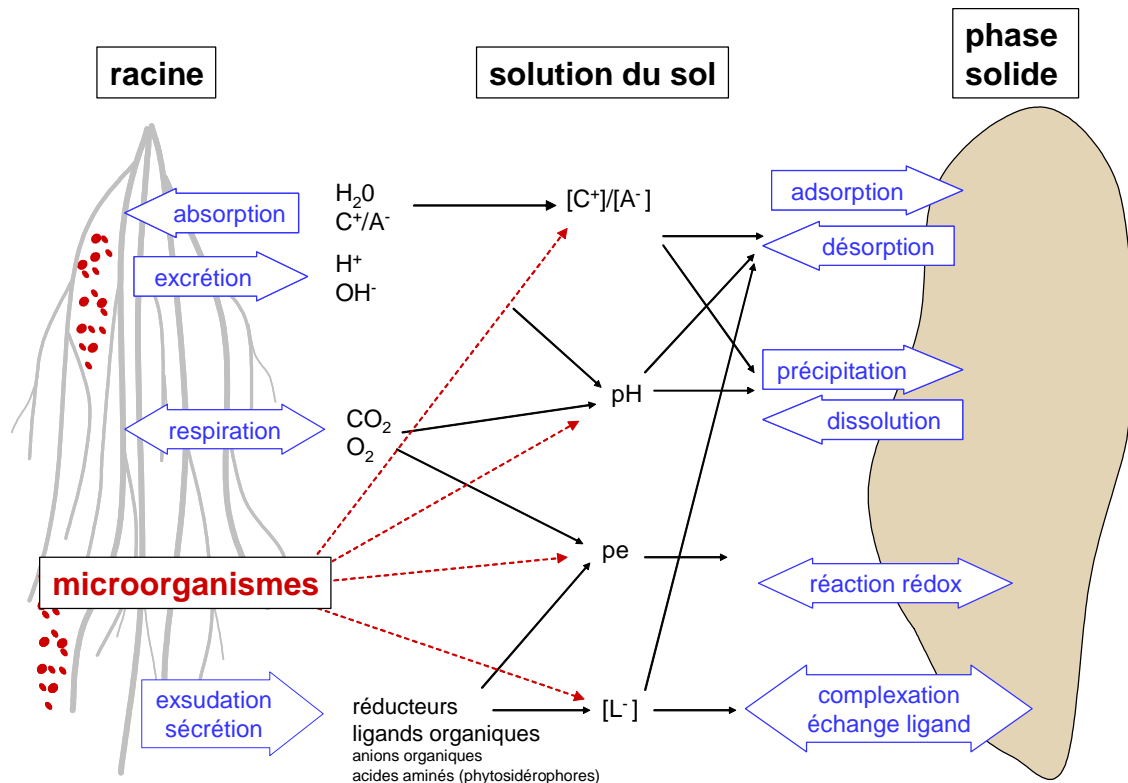
Selon Harmsen et al. (2005), une zone bio-influencée peut-être définie quel que soit l'organisme considéré comme le volume de sol (dans l'environnement immédiat de l'organisme) dans lequel la disponibilité des éléments, et *in fine* leur biodisponibilité, est influencée par la présence et les activités de l'organisme (Figure 1). Dans le cas des plantes, cette zone bio-influencée correspond à la rhizosphère, qui est définie comme le volume de sol influencé par l'activité racinaire (Hiltner 1904 ; Darrah 1993 ; Hinsinger 1998 ; Hinsinger et al. 2005). L'extension de la rhizosphère varie avec la nature de la plante, les éléments nutritifs considérés et les propriétés physiques du sol. Ainsi, pour les éléments peu mobiles (e.g. le phosphore et la plupart des oligoéléments) l'extension de la rhizosphère est souvent limitée à moins d'un millimètre, alors que pour des éléments fortement mobiles (e.g. l'azote sous forme de nitrate), la rhizosphère peut s'étendre sur quelques centimètres (Hinsinger 1998 ; Chaignon 2001 ; Hinsinger et al. 2005). Dans le cas de Cu, qui est un élément peu mobile dans le sol, la rhizosphère ne s'étendrait pas au delà du millimètre autour des racines (Chaignon et Hinsinger 2003). Des simulations réalisées récemment à l'aide du modèle de Barber-Cushman sur des sols viticoles de la région Languedoc-Roussillon ont montré que la zone d'appauvrissement en Cu de la solution du sol sous l'effet de son absorption par les racines de blé dur s'étendait au maximum jusqu'à 0,4 à 1,1 mm (Le Merrer 2007).

#### **Activités racinaires et biodisponibilité environnementale du cuivre**

Les activités racinaires peuvent modifier les propriétés chimiques du sol (pH, concentrations ioniques, potentiel rédox, teneur en COD) et mobiliser des éléments en traces métalliques à partir de la phase solide du sol et ainsi modifier leur biodisponibilité (Mench 1990 ; McLaughlin et al. 1998 ; Hinsinger 2001 ; Hinsinger et Courchesne 2007)(Figure 9).

Le prélèvement d'eau et de solutés présents dans la solution du sol par les racines peut modifier leur concentration dans la rhizosphère. Ainsi, un appauvrissement en éléments nutritifs comme K et P, résultat de l'effet-puits des racines, est responsable d'une force motrice pour leur diffusion vers la surface racinaire. Un enrichissement peut également se produire, particulièrement pour des éléments présents en forte concentration dans la solution du sol par rapport à la demande de la plante, comme Ca et Mg (Hinsinger 1998 ; Séguin et al. 2004 ; Hinsinger et al. 2006). De tels changements de concentration dans la solution du sol peuvent modifier les équilibres chimiques gouvernant la dynamique des éléments dans le sol et induire leur mobilisation à partir de la phase solide via par exemple l'altération de

minéraux ou, dans le cas contraire, la précipitation de minéraux (e.g. carbonates de calcium) (Hinsinger 1998 ; Hinsinger et al. 2006). Dans le cas de Cu, qui est fortement adsorbé par les constituants de la phase solide du sol et peu mobile, il n'est pas sûr que de tels phénomènes aient une importance significative, excepté éventuellement la mobilisation à partir de la fraction échangeable de Cu du sol (Cetois et al. 2003). Cependant, la modélisation des profils d'appauvrissement en  $\text{Cu}^{2+}$  conduite à l'aide du modèle de Barber-Cushman sur des sols viticoles de la région Languedoc-Roussillon a suggéré qu'une très forte diminution de la concentration se produisait au voisinage immédiat de racines de blé dur, soit à moins d'environ 1 mm de la surface (Le Merrier 2007).



**Figure 9** Interactions chimiques induites par les activités racinaires (et microbiennes) (d'après Hinsinger 2001 ; Hinsinger et al. 2005)

Les modifications de pH induites dans la rhizosphère peuvent avoir plusieurs origines : (i) le déséquilibre des charges traversant la membrane plasmique en lien avec le bilan des cations/anions absorbés par les cellules racinaires, (ii) la libération d'anions organiques, (iii) la respiration racinaire et (iv) le couplage avec des processus rédox (Hinsinger et al. 2003). Pour maintenir la balance des charges et réguler le pH cellulaire, les racines libèrent des protons lorsqu'elles prélèvent plus de cations que d'anions, ou, libèrent des équivalents hydroxyles et/ou prélèvent des protons dans le cas inverse (Hinsinger et al. 2003, 2006). D'autre part, l'exsudation d'anions organiques intervient également dans l'équilibre cation/anion par un influx d'équivalents hydroxyles ou par un efflux de protons pour contrebalancer les charges négatives portées par les anions organiques (Hinsinger et al. 2003). De plus, la production de  $\text{CO}_2$  dans le sol par la respiration racinaire et microbienne ainsi que des réactions rédox, via l'activité réductrice racinaire et la sécrétion de composés réducteurs (acides phénoliques, enzymes réductrices), contribuent aussi à modifier le pH dans la rhizosphère.

En modifiant le pH de la rhizosphère, les plantes peuvent modifier la spéciation et donc la biodisponibilité de Cu puisque le pH est impliqué dans de nombreuses réactions chimiques du sol (dissolution/précipitation, adsorption/désorption, complexation) (Chaignon 2001 ; Hinsinger 2001). Chez la tomate, une alcalinisation en sols acides, reliée à la diminution de Cu soluble et donc de sa disponibilité environnementale, a été observée par Chaignon (2001) et Cornu et al. (2007) alors qu'une acidification en sols calcaires a été observée en sols calcaires (Chaignon et al. 2002a). Chez les céréales, de telles modifications de pH ne semblent pas être observées et l'altération du pH ne serait pas à l'origine d'une modification significative de la biodisponibilité de Cu, tout au moins dans les rares études conduites à ce jour, notamment sur des sols calcaires où le pH est très tamponné par la présence de carbonates de Ca (Chaignon et al. 2002b, Tao et al. 2004).

Environ 25 % du carbone total produit par la photosynthèse par les plantes supérieures est libéré dans la rhizosphère (Nguyen 2003) sous forme de CO<sub>2</sub>, d'exsudats racinaires (sucres et polysaccharides, acides aminés et organiques, protéines et peptides) et autres rhizodépôts (cellules desquamées, poils racinaires, etc...). Cette libération de composés organiques par les racines, également appelée rhizodéposition (Nguyen 2003), est un phénomène bien connu qui est à l'origine de la stimulation de la microflore du sol dans l'environnement immédiat des racines (effet rhizosphère) (Marschner 1995 ; Hinsinger 1998). Certains exsudats racinaires ont des propriétés complexantes ou chélatantes envers les cations métalliques (Mench et al. 1988 ; Mench et Martin 1991 ; Hinsinger 1998, 2001 ; Dakora et Phillips 2002). Par exemple, les anions organiques exsudés par les racines, comme le citrate, le malate et l'oxalate ont la capacité de mobiliser des éléments en traces par complexation (Uren 2001 ; Hinsinger et al. 2006). Cependant, les travaux de Ström et al. (2005) ont montré que l'efficacité des anions organiques (oxalate, malate et citrate) à extraire des cations métalliques comme Cu, Zn et Fe était modérée, comparé à Ca, et, qu'elle diminuait avec l'augmentation du pH pour des éléments comme Fe et Zn alors qu'elle augmentait pour Cu. Le rôle joué par ces complexants pourrait également être limité par leur faible concentration en solution du fait de leur forte adsorption sur la phase solide et de leur rapide dégradation par les microorganismes du sol (Jones 1998 ; van Hees et al. 2002, 2003 ; Jones et al. 2003). Les céréales sont connues pour sécréter des chélatants de Fe<sup>III</sup> (les phytosidérophores) pour augmenter sa biodisponibilité, particulièrement en sols calcaires (Römheld 1987). Ces exsudats présentent des constantes d'affinités envers les cations métalliques supérieures à celles des anions organiques (malate, oxalate et citrate) (Tableaux 1 et 2). De rares travaux ont d'ailleurs mis en évidence l'implication de ces complexants dans l'augmentation de la biodisponibilité de métaux comme Cu, Zn, Cd et Ni, y compris en sols calcaires (Murakami et al. 1989 ; Treeby et al. 1989 ; Römheld et Awad 2000 ; Chaignon et al. 2002b). Ainsi, chez les céréales, l'exsudation racinaire de ligands organiques comme les phytosidérophores semble pouvoir modifier la spéciation de Cu et augmenter sa biodisponibilité, y compris en sols calcaires (Treeby et al. 1989 ; Chaignon et al. 2002b ; Reichman et Parker 2005).

**Tableau 1** Constantes de stabilité de complexes formés entre des anions organiques communément sécrétés (citrate, oxalate et malate) et des métaux (d'après Ryan et al. 2001)

	<b>citrate</b>	<b>oxalate</b>	<b>malate</b>
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	11,5	7,7	7,1
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	4,7	3,0	2,7
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	5,9	6,2	3,4
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	5,0	4,9	2,9
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	4,2	4,0	2,2

**Tableau 2** Constantes de stabilité de complexes formés entre Fe et d'autres métaux divalents et deux phytosidérophores : l'acide muginéique (MA) et l'acide 2'-déoxymuginéique (DMA) (d'après Murakami et al. 1989)

	<b>Ca<sup>2+</sup></b>	<b>Mn<sup>2+</sup></b>	<b>Fe<sup>2+</sup></b>	<b>Zn<sup>2+</sup></b>	<b>Ni<sup>2+</sup></b>	<b>Fe<sup>3+</sup></b>	<b>Cu<sup>2+</sup></b>
<b>MA</b>	3,81	8,30	10,14	12,69	14,92	17,71	18,10
<b>DMA</b>	3,34	8,29	10,45	12,84	14,78	18,38	18,70

### **Activités microbiennes et biodisponibilité environnementale du cuivre**

Comme les activités racinaires, les activités microbiennes stimulées dans la rhizosphère via l'exsudation racinaire de composés organiques et la rhizodéposition peuvent agir sur la spéciation des éléments métalliques (e.g. Cu, Fe et Zn) et par conséquent sur leur biodisponibilité.

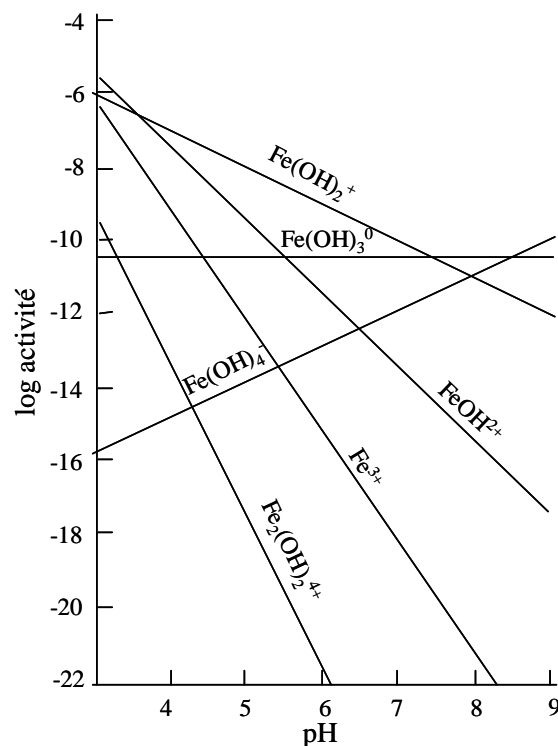
Les activités microbiennes (bactériennes et fongiques) sont à l'origine de la modification de propriétés chimiques du sol comme le pH, le potentiel rédox et la concentration de ligands organiques (Figure 9). La production d'acides organiques, d'enzymes et d'acides aminés peut favoriser la mobilisation (dissolution) d'ions métalliques par hydrolyse enzymatique, protonation et complexation (acidolyse, acido-complexolyse et complexolyse) à partir de la phase solide. La dégradation microbienne de ligands organiques (acides organiques, sidérophores, matières organiques solubles et particulaire) complexant des métaux comme Cu peut également augmenter la concentration en solution et donc la disponibilité des métaux initialement complexés (Bar-Ness et al. 1992 ; Von Wirén et al. 1993 ; Bourrelier et Berthelin 1998). Par ailleurs, la sécrétion de sidérophores par les microorganismes (e.g. ferrioxamine B, DFOB, rhizoferrine, pyoverdine, etc...) qui sont de puissants complexants de Fe<sup>III</sup>, en réponse à la faible disponibilité de Fe, augmente la biodisponibilité de Fe pour les microorganismes et éventuellement pour les plantes, même si ce dernier point est encore sujet à controverse (Crowley et al. 1992 ; Shenker et al. 1996 ; Yehuda et al. 1996 ; Fett et al. 1998 ; Crowley 2001 ; Rrogo et al. 2003 ; Lemanceau et al. 2006).

D'autre part, plus de 80 % des végétaux supérieurs sont mycorhizés par des champignons symbiotiques ecto- ou endomycorhiziens (Smith et Read 1997) qui peuvent avoir un effet direct sur la biodisponibilité d'éléments en traces métalliques via leur immobilisation sur les structures fongiques, la solubilisation de minéraux porteurs de métaux et la production de

complexants (Leyval et Joner 2001). Outre leur action directe, ces partenaires fongiques peuvent aussi agir indirectement sur la biodisponibilité d'éléments en traces métalliques, via la modification des communautés microbiennes rhizosphériques ou de l'exsudation racinaire. En effet, les champignons mycorhiziens peuvent modifier la croissance et la composition des communautés microbiennes rhizosphériques par changement qualitatif et/ou quantitatif de l'exsudation racinaire et modification du pH du sol (Rønn et al. 2002).

#### I.4. Acquisition du fer chez les graminées

Le fer est un élément essentiel pour les végétaux supérieurs qui est impliqué dans des processus physiologiques essentiels tels que la photosynthèse et la respiration (Marschner 1995). Bien que cet élément soit abondant dans les sols, sa disponibilité est faible et diminue fortement avec l'augmentation du pH en raison de la faible solubilité des oxydes de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (Lindsay 1979). Les concentrations de Fe soluble sont par conséquent généralement bien en dessous de celles requises pour une croissance optimale des plantes qui sont estimées à environ  $10^{-6}$  M, concentrations atteintes à des valeurs de pH inférieures à 3 (Figure 10) (Lindsay 1979 ; Ma 2005). Pour pallier à cette faible disponibilité de Fe, particulièrement importante dans les sols calcaires, les plantes ont développé deux stratégies d'acquisition de Fe (Figure 11).

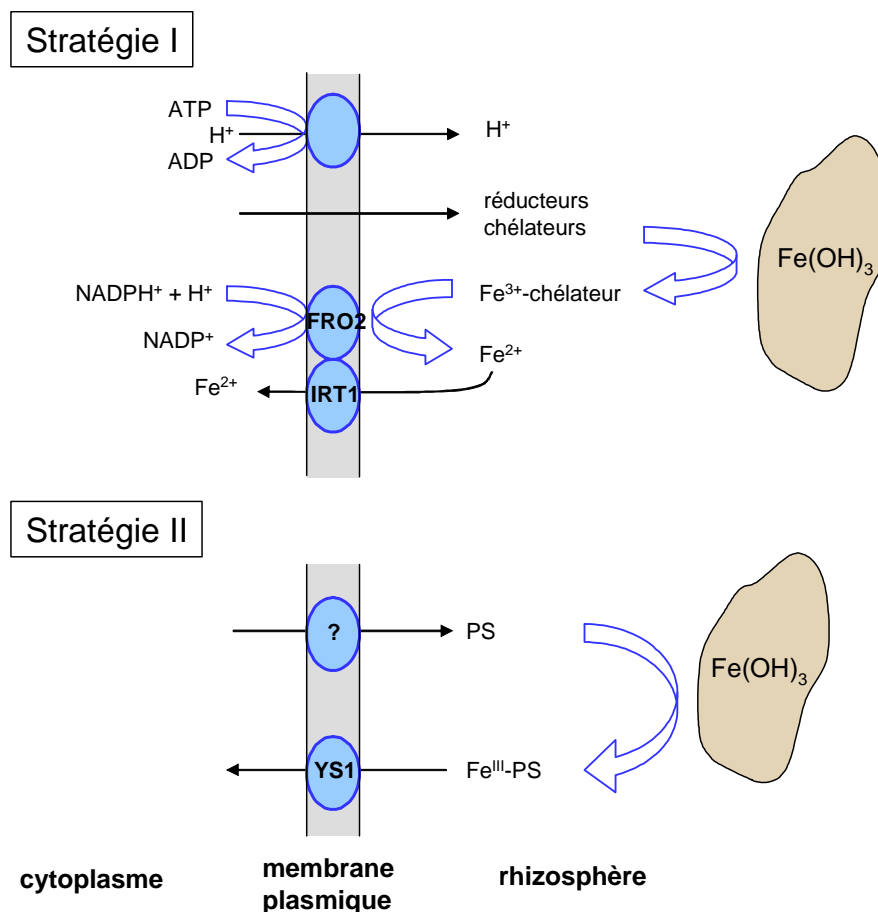


**Figure 10** Spéciation de Fe, espèces chimiques résultant de l'hydrolyse de  $\text{Fe}^{3+}$  en équilibre avec Fe du sol en fonction du pH (Lindsay 1979)

Les plantes de stratégie I augmentent la solubilité de Fe en libérant des protons et probablement des réducteurs/complexants (acides organiques et phénoliques) dans la rhizosphère. Le  $\text{Fe}^{\text{III}}$  solubilisé est ensuite réduit en  $\text{Fe}^{\text{II}}$  par une réductase présente sur la membrane plasmique des cellules de l'épiderme racinaire et prélevé sous forme de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  par un transporteur spécifique. Les gènes IRT1 (Iron Regulated Transporter 1) codant pour un

transporteur spécifique de  $\text{Fe}^{2+}$  et FRO (FRO1 et FRO2) (Ferric Reductase Oxidase) codant pour une reductase de  $\text{Fe}^{3+}$ -chelate ont été identifiés dans les racines de ces espèces et sont induits sous déficience en Fe (Robinson et al. 1999 ; Vert et al. 2002 ; Ma 2005). Les plantes de stratégie II, représentées par les graminées, sont caractérisées par la synthèse et la sécrétion accrue sous déficience en Fe de chélatants de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (les phytosidérophores) et par le prélèvement du complexe  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -phytosidérophore par un transporteur spécifique (Römheld 1987 ; Curie et Briat 2003). Cette stratégie est détaillée ci-dessous.

Les plantes de stratégie I semblent être plus dépendantes du pH du sol que les plantes de stratégie II, vraisemblablement du fait du pH optimum de la réductase (autour de 5) qui est fortement inhibée à des valeurs de pH supérieures à 7. Ainsi, les plantes de stratégie I seraient moins efficaces pour acquérir Fe en sols calcaires et donc plus sensibles à la déficience en Fe et à la chlorose ferrique dans ce type de sols que les plantes de stratégie II (Marschner et al. 1986 ; Römheld 1987).



**Figure 11** Stratégies d'acquisition du fer chez les plantes supérieures (d'après Marschner 1995 ; Ma 2005)



## I.4.1. La stratégie des graminées

### Synthèse des phytosidérophores

Depuis la découverte de l'acide muginéique (MA) dans les exsudats racinaires d'orge comme substance chélatante de Fe<sup>III</sup> (Takagi et al. 1976 ; Takemoto et al. 1978), neuf composés analogues au total ont été isolés et identifiés à partir de différentes espèces et cultivars de graminées : l'acide 3-hydroxymuginéique (HMA), l'acide avénique A (AVA), l'acide 2'-déoxymuginéique (DMA), l'acide 3-épihydroxymuginéique (épiHMA), l'acide 3-épihydroxy-2'-déoxymuginéique (épiHDMA), l'acide distichonique, ainsi que les deux composés suivants identifiés chez des graminées pérennes, l'acide 3-hydroxy-2'-déoxymuginéique (HDMA) et l'acide 2'-hydroxyavénique A (HAVA) (Nomoto et al. 1987 ; Shi et al. 1988 ; Ma et Nomoto 1996 ; Mori et al. 2001 ; Ma 2005 ; Ueno et al. 2007). Leur voie de biosynthèse a été caractérisée (Figure 12) et la plupart des gènes impliqués ont été clonés, notamment NAS (nicotianamine synthase), NAAT (nicotianamine aminotransférase) et DMAS (deoxymugineic acid synthase) (Mori et al. 2001 ; Ma 2005 ; Bashir et al. 2006). Tous ces gènes sont induits spécifiquement dans les racines sous déficience en Fe (Murata et al. 2006). La méthionine sert de précurseur principal à la synthèse de la nicotianamine, acide aminé non protéinogénique ubiquiste chez les plantes et impliqué dans l'homéostasie de Fe et le transport longue distance d'éléments en trace métallique dont Cu et Zn (Pich et Scholz 1996 ; Stephan et al. 1996 ; Pich et al. 2001). La voie de biosynthèse des phytosidérophores se poursuit par la substitution d'un groupe aminé terminal de la nicotianamine par un résidu hydroxyle pour former le premier phytosidérophore, l'acide 2-déoxymuginéique (DMA) (Ma et Nomoto 1996 ; Ma 2005). Les étapes suivantes diffèrent ensuite selon l'espèce de graminée considérée.

Les végétaux supérieurs sont caractérisés par une faible exigence en Fe et une faible mobilité de Fe à l'intérieur de la plante. Le contenu en Fe des tissus chlorophylliens est de l'ordre de 100 mg kg<sup>-1</sup> de matière sèche (Ma et Nomoto 1996 ; Ma 2005) et le niveau critique pour une large gamme de plantes est de 50 mg kg<sup>-1</sup> de matière sèche (Erenoglu et al. 2000). Pour satisfaire la demande en Fe et éviter les risques de phytotoxicité de Fe (stress oxydatif) (Briat et al. 1995), la biosynthèse des phytosidérophores est efficacement régulée. Elle débute avant l'apparition des symptômes de chlorose ferrique dès que la concentration en Fe dans le milieu extérieur est réduite et est stoppée dès que les exigences en Fe pour la croissance sont satisfaites, évitant ainsi toute toxicité provoquée par un prélèvement excessif. D'autre part, plus la déficience en Fe est importante, plus la quantité de phytosidérophores synthétisés est grande (Marschner et al. 1987 ; Ma et Nomoto 1996). Les phytosidérophores semblent être synthétisés toute la journée et accumulés à l'intérieur des cellules racinaires avant leur sécrétion le matin suivant (Ma et Nomoto 1996 ; Ma 2005).

### Sécrétion des phytosidérophores

La sécrétion des phytosidérophores suit un rythme diurne qui a été caractérisé chez plusieurs espèces de graminées : l'orge (*Hordeum vulgare* L.) (Takagi et al. 1984), le blé tendre (Zhang et al. 1991) et la festuque rouge (*Festuca rubra* L.) (Ma et al. 2001). Généralement, la sécrétion de phytosidérophores commence 2-3 h après le début de la phase lumineuse et se poursuit pendant environ 3-4 h (Takagi et al. 1984 ; Reichman et Parker 2007a). La quantité de phytosidérophores sécrétés est fonction de l'intensité de la déficience en Fe et serait bien supérieure à la quantité de Fe réellement prélevée par les racines (Takagi et al. 1984 ; Marschner et al. 1986).



La libération de phytosidérophores semble principalement localisée au niveau des zones apicales des racines (Yoshida et al. 2004) et être contrôlée en partie par la température de l'environnement racinaire (Ma et al. 2003) et par la photopériode, en particulier l'intensité lumineuse (Cakmak et al. 1998). Les travaux récents de Reichman et Parker (2007a) sur du blé tendre suggèrent néanmoins que la sécrétion de phytosidérophores serait gouvernée par les changements de lumière plutôt que de température. D'autre part, la sécrétion de phytosidérophores semble être dépendante de l'utilisation d'énergie métabolique sous forme d'ATP et impliquerait le co-transport équimolaire de  $K^+$  sous la forme  $K^+MA^-$  par l'action d'une ATPase  $H^+-K^+$  (Takagi 1993 ; Mori 1994 ; Sakagushi et al. 1999). Contrairement aux gènes impliqués dans la synthèse de phytosidérophores, les gènes responsables de leur sécrétion n'ont pas encore été identifiés. Toutefois, un mutant de maïs (YS3) qui est défectueux dans la sécrétion de phytosidérophores est connu (Lanfranchi et al. 2002).

Différents travaux ont mis en évidence l'implication de la déficience en Zn dans l'augmentation de la sécrétion de phytosidérophores (Cakmak et al. 1994, 1996 ; Erenoglu et al. 2000 ; Rengel et Römheld 2000a, b ; Tolay et al. 2001 ; Susuki et al. 2006). Néanmoins, les quantités sécrétées semblent être largement supérieures sous déficience en Fe que sous déficience en Zn (Erenoglu et al. 2000 ; Susuki et al. 2006). Certains auteurs suggéraient que cette réponse était induite indirectement par la déficience en Fe (Walter et al. 1994 ; Rengel 1997). Néanmoins, les travaux récents de Susuki et al. (2006) tendent à mettre en évidence l'implication directe de la déficience en Zn dans la synthèse des phytosidérophores. En revanche, la sécrétion de phytosidérophores n'est pas induite sous déficience en Cu et Mn (Gries et al. 1995). Ainsi, la sécrétion de phytosidérophores chez les graminées serait une stratégie d'acquisition de Fe et potentiellement de Zn mais pas d'autres éléments en traces métalliques tels que Cu (Meda et al. 2005). Cela n'exclue pas pour autant l'implication des phytosidérophores dans l'acquisition de Cu chez les graminées.

### **Propriétés des phytosidérophores et mobilisation du fer**

Les phytosidérophores ont été identifiés comme étant des acides aminés non protéinogéniques présentant d'étroites similarités avec les sidérophores microbiens (Takagi et al. 1984). Ce sont des chélatants puissants capables de dissoudre  $Fe^{III}$  par chélation y compris à pH alcalin. D'ailleurs, les phytosidérophores ont une plus faible affinité pour  $Ca^{2+}$  et  $Mg^{2+}$  qui sont en forte concentration dans les sols calcaires, ce qui explique également l'efficacité de la mobilisation de  $Fe^{III}$  chez les graminées dans ces sols (tableau 2). Les différents phytosidérophores présentent une unité structurale commune avec six groupes fonctionnels (hydroxyle, amine et carboxylique) (Ma et al. 1993 ; Zhao et al. 2001). Les valeurs de pKa qui sont relativement basses permettent la déprotonation des groupes fonctionnels à un pH supérieur à 4 et la formation du complexe selon un ratio 1:1 ( $Fe^{III}$ :phytosidérophore) (tableau 3) (Ma et al. 1993 ; Von Wirén et al. 2000). Le complexe ainsi formé est soluble dans la solution du sol et permet de transporter  $Fe^{III}$  vers la surface racinaire pour être absorbé. Par ailleurs, les différents phytosidérophores présentent des différences structurales, notamment au niveau de l'hydroxylation, qui peuvent modifier l'affinité envers  $Fe^{III}$  et donc la capacité à le solubiliser (Von Wirén et al. 2000 ; Schaaf et al. 2004a).

La solubilité de Fe dans les sols est largement gouvernée par les oxydes (en fait, rigoureusement, il s'agit à la fois d'oxydes, d'hydroxydes et d'oxyhydroxydes) de  $Fe^{III}$  (Lindsay 1979) qui sont les formes de Fe thermodynamiquement les plus stables et avec une très faible solubilité (Schwertmann 1991). Ces minéraux représentent pourtant la source majeure de Fe pour les plantes dans la plupart des sols (Schwertmann 1991). Les graminées

semblent d'ailleurs pouvoir dissoudre des oxyhydroxydes de Fe (e.g. ferrihydrite, goethite) par complexation des phytosidérophores avec Fe<sup>III</sup> exposé à la surface de ces minéraux (Inoue et al. 1993 ; Hiradate et Inoue 1998 ; Bertrand et Hinsinger 2000 ; Reichard et al. 2005 ; Kraemer et al. 2006) y compris en sols calcaires (Takagi et al. 1984 ; Takagi et al. 1988). D'autre part, Fe complexé avec des substances humiques hydrosolubles du sol pourrait également être mobilisé par les phytosidérophores (Gerke 2000 ; Cesco et al. 2000, 2002).

**Tableau 3** Valeurs de pKa pour trois phytosidérophores : l'acide muginéique (MA), l'acide 2'-déoxymuginéique (DMA) et l'acide 3-épihydroxymuginéique (épiHMA) (cité dans Von Wirén et al. 2000)

phytosidérophore	valeurs de pKa				
	pKa <sub>1</sub>	pKa <sub>2</sub>	pKa <sub>3</sub>	pKa <sub>4</sub>	pKa <sub>5</sub>
<b>MA</b>	2,39	2,76	3,40	7,78	9,55
<b>DMA</b>	2,35	2,74	3,20	8,25	10,00
<b>épiHMA</b>	2,35	2,74	3,25	7,10	9,62

### Transport du complexe fer-phytosidérophore

Les graminées sont également caractérisées par le prélèvement du complexe Fe<sup>III</sup>-phytosidérophore par un transporteur spécifique (Marschner et al. 1989) qui a été identifié chez le maïs (ZmYS1) par Curie et al. (2001) et l'orge (HvYS1) par Murata et al. (2006). Ce système de transport spécifique du complexe phytosidérophore-Fe<sup>III</sup> est localisé sur la membrane plasmique des cellules racinaires (Marschner et al. 1986 ; Mori 1994) et peut transporter les différents complexes Fe-phytosidérophores formés (Römheld et Marschner 1986). Les travaux de Murata et al. (2006) ont montré que, contrairement au transporteur ZmYS1, HvYS1 serait spécifique du transport du complexe Fe-phytosidérophore et des complexes formés avec d'autres cations métalliques comme Cu et Zn ne seraient donc pas transportés par HvYS1, du moins en expression hétérologue. D'autre part, le gène ZmYS1 code pour un transporteur H<sup>+</sup>-Fe<sup>III</sup>-phytosidérophore (Schaaf et al. 2004a) dont la synthèse serait accrue sous déficience en Fe (Curie et al. 2001). Le couplage du transport du complexe phytosidérophore-Fe<sup>III</sup> qui est neutre ou chargé négativement à pH 7 (Von Wirén et al. 2000), avec un ou plusieurs protons, permettrait un prélèvement racinaire efficace même à pH alcalin (Schaaf et al. 2004 a, b).

### Méthodes de détermination des phytosidérophores

Des méthodes indirectes et directes ont été développées pour quantifier les phytosidérophores. Les méthodes indirectes sont fondées sur la capacité de mobilisation de Fe ou Cu des exsudats racinaires. Les essais de solubilisation de Fe (Takagi et al. 1976) et de liaison de Fe (Gries et al. 1995), ainsi que les essais de mobilisation de Cu (Treeby et al. 1989 ; Cakmak et al. 1996 ; Rengel et Römheld 2000 ; Tolay et al. 2001 ; Chaignon et al. 2002b) et Cu-CAS (Chrome Azurol S) (Shenker et al. 1996) sont les quatre méthodes indirectes les plus employées. Ces méthodes présentent l'avantage d'être faciles, rapides et peu onéreuses mais elles présentent également certains inconvénients majeurs comme l'ont souligné récemment Reichman et Parker (2007b). Globalement, ces méthodes ne permettent pas de distinguer les différents types de phytosidérophores des autres composés complexants, par exemple les sidérophores

microbiens et les acides organiques. Elles manquent également de sensibilité pour quantifier les phytosidérophores, notamment la méthode Cu-CAS qui ne semble pas adaptée à de faibles concentrations. D'autre part, ces méthodes peuvent sous-estimer les quantités réellement sécrétées, particulièrement les méthodes de mobilisation de Cu et de solubilisation de Fe. Malgré ces inconvénients, ces méthodes semblent néanmoins adaptées pour estimer qualitativement la sécrétion de phytosidérophores (Reichman et Parker 2007b). Récemment, Reichman et Parker (2007b) ont développé un essai modifié de liaison de Fe qui semble présenter une bonne relation stoechiométrique entre les concentrations estimées par cette méthode et connues (ajoutées) et une meilleure précision que les autres méthodes indirectes.

Contrairement aux méthodes indirectes, les méthodes directes (HPLC) ont l'avantage de différencier et de quantifier séparément les phytosidérophores (Neumann et al. 1999 ; Weber et al. 2001). Lorsqu'elles sont couplées à un spectromètre de masse, elles permettent également de déterminer la nature des complexes formés. Ces méthodes directes ont d'ailleurs permis de mettre en évidence la formation de complexes entre les phytosidérophores et des éléments en traces métalliques dont Cu (Bakkaus et al. 2006 ; Xuan et al. 2006). Ces méthodes directes sont néanmoins coûteuses, longues et difficiles à mettre en œuvre, particulièrement au niveau de la purification des phytosidérophores avant leur dosage qui nécessite des connaissances techniques spécifiques. Une autre limitation majeure est l'absence d'étalons commerciaux de phytosidérophores, en vue d'une détermination quantitative par ces méthodes chromatographiques qui sont comparatives.

#### **I.4.2. Différence de sensibilité à la déficience en fer inter- et intra-spécifique chez les céréales**

Près d'un tiers des terrains cultivables mondiaux sont des sols calcaires et présentent de ce fait une faible solubilité de Fe et Zn et, par conséquent, des risques élevés de déficience en ces éléments (Rengel et Römheld 2000 ; Suzuki et al. 2006). Les réponses adaptatives des graminées leur confèrent une meilleure résistance à la chlorose ferrique induite par la déficience en Fe, comparativement aux plantes de stratégie I (Römheld 1987 ; Schaaf et al. 2004a). Il existe néanmoins des différences inter- et intra-spécifiques de résistance à la déficience en Fe et Zn chez les céréales.

De nombreux travaux ont mis en exergue des différences de sensibilité à la déficience en Zn et Fe entre espèces de graminées et leurs cultivars (Marschner et al. 1986 ; Römheld et Marschner 1990 ; Cakmak et al. 1997, 1998, 2001 ; Rengel et Römheld 2000a, b ; Crowley et al. 2002). Ainsi le triticale (*Triticum x Secale*), le seigle (*Secale cereale* L.), l'orge et le blé tendre présenteraient une meilleure résistance à la déficience en Zn et Fe alors que le blé dur serait plus sensible (Cakmak et al. 1997, 1998 ; Kalayci et al. 1999 ; Rengel et Römheld 2000a, b). Les travaux de Kawai et al. (1988) et de Römheld et Marschner (1990) ont mis en évidence des différences de sécrétion de phytosidérophores en lien avec la résistance à la déficience en Fe. Ainsi, une diminution du taux de libération des phytosidérophores serait reliée avec une diminution de résistance à la déficience en Fe entre les graminées suivant l'ordre : orge (*Hordeum vulgare* L.) > blé > riz (*Oryza sativum* L.) > maïs >> sorgho (*Sorghum bicolor* L.). Les travaux de Rengel et Römheld (2000b) ont par ailleurs montré que des cultivars plus résistants à la déficience en Fe sécrétaient davantage de phytosidérophores que des cultivars sensibles et que le blé dur, plus sensible que le blé tendre à la déficience en Fe et Zn, sécrétait moins de phytosidérophores que le blé tendre. Ces travaux mettent en évidence une relation entre la quantité de phytosidérophores sécrétés, le prélèvement de Fe et Zn et la résistance à la déficience en Fe et Zn et suggèrent que les différences de sensibilité

entre espèces et cultivars pourraient être déterminées par leur capacité à sécréter des phytosidérophores. Néanmoins, la corrélation entre la quantité de phytosidérophores sécrétés et la résistance à la déficience en Fe et Zn n'est pas toujours observée. D'ailleurs, les travaux de Cakmak et al. (1998), Erenoglu et al. (2000) et Crowley et al. (2002) suggèrent que l'adaptation des plantes à la déficience en Fe et Zn ne peut être attribuée à la seule différence de sécrétion de phytosidérophores. En effet, le prélèvement supérieur de Fe et Zn, observé chez des espèces moins sensibles comme l'orge et le triticale, pourrait être dû à une meilleure croissance racinaire, une surface racinaire plus étendue, une meilleure répartition de Fe et Zn dans la plante et une translocation supérieure vers les parties aériennes (Cakmak et al. 1997 ; 1998 ; Erenoglu et al. 1999 ; Crowley et al. 2002).

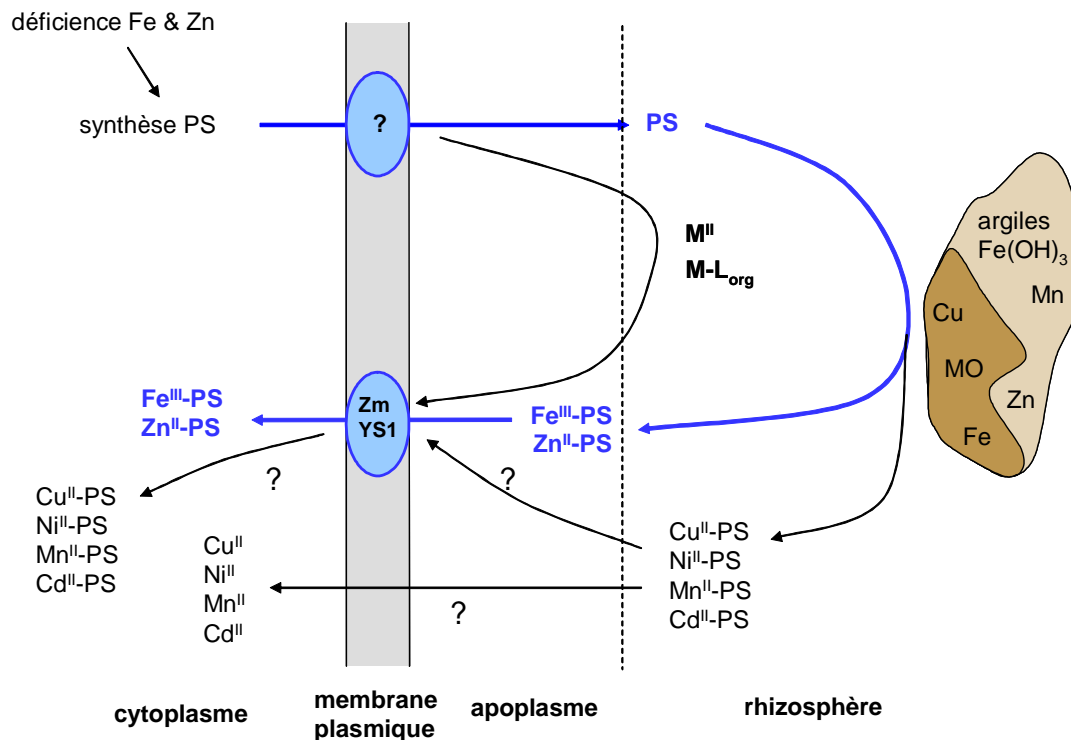
D'autre part, les différentes espèces de graminées sécrètent différents phytosidérophores avec un type de phytosidérophore dominant dans chaque génotype (Shi et al. 1988 ; Römheld et Marschner 1990). Les travaux de Von Wirén et al. (2000) ont montré que la structure des phytosidérophores pouvait influencer la stabilité du complexe formé avec  $Fe^{III}$  et donc l'acquisition de Fe. Ainsi, à un pH compris entre 4 et 7, la capacité à chélater  $Fe^{III}$  semble diminuer suivant l'ordre : HMA > MA > DMA. De plus, les formes hydroxylées (HMA, épiHMA, MA, AVA) formeraient des complexes remarquablement stables avec  $Fe^{III}$  à pH acide. Comme suggéré par Von Wirén et al. (2000), de nombreuses plantes résistantes à la chlorose, comme l'orge et le seigle, synthétisent principalement des phytosidérophores hydroxylés (MA, épiHMA, HMA), alors que le phytosidérophore non hydroxylé DMA prédomine chez les espèces sensibles comme le maïs et le riz. Ainsi, les espèces de graminées produisant des phytosidérophores hydroxylés, comme l'orge et le seigle, pourraient avoir un avantage notamment en environnement acide, comme celui présent à la surface de la membrane plasmique où le pH est localement acidifié à cause de l'activité de l' $H^+$ -ATPase (Von Wirén et al. 2000).

#### **I.4.3. Interaction avec la biodisponibilité environnementale des métaux**

Bien que la stratégie des graminées semble être une réponse adaptative spécifique à la déficience en Fe et Zn, des travaux ont mis en évidence son implication dans l'augmentation de biodisponibilité d'éléments en traces métalliques parmi lesquels Cu (Figure 13).

Les travaux de Treeby et al. (1989), Awad et Römheld (2000), Zhao et al. (2001) et Chaignon et al. (2002b) ont mis en évidence sous déficience en Fe, la mobilisation accrue en sols calcaires des éléments en traces métalliques Cu, Zn, Ni et Cd, concomitante avec l'augmentation de la sécrétion de phytosidérophores. D'autre part, Reichman et Parker (2005) ont modélisé avec le code de calcul de spéciation GEOCHEM-PC (Parker et al. 1995) la capacité de  $Fe^{III}$  et d'autres métaux pour être complexé par DMA (Figure 14). Les résultats de la modélisation suggèrent que  $Fe^{III}$  est majoritairement complexé par DMA à pH acide à neutre, alors que Zn, Ni, Cd et Cu forment des complexes plus stables avec DMA lorsque le pH augmente. Parmi ces métaux, Cu se distingue comme celui qui présente une forte stabilité du complexe formé avec DMA sur la plus large gamme de pH (de 5 à 9), c'est-à-dire correspondant aux valeurs de pH les plus souvent rencontrés dans les sols. A pH neutre ou alcalin,  $Fe^{III}$  semble donc incapable de rivaliser avec Cu et Ni pour la complexation avec DMA, vraisemblablement du fait des fortes constantes d'affinité des phytosidérophores envers ces éléments (tableau 2) (Murakami et al. 1989). Ainsi, en sols calcaires, la sécrétion de phytosidérophores en réponse à la faible disponibilité de Fe pourrait augmenter la disponibilité environnementale de métaux, particulièrement Cu, ce qui interférerait avec la capacité des phytosidérophores à alimenter convenablement la plante en Fe, dès lors que les

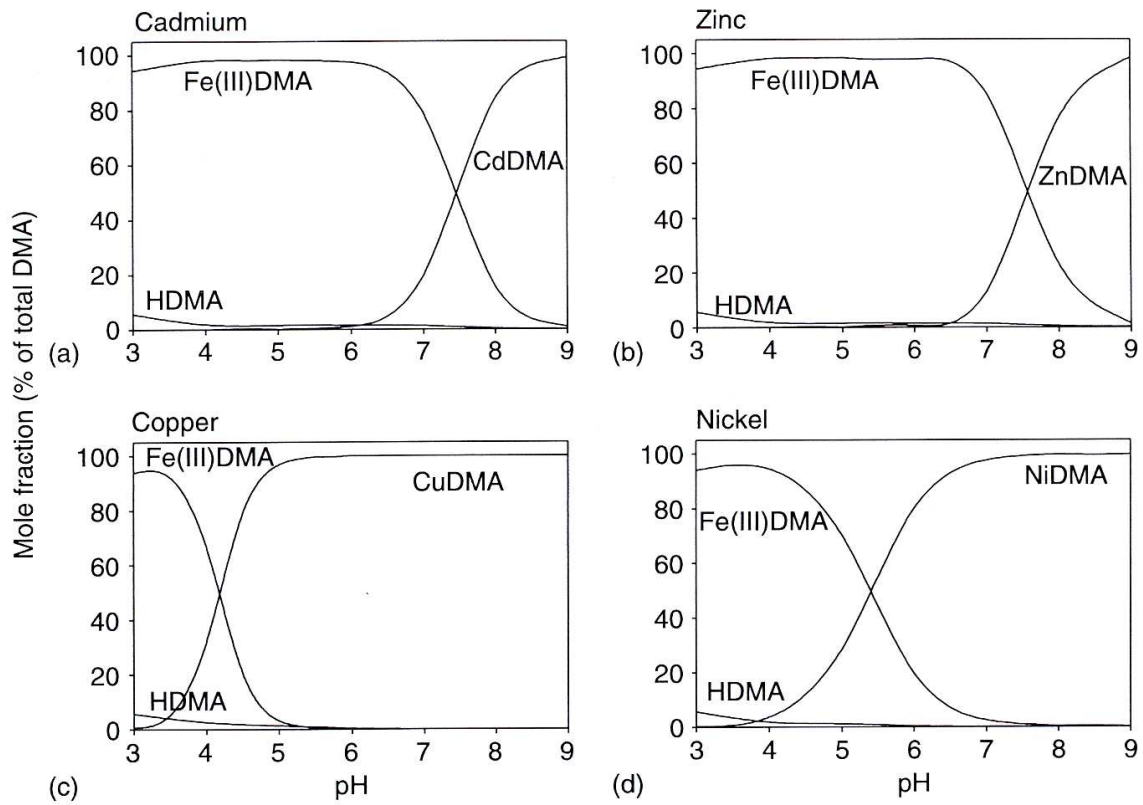
concentrations en Cu deviennent importantes (Reichman et Parker 2005), soit notamment en sols contaminés. D'ailleurs, des travaux ont montré que la mobilisation et le prélèvement de Fe complexé à des phytosidérophores chez l'orge étaient réduits par des excès de Cu et Zn, vraisemblablement du fait de l'effet inhibiteur des complexes métal-phytosidérophores sur la mobilisation et le prélèvement de Fe (Zhang et al. 1991 ; Ma et Nomoto 1993 ; Mori 1994). Les travaux de Meda et al. (2007) ont par ailleurs mis en évidence la diminution du prélèvement de Fe-DMA avec l'augmentation de Cd en solution suggérant l'implication de la complexation des phytosidérophores avec Cd.



**Figure 13** Stratégie d'acquisition du fer chez les graminées et interactions avec la biodisponibilité des éléments en traces métalliques (adapté de Treeby et al. 1989 ; Marschner 1995 ; Schaaf et al. 2004 ; Susuki et al. 2006 ; Xuan et al. 2006 ; Meda et al. 2007).

En plus du rôle des phytosidérophores dans la mobilisation de métaux, les travaux de Römheld et Awad (2000), Chaignon et al. (2002b) et Meda et al. (2007) ont mis en évidence que le prélèvement de Zn, Cu, Ni et Cd était significativement supérieur sous déficience en Fe chez le blé tendre et le maïs. Ils ont montré une augmentation concomitante de la sécrétion de phytosidérophores. Ceci suggère l'implication de ces ligands organiques dans l'augmentation de la biodisponibilité environnementale de ces métaux. Meda et al. (2007) ont également montré une augmentation de la sécrétion de phytosidérophores en présence d'une forte concentration de Cd en solution (25  $\mu$ M) en réponse à la mise en place d'une déficience induite en Fe. D'autre part, des complexes formés entre des phytosidérophores (DMA et MA) et des éléments en traces métalliques (Zn, Cu, Ni) pourraient être transportés par le transporteur ZmYS1 (Roberts et al. 2004, Schaaf et al. 2004a ; Meda et al. 2005) mais pas par HvYS1 qui serait au contraire spécifique des complexes formés avec Fe (Murata et al. 2006). Le complexe Cu-DMA a d'ailleurs été identifié dans des racines de blé, suggérant le prélèvement de ce complexe par les racines (Xuan et al. 2006). La complexation de Cu par

DMA aurait pu cependant se produire postérieurement à l'absorption. Bien que ces travaux montrent l'implication potentielle des phytosidérophores et de la stratégie d'acquisition de Fe dans l'augmentation de la biodisponibilité de métaux tels que Cu, il reste néanmoins à déterminer l'importance du prélèvement des complexes métal-phytosidérophore et leur rôle dans la contamination des céréales ou d'autres graminées.



**Figure 14** Compétition entre  $\text{Fe}^{\text{III}}$  et des cations métalliques pour la complexation avec DMA (Reichman et Parker 2005)



## **I.5. Hypothèses et objectifs**

### **I.5.1. Hypothèses de travail**

La biodisponibilité et la phytotoxicité de Cu semblent pouvoir interagir avec la nutrition en Fe chez les céréales comme le blé dur : (i) de par l'induction d'une déficience en Fe sous phytotoxicité de Cu et (ii) l'augmentation probable de la biodisponibilité de Cu sous déficience en Fe. Néanmoins, l'importance d'une telle interaction dans la mise en place d'une phytotoxicité de Cu en sols calcaires à antécédent viticole n'a pas été étudiée chez les céréales, particulièrement pour le blé dur qui est une céréale présentant une sensibilité supérieure à la déficience en Fe par rapport à d'autres espèces (blé tendre, orge, triticale).

Notre hypothèse de travail est la suivante : en sols calcaires à antécédent viticole contaminés en Cu, la biodisponibilité et les risques de phytotoxicité de Cu pour le blé dur pourraient être augmentés par la sécrétion accrue de phytosidérophores en réponse à une déficience en Fe induite par la faible disponibilité de Fe dans ces sols et, ce au détriment de l'acquisition de Fe. L'objectif général de ce travail est de contribuer à expliquer l'interaction entre la biodisponibilité, la phytotoxicité de Cu et la nutrition en Fe pouvant conduire à l'augmentation de la biodisponibilité et à l'apparition d'une phytotoxicité de Cu chez le blé dur cultivé en sols calcaires à antécédent viticole. Pour cela, la biodisponibilité et la phytotoxicité de Cu seront étudiées pour du blé dur, cultivé en hydroponie et dans une gamme de sols à antécédent viticole présentant des teneurs en Cu et des pH contrastés *in situ* et sous conditions contrôlées au laboratoire.

### **I.5.2. Objectifs de l'étude**

#### **Premier objectif**

La première partie de ce travail consistera à caractériser la phytotoxicité de Cu chez les céréales et plus particulièrement :

- (i) la mise en évidence de cas de phytotoxicité de Cu en sols calcaires chez le blé dur
- (ii) l'existence de différences inter- et intraspécifique de sensibilité à la mise en place d'une déficience en Fe chez les céréales cultivées en sols calcaires contaminés par Cu du fait d'un antécédent viticole
- (iii) la mise en place d'une déficience en Fe induite sous phytotoxicité de Cu
- (iv) la détermination d'indicateurs simples et de valeurs seuils de phytotoxicité pertinents chez les céréales comme le blé dur.

#### **Deuxième objectif**

La deuxième partie de ce travail consistera à mettre en évidence que la biodisponibilité de Cu chez le blé dur peut augmenter en sols calcaires ou dans des conditions où la disponibilité de Fe est faible et ce, en lien avec la nutrition en Fe, la libération de composés complexants (i.e. phytosidérophores) et des modifications chimiques induites dans la rhizosphère.

## Stratégie de recherche

La stratégie suivie consistera à réaliser des expérimentations *in situ* et sous conditions contrôlées au laboratoire pour : (i) mettre en évidence *in situ* d'une part la phytotoxicité de Cu en sols calcaires à antécédent viticole chez le blé dur et, d'autre part, des différences de sensibilité génotypiques chez les céréales à la mise en place d'une déficience en Fe en sols calcaires à antécédent viticole, et (ii) caractériser au laboratoire, la phytotoxicité de Cu et préciser l'interaction entre la biodisponibilité, la phytotoxicité de Cu et la nutrition en Fe pouvant expliquer les risques de phytotoxicité de Cu en sols calcaires. La partie du travail concernant les différences génotypiques de sensibilité à la mise en place d'une déficience en Fe en sols calcaires à antécédent viticole sera menée conjointement avec ARVALIS (L'Institut du Végétal).

Le prélèvement et la biodisponibilité de Cu, ainsi que les changements chimiques induits dans la rhizosphère (pH, extractibilité de Cu), seront étudiés *in situ* et au laboratoire avec le biotest adapté de Chaignon et Hinsinger (2003), au travers des teneurs et des quantités accumulées dans les plantes et de l'extractibilité de Cu par différentes extractions chimiques. L'interaction entre la biodisponibilité, la phytotoxicité de Cu et la nutrition en Fe sera étudiée en jouant sur le statut en Fe des plantes à l'aide de ce biotest appliqué à des sols à antécédent viticole et en hydroponie, en présence de différentes concentrations de Cu.

## **Chapitre II : Phytotoxicité de Cu en sols calcaires chez les céréales**

---

### **Introduction**

Les traitements fongicides de la vigne ont été longtemps fondés principalement sur la pulvérisation de sels de cuivre (Cu) sur les feuilles de vigne. Leur utilisation massive depuis la fin du 19<sup>ème</sup> siècle a engendré une pollution diffuse en Cu de la plupart des sols viticoles ce qui entraîne des risques de phytotoxicité de Cu pour les plantes cultivées dans ces sols. D'ailleurs, des problèmes de phytotoxicité de Cu ont été observés chez des céréales cultivées en sols calcaires à antécédent viticole en Suisse (Coullery 1997). En Languedoc-Roussillon, la crise viticole a provoqué l'arrachage massif de vignes (plus de 150 000 ha) au cours des dernières décennies, puis leur remplacement par d'autres cultures, particulièrement du blé dur. Se pose alors la question des risques écotoxicologiques de la contamination en Cu des sols à antécédent viticole pour des cultures céréalières succédant à la vigne.

Il est généralement admis que la disponibilité, la biodisponibilité et les risques de phytotoxicité des éléments en traces métalliques diminuent avec l'augmentation du pH du fait de la diminution de la concentration totale de l'élément et des espèces ioniques libres dans la solution du sol avec l'augmentation du pH. Contrairement à des éléments comme le zinc (Zn) et le fer (Fe), la concentration totale de Cu soluble ne diminue pas forcément avec l'augmentation du pH (McBride et Bouldin 1984 ; Tyller et Olsson 2001). En revanche, la concentration en espèces ioniques libres de Cu dans la solution du sol diminue avec l'augmentation du pH (Sauvé et al. 1997). D'autre part, des travaux ont mis en évidence que la biodisponibilité de Cu serait équivalente en sols calcaires et non calcaires pour du maïs alors qu'elle serait supérieure en sols non calcaires pour d'autres espèces de plantes comme le colza et la tomate (Brun et al. 2001 ; Chaignon et al. 2002a ; Cornu et al. 2007).

Le premier volet de l'étude réalisé *in situ* a consisté à (i) étudier le prélèvement et la phytotoxicité de Cu pour du blé dur cultivé en sols à antécédent viticole en identifiant des propriétés chimiques du sol et des changements induits dans la rhizosphère pouvant être reliées à des variations de prélèvement et de phytotoxicité de Cu et, (ii) étudier les différences de sensibilité entre espèces de céréales (blé dur, blé tendre, triticale) et génotypes d'une même espèce à la mise en place d'une déficience en Fe en sols calcaires à antécédent viticole.

Un échantillonnage de blé dur cultivé sur des parcelles à antécédent viticole présentant une gamme de teneurs en Cu (43 – 1030 mg kg<sup>-1</sup>) et de pH (4,2 – 7,8) a été réalisé pour la première partie de ce travail de terrain (article intitulé : 'Copper uptake and phytotoxicity as assessed in situ for durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cultivated in Cu-contaminated, former vineyard soils' accepté pour publication dans *Plant and Soil* en 2007). Pour la seconde partie, une expérimentation testant trois espèces de céréales (blé dur, blé tendre et triticale) et plusieurs cultivars a été menée conjointement avec ARVALIS sur deux parcelles à antécédent viticole présentant des symptômes récurrents de phytotoxicité de Cu sur du blé dur (projet d'article intitulé : 'Differential response to induced Fe-deficiency among 20 genotypes of durum wheat, bread wheat and triticale cropped in Cu-contaminated, calcareous soils').

**Copper uptake and phytotoxicity as assessed *in situ* for durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cultivated in Cu-contaminated, former vineyard soils**

A M Michaud, M N Bravin, M Galleguillos and P Hinsinger

INRA - SupAgro, UMR 1222 Biogéochimie du Sol et de la Rhizosphère, Place Viala, 34060 Montpellier cedex 1, France

Author for correspondence:

Philippe Hinsinger

Tel: +33 4 99 61 22 49

Fax: +33 4 99 61 30 88

Email: philippe.hinsinger@supagro.inra.fr

Short running title: *In situ* Cu uptake and phytotoxicity in *Triticum turgidum durum* L.

Published in *Plant and Soil* **298**, 99–111

## Abstract

This work assessed *in situ*, copper (Cu) uptake and phytotoxicity for durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cropped in a range of Cu-contaminated, former vineyard soils (pH 4.2 – 7.8 and total Cu concentration 32 – 1030 mg Cu kg<sup>-1</sup>) and identified the underlying soil chemical properties and related root-induced chemical changes in the rhizosphere. Copper concentrations in plants were significantly and positively correlated to soil Cu concentration (total and EDTA). In addition, Cu concentration in roots which was positively correlated to soil pH tended to be larger in calcareous soils than in non calcareous soils. Symptoms of Cu phytotoxicity (interveinal chlorosis) were observed in some calcareous soils. Iron (Fe) – Cu antagonism was found in calcareous soils. Rhizosphere alkalinisation in the most acidic soils was related to decreased CaCl<sub>2</sub>-extractable Cu. Conversely, water-extractable Cu increased in the rhizosphere of both non calcareous and calcareous soils. This work suggests that plant Cu uptake and risks of Cu phytotoxicity *in situ* might be greater in calcareous soils due to interaction with Fe nutrition. Larger water extractability of Cu in the rhizosphere might relate to greater Cu uptake in plants exhibiting Cu phytotoxic symptoms.

## Keywords

copper, iron, pH, phytotoxicity, rhizosphere, *Triticum turgidum durum* L.

### II.1.1. Introduction

The protective effect of copper (Cu) salts against the mildew of grape vine has been discovered at the end of the 19<sup>th</sup> century. Since then, the repeated use of Cu salts as fungicides sprayed on vines has caused Cu contamination of most vineyard soils in various countries (Brun et al. 2001; Chaignon et al. 2003; Pietrzak and McPhail 2004; Cattani et al. 2006). In the Languedoc region (Southern France), more than a third of the former vineyard surface area has been replaced by other crops, mainly durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.). While problems of Cu phytotoxicity have been seldom reported in vine, such problems have been found especially in cereals grown in calcareous soils in this region (Braun 2006) as well as in Switzerland (Coullery 1997). These findings were rather surprising as the bioavailability and phytotoxicity of metals is often thought to be minimal at higher pH.

In both soil solution and solid phase, Cu is mainly associated with organic matter by complexation or adsorption (Sauvé et al. 1997). Copper can also be adsorbed onto the surfaces of clays and Fe or Mn oxides, co-precipitated with carbonates and phosphates or present in the lattice of primary silicate minerals (McBride 1981). The distribution of Cu among these various soil components can be defined as the solid phase speciation of soil Cu. The chemically mobile fraction of an element is defined as the sum of the amount in soil solution and the amount retained by the solid phase that can be easily transferred into soil solution (Rieuwerts et al. 1998). The solid phase speciation of Cu will greatly influence the chemical mobility and hence, the amount of Cu potentially taken up by plants. This will thus depend on those soil chemical properties that govern the solid phase speciation of Cu. Actually, at acidic pH, dissolved Cu will increase because of its weaker adsorption and so will the free cupric ion activity (Sauvé et al. 1997). In addition, with increasing pH, competitive adsorption arises between organic matter in the solid phase and dissolved organic carbon (DOC), generally leading to an increase in Cu concentration in the soil solution due to increased DOC concentration (Carrillo-Gonzalez et al. 2006). However, upon increasing pH, the free cupric ion activity considerably decreases at the expense of organically-bound complex species in the soil solution (Sauvé et al. 1997). This is the reason why it is often considered that the phytotoxicity of Cu is minimal in calcareous soils, assuming that plants are only sensitive to the free cupric ion.

The rhizosphere is the volume of soil around roots that is influenced by the activity of living plant roots (Hinsinger et al. 2005). In the rhizosphere, root and microbial activities can change the liquid and solid phase speciation and ultimately the mobility of metals as a consequence of alterations of chemical properties such as soil pH or DOC concentration (Hinsinger and Courchesne 2007). In the particular case of Gramineous species, the increased root secretion of iron (Fe) chelating compounds under Fe deficiency, the so-called phytosiderophores, have been reported to increase Cu uptake in a calcareous soil (Chaignon et al. 2002b). In addition, root-mediated pH changes can influence the chemical mobility of nutrients and metals in the rhizosphere, and thereby their uptake by plants (Hinsinger et al. 2005). It has been shown that increasing the pH in the rhizosphere of plants grown in acidic soils can decrease aluminium (Al) concentration in the soil solution, and hence alleviate Al phytotoxicity (Marschner 1995; Kochian et al. 2004).

Copper is an essential nutrient which is known to result in phytotoxic damages such as rhizotoxicity and induced Fe deficiency when present at elevated concentrations (Marschner 1995). Numerous former studies were carried out to identify relationships between plant Cu uptake (or Cu phytotoxicity) and soil chemical properties, such as pH and various indicators

of Cu contamination (Sauvé et al. 1996; Brun et al. 2001; Chaignon et al. 2003; Nolan et al. 2005; Zhao et al. 2006). Those former studies were mainly carried out under controlled, artificial conditions, such as the use of sieved, air dried and sometimes spiked soils. In contrast, to our knowledge no study has been carried out *in situ* to evaluate the actual plant Cu concentration in roots and shoots and environmental risks of Cu phytotoxicity as related to soil chemical properties. In addition, soil chemical properties can differ between the bulk soil and the rhizosphere, so that considering soil chemical properties in the bulk soil might be a poor predictor of Cu uptake which actually depends on the peculiar chemical properties induced by roots in the rhizosphere. The aim of this work was thus to assess *in situ* the uptake and phytotoxicity of Cu in durum wheat cropped in Cu-contaminated, former vineyard soils and to identify the underlying soil chemical properties while taking account of root-induced chemical changes in the rhizosphere.

## II.1.2. Materials and methods

### *In situ* sampling of soils and plants

Forty two samples of Cu-contaminated, former vineyard soils and durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cultivated in these soils were collected between March and May 2006 at thirty kilometres around Béziers (Southern France, 60 km W of Montpellier). Soil samples comprised 20 calcareous and 22 non calcareous soils and covered a large range of pH and total Cu concentration (Table 1). Plants were harvested at the stage of 1 cm spike (end of tillering stage). The whole plants including the roots were collected by sampling 20x20x20 cm topsoil around a wheat row. Plants were extracted manually from the soil clods and the soil strongly adhering to the roots was operationally defined as the rhizosphere. This rhizosphere was collected by gently washing the roots in deionised water. A subsample of fresh bulk soil was washed in deionised water during 5 min in a soil:solution ratio close to the one used to recover the rhizosphere. An aliquot of the deionised water used for washing off the soil and the rhizosphere was filtered at 0.45 µm and frozen at -20°C prior to measuring its total Cu concentration (water extractable Cu). Soil samples (bulk, washed bulk and rhizosphere) were air-dried and sieved at 2 mm prior to being used for subsequent analysis. Roots and shoots of 8 plants were washed carefully with deionised water. Shoots were oven dried at 105°C and roots were frozen at -20°C.

### Plant analyses

Copper bound to root cell walls (root apoplasmic Cu) was determined as described by Chaignon et al. (2002b). Briefly, after thawing, a subsample of 0.8 g of roots (on a fresh matter basis) was shaken end-over-end with 40 cm<sup>3</sup> of 1 mM HCl for 3 min, then 360 mm<sup>3</sup> of 1 M HCl were added to yield a final concentration of 10 mM HCl. After shaking for another 3 min, the suspensions were filtered through ashless filter paper (Whatman 541) and roots recovered and oven dried at 105°C. After extraction of root apoplasmic Cu, Cu remaining in roots was considered to be symplasmic Cu. The remaining portion of untreated roots was also oven dried at 105°C. The oven dried roots and shoots were digested separately in a microwave oven with hot concentrated HNO<sub>3</sub>. Concentrations of Cu and Fe in the root and shoot digests were determined by Flame Atomic Absorption Spectrometry (Varian SpectrAA-600, Australia) and reference plant materials (BCR 62, olive (*Olea europaea* L.) leaves BIPEA V463, maize (*Zea mays* L.) shoots) were used as standards. Root symplasmic Cu was determined by measuring Cu concentration in the root digests of roots recovered after extraction of root apoplasmic Cu.

**Table 1** Selected chemical and physical properties of soils

Sample	Cu		pH CaCl <sub>2</sub>	CaCO <sub>3</sub> g kg <sup>-1</sup>	CEC cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>	Organic C g kg <sup>-1</sup>	Organic N g kg <sup>-1</sup>	Fe		Fe oxide		Mn oxide	clay	silt	sand
	mg kg <sup>-1</sup> soil							g kg <sup>-1</sup>		g kg <sup>-1</sup>		g kg <sup>-1</sup>		g kg <sup>-1</sup>	g kg <sup>-1</sup>
	total	EDTA	total	EDTA	Mehra J	Tamm	Deb	0–2 μm	2–50 μm	50–2000 μm					
1	117	41	4.2	nd	5.8	4.5	0.58	32	0.10	18.4	2.3	0.93	223	233	544
2	88	21	4.3	nd	11.6	10.5	1.00	32	0.08	19.7	0.8	0.33	373	186	441
3	100	42	4.6	nd	3.6	3.8	0.43	16	0.05	10.9	1.2	0.75	130	174	696
4	97	44	5.3	nd	9.8	17.0	1.51	23	0.09	13.1	0.7	0.28	253	284	463
5	82	29	5.4	nd	9.8	5.7	0.61	25	0.05	14.3	1.8	0.48	260	208	532
6	72	23	5.5	nd	14.7	6.0	0.69	36	0.04	20.5	1.7	0.42	363	209	428
7	79	23	5.5	nd	14.2	11.7	1.09	31	0.04	19.4	0.8	0.49	368	199	433
8	165	64	5.6	nd	14.8	15.1	1.56	36	0.07	19.7	1.4	0.27	383	250	367
9	53	21	5.8	nd	8.8	9.1	0.92	27	0.05	17.2	1.8	0.53	280	197	523
10	94	33	5.9	nd	15.8	9.1	1.00	31	0.03	16.0	1.3	0.44	383	220	397
11	89	36	5.9	nd	8.3	5.6	0.53	20	0.04	11.4	0.7	0.39	164	239	597
12	32	14	5.9	nd	10.8	7.8	0.75	19	0.04	10.7	1.2	0.30	241	170	589
13	184	77	6.0	nd	14.6	17.6	1.69	38	0.06	20.7	2.0	0.50	270	236	494
14	123	55	6.2	nd	14.1	8.9	0.81	23	0.04	12.7	0.9	0.32	263	275	462
15	150	63	6.3	nd	10.9	15.1	1.38	29	0.05	16.1	1.3	0.58	209	219	572
16	140	81	6.3	nd	10.4	11.9	0.92	12	0.07	5.7	1.0	0.20	152	214	634
17	87	34	6.3	nd	14.3	8.7	0.92	26	0.04	13.5	1.3	0.38	323	138	539
18	141	66	6.3	nd	14.5	8.8	0.83	24	0.04	13.9	0.9	0.35	270	295	435
19	158	72	6.4	nd	16.1	18.1	1.73	31	0.05	18.6	0.8	0.27	330	284	386
20	103	60	6.9	< 2	11.6	12.1	0.95	14	0.04	8.4	0.5	0.22	169	149	682
21	67	34	6.9	nd	10.9	11.1	1.05	17	0.03	9.6	0.6	0.23	200	208	592
22	152	61	7.2	nd	15.1	11.1	1.16	28	0.02	15.2	1.2	0.41	347	243	410
23	56	13	7.8	113	14.8	14.5	1.39	40	0.01	17.4	2.2	0.76	266	556	58
24	146	46	7.6	47	6.2	5.4	0.51	15	0.01	8.5	0.5	0.24	94	132	730
25	111	34	7.6	102	7.9	11.3	0.77	30	0.01	13.7	1.8	0.34	120	321	453
26	163	57	7.6	94	7.0	11.5	0.75	29	0.01	13.5	1.8	0.29	108	280	517
27	155	57	7.6	93	8.7	11.3	0.86	31	0.02	14.4	1.7	0.36	127	350	426
28	540	211	7.6	110	10.4	15.9	1.26	30	0.01	14.2	1.8	0.37	123	338	431
29	128	43	7.6	102	8.5	10.4	0.74	31	0.01	15.2	1.8	0.38	137	377	382
30	1030	488	7.5	87	11.7	23.6	1.65	29	0.01	13.7	1.9	0.35	131	380	384
31	59	20	7.6	25	13.1	3.5	0.40	19	0.01	10.1	0.9	0.42	205	180	593
32	70	29	7.7	278	8.7	7.0	0.62	12	0.01	6.9	0.4	0.10	133	184	402
33	84	37	7.6	154	13.1	13.8	0.92	16	0.01	4.8	0.4	0.20	152	218	475
34	117	51	7.7	204	11.8	11.2	0.70	17	0.01	4.8	0.4	0.21	152	212	421
35	120	62	7.6	261	9.6	14.2	0.94	15	0.01	4.2	0.4	0.22	99	192	429
36	150	74	7.6	207	11.5	15.0	1.04	16	0.01	4.5	0.4	0.23	118	228	430
37	114	49	7.6	279	10.4	8.2	0.76	11	0.01	3.5	0.4	0.16	133	145	454
38	78	34	7.7	298	10.6	8.9	0.97	10	0.01	3.5	0.5	0.18	135	140	415
39	43	11	7.5	6	16.7	5.4	0.53	24	0.01	12.4	0.7	0.50	292	145	557
40	106	33	7.7	154	16.3	8.4	0.77	23	0.00	12.1	0.4	0.30	290	193	356
41	103	37	7.5	4	16.8	7.3	0.65	28	0.02	17.7	0.5	0.13	332	189	475
42	147	56	7.5	75	15.1	12.8	1.13	19	0.01	10.1	0.9	0.26	207	232	493

nd: not determined because non calcareous soils



## Soil analyses

All the soil analyses that are summarised in Table 1 were carried out by a routine soil testing laboratory (INRA LAS Arras, France) according to standardised French procedures (AFNOR 1999) or international procedures (ISO 1999). Soil pH was measured in 0.01 M CaCl<sub>2</sub> using a 1:5 soil:solution ratio (ISO 10390–ISO 1999). After calcium (Ca) carbonate dissolution, the soil samples were partitioned into five particle size fractions, 0–2, 2–20, 20–50, 50–200, 200–2000 µm. Cation exchange capacity (CEC) was determined by cobaltihexammine chloride extraction. Total Ca carbonate, total nitrogen and organic carbon concentrations were determined according to ISO (1999). Total Cu and Fe concentrations were determined by HF-HClO<sub>4</sub> extraction. The fraction of soil Cu and Fe which was potentially available to the plant was determined by using a solution of 0.01 M Na<sub>2</sub>-EDTA (ethylene diaminetetraacetic acid)/ammonium acetate (pH 7). The Fe oxide concentrations were determined by Mehra-Jackson and Tamm (darkness) methods while the Mn oxide concentration was determined by the Deb method (Baize 2000).

The pH, water- and CaCl<sub>2</sub>-extractable Cu were determined in the rhizosphere and bulk soil. Copper extracted by water was determined during the soil and root sampling process as described above. An aliquot of air-dried rhizosphere and bulk soil was shaken in a solution of 0.01 M CaCl<sub>2</sub> for 2 h using a 1:10 soil:solution ratio (Lebourg et al. 1998). The suspension was then centrifuged at 10 000 g for 10 min. After measuring the pH, the supernatant was kept at 4°C before assaying Cu concentration. Copper concentration in water extracts was determined by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (Varian SpectrAA-600). Copper concentration in CaCl<sub>2</sub> extracts was determined by Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry (Varian Vistapro)

## Statistical analyses

Linear regressions (Spearman R) and analyses of variance (Kruskal-Wallis analyses) with nonparametric tests were performed to identify significant differences with Statistica® (Statsoft Inc., version 6, Tulsa, OK, USA).

### II.1.3. Results

#### Soil Cu concentration

The amounts of total Cu in soil samples varied considerably, ranging from 32 mg kg<sup>-1</sup> in sample 12, which is close to normal, geochemical background level in soils, to 184 mg kg<sup>-1</sup> in sample 13, for 40 out of the 42 soil samples (Table 1). The amount of total Cu in soil samples 28 and 30 reached 540 and 1030 mg kg<sup>-1</sup> respectively, which is fairly large compared with the other soil samples. The abnormally elevated Cu concentration in these 2 samples resulted from localized contamination as a result of repeated filling with Cu salts of the fungicide tank to spray vines. Copper extracted by EDTA also varied considerably from 11 to 488 mg kg<sup>-1</sup> and amounted to 23-58% of total soil Cu. Soil pH varied considerably among the 42 samples, from 4.2 to 7.2 for the 22 non calcareous soils (samples 1 to 22) and from 7.5 to 7.8 for the 20 calcareous soils (samples 23 to 42), for which the CaCO<sub>3</sub> concentration varied from 4 to 298 g kg<sup>-1</sup>.

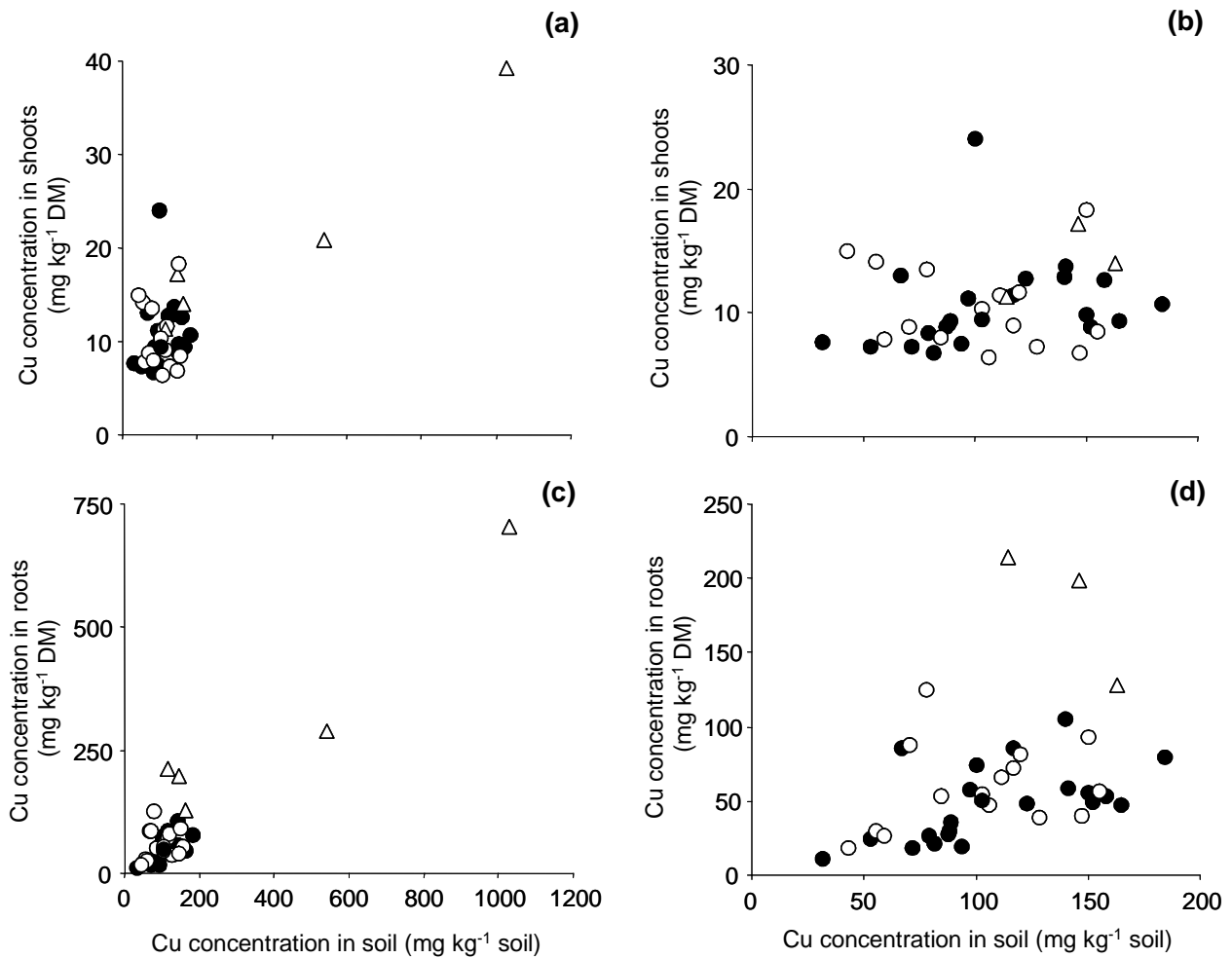
## Plant Cu and Fe concentration

The Cu concentration in shoots varied from 6 to 39 mg kg<sup>-1</sup> DM (Table 2 and Fig. 1a). The total and symplasmic Cu concentrations in roots varied even more so, from 11 to 705 mg kg<sup>-1</sup> DM (about 66-fold) and from 6 to 150 mg kg<sup>-1</sup> DM (about 25-fold), respectively (Table 2 and Fig. 1c). The symplasmic Cu amounted to 16-57% of total Cu in roots. The shoot/root ratios of Cu concentration decreased with increasing Cu concentration in soils, ranging from 0.86 for one of the least Cu-contaminated soils (sample 39) to 0.06 for the most Cu-contaminated soil (sample 30). Moreover, root Cu concentration was significantly (at  $P < 0.05$ ) larger in calcareous soils than in non calcareous soils for the 42 soil samples (Fig. 1c). When excluding the two most Cu-contaminated samples (samples 28 and 30) in order to compare the two types of soils in the same range of soil Cu concentration (Fig. 1d), root Cu concentration was not significantly larger in calcareous soils than in non calcareous soils. For shoot Cu concentration, there was no significant difference between the calcareous and non calcareous soils (Fig. 1b). Interveinal chlorosis symptoms (yellow stripes) along the length of the leaves (Fig. 2a) were observed in durum wheat grown in 5 of the sampled calcareous soils, either in isolated spots (samples 28 and 30) (Fig. 2b) or diffuse spots (samples 24 and 26). These were also observed along rows across the field in sample 37 (Fig. 2c). These interveinal chlorosis symptoms were particularly pronounced in the most Cu-contaminated soil which contained 1030 mg Cu kg<sup>-1</sup> (Fig. 2a). In these field plots, pairs of soil samples were collected where plants were exhibiting or not the interveinal chlorosis symptoms in order to test whether these were possibly linked with Cu phytotoxicity. Samples 27 and 29 were sampled in the field plot beside the spots corresponding to the 2 most Cu-contaminated soil samples, samples 28 and 30 respectively. Samples 37 and 38 were sampled in the same field plot, in one of the rows formed by durum wheat exhibiting the interveinal chlorosis symptoms and outside of these rows, respectively. The last pair of samples corresponded to samples 25 and 26 for which plants presented no symptoms and symptoms of interveinal chlorosis, respectively. In these pairs of samples, soil Cu concentration was larger in soils corresponding to plants exhibiting interveinal chlorosis symptoms (Table 1). The Cu concentrations in plants which exhibited such symptoms was larger than in plants which had no symptoms and reached 11-39 mg kg<sup>-1</sup> DM in shoots (Table 2 and Fig. 2a) and 128-705 mg kg<sup>-1</sup> DM in roots (Table 2 and Fig. 2c). In addition, the shoot/root Cu concentration ratios of plants exhibiting interveinal chlorosis symptoms were among the lowest, especially in samples 28, 30 and 37 (0.07, 0.06 and 0.05 respectively).

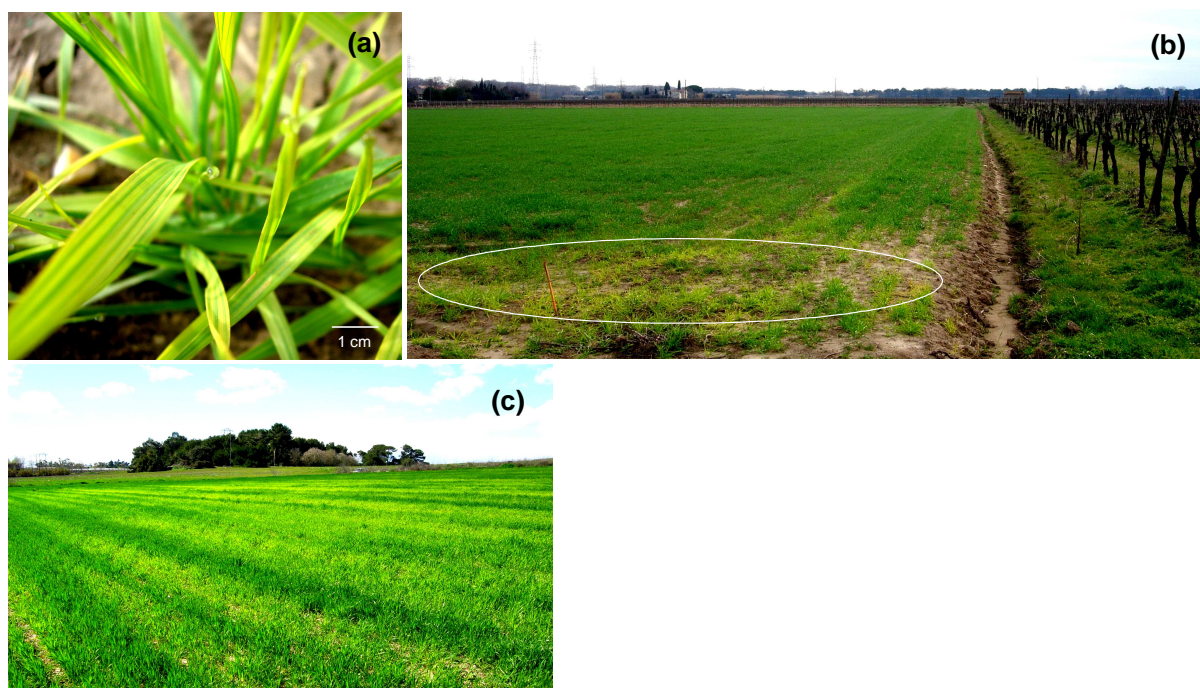
The Fe concentration in shoots varied from 79 to 412 mg kg<sup>-1</sup> DM and the Fe concentration in roots varied from 1078 to 7166 mg kg<sup>-1</sup> DM (Table 2). Moreover, the root Fe concentration tended to decrease with increasing soil Cu concentration (Fig. 3a) and root Cu concentration (Fig. 3b), particularly in calcareous soils. In contrast, the Fe concentration in shoots did not show any relationship with either soil or shoot Cu concentrations. Noteworthy, plants exhibiting interveinal chlorosis symptoms exhibited the largest root Cu concentrations, among the lowest root Fe concentrations and among the largest shoot Fe concentrations.

**Table 2** Plant Cu and Fe concentration in shoots and roots, and shoot/root ratios of the Cu concentration in plant parts

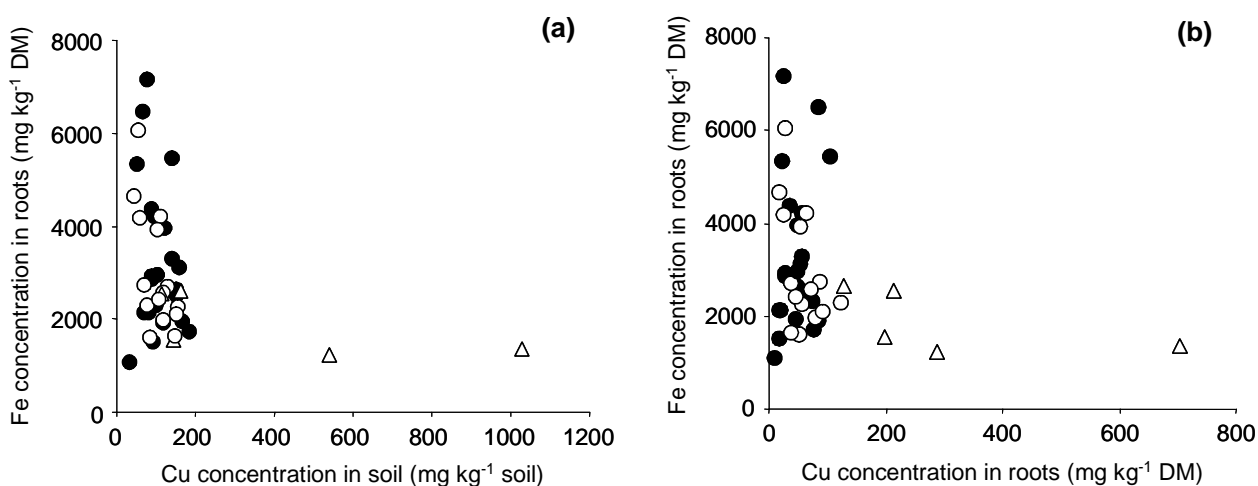
sample	Cu concentration			Shoot/root ratios	Fe concentration	
	mg kg <sup>-1</sup> DM			Cu	mg kg <sup>-1</sup> DM	
	shoots	roots (total)	roots (symplasmic)		shoots	roots
1	11	85	29	0.31	79	1907
2	9	30	8	0.13	302	2854
3	24	74	27	0.33	149	2298
4	11	57	16	0.20	276	4201
5	7	20	11	0.32	135	2128
6	7	17	8	0.20	181	2126
7	8	26	14	0.42	266	7166
8	9	47	14	0.33	193	1943
9	7	23	12	0.31	326	5323
10	7	18	10	0.41	82	1509
11	9	36	13	0.26	134	4356
12	8	11	6	0.18	116	1078
13	11	78	16	0.32	127	1717
14	13	48	18	0.71	294	3956
15	10	55	22	0.24	364	2505
16	13	105	30	0.27	217	5444
17	9	27	13	0.14	112	2911
18	14	58	19	0.18	184	3289
19	13	53	14	0.24	169	3120
20	9	50	10	0.12	110	2961
21	13	85	21	0.15	189	6475
22	9	49	22	0.19	213	2620
23	14	29	8	0.49	271	6040
24	17	198	45	0.09	182	1531
25	11	65	14	0.17	255	4206
26	14	128	26	0.11	171	2619
27	8	56	12	0.15	277	2256
28	21	289	69	0.07	251	1217
29	7	39	10	0.19	168	2706
30	39	705	150	0.06	331	1358
31	8	26	8	0.30	119	4185
32	9	87	19	0.10	81	2715
33	8	53	9	0.15	173	1610
34	9	72	16	0.13	168	2580
35	12	80	13	0.14	156	1976
36	18	93	15	0.20	223	2103
37	11	213	57	0.05	166	2536
38	13	125	26	0.11	183	2280
39	15	17	7	0.86	193	4649
40	6	47	11	0.14	105	2404
41	10	54	14	0.19	412	3924
42	7	40	10	0.17	95	1632



**Figure 1** Copper concentration in plant parts ( $\text{mg kg}^{-1}$  DM) as a function of Cu concentration in soil ( $\text{mg kg}^{-1}$  soil), measured in shoots (a)(b) and in roots (c)(d), for the 42 samples (a)(c) and for 40 samples (without the two most Cu-contaminated samples 28 and 30) (b)(d). Open circles stand for plants grown in calcareous soils and open triangles stand for plants grown in calcareous soils and exhibiting interveinal chlorosis symptoms while dark circles stand for plants grown in non calcareous soils.



**Figure 2** Interveinal chlorosis symptoms of alternate yellow and green stripes along the length of the leaf observed in durum wheat (a) cropped in the spot represented by the white circle where the tank for fungicide treatment of former vines was filled with Cu-salts (sample 30) (b) and such symptoms observed in durum wheat along rows across the field (sample 37) (c).



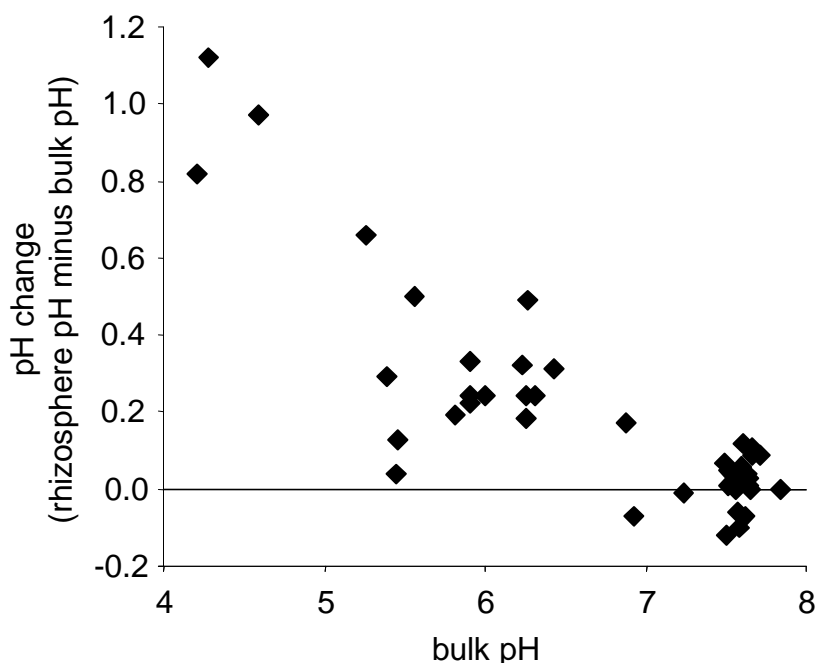
**Figure 3** Iron concentration in roots ( $\text{mg kg}^{-1}$  DM) as a function of Cu concentration in soil ( $\text{mg kg}^{-1}$  soil) (a) or Cu concentration in roots ( $\text{mg kg}^{-1}$  DM) (b) for the 42 samples. Open circles stand for plants grown in calcareous soils and open triangles stand for plants grown in calcareous soils and exhibiting interveinal chlorosis symptoms while dark circles stand for plants grown in non calcareous soils.

## Relationships between plant Cu concentration and soil properties

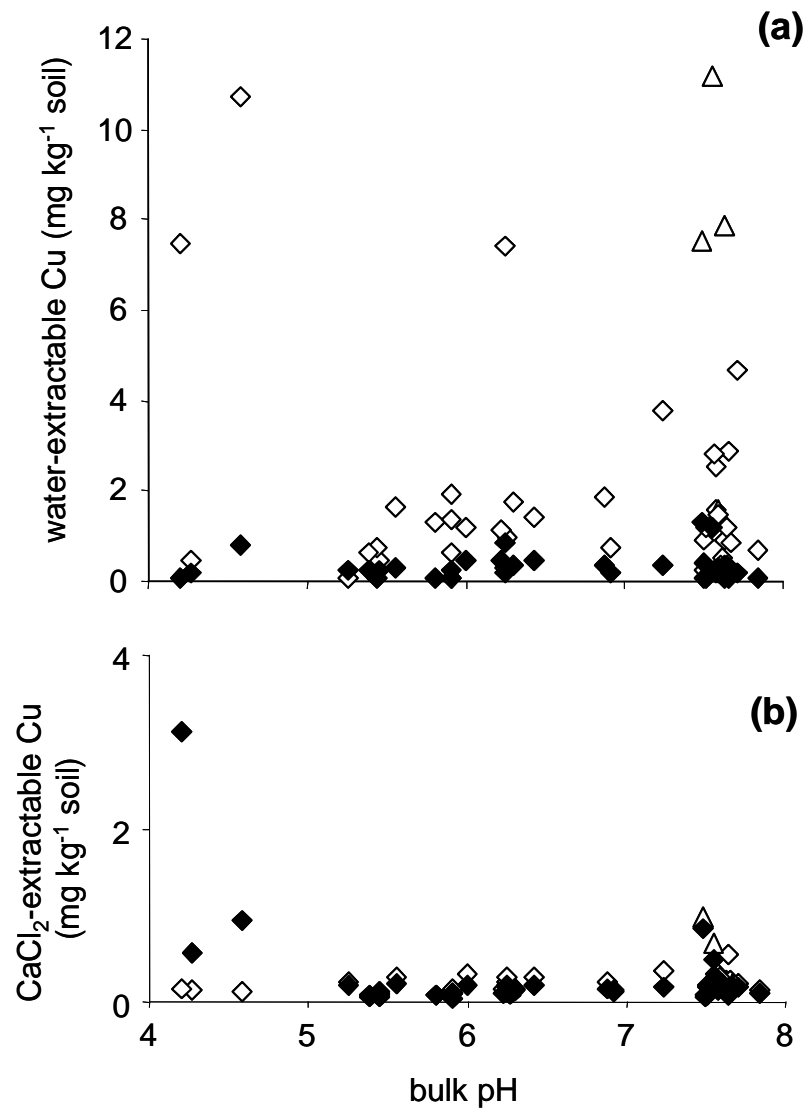
Linear regressions were performed in order to define the relationships between Cu concentrations in plant parts (shoot Cu and root Cu), extractable soil Cu (total and EDTA-Cu) and other soil properties (pH, CEC, CaCO<sub>3</sub>, organic C, total N, Fe and Mn oxides and clay concentrations). As the two most Cu-contaminated samples (samples 28 and 30) were assumed to strongly influence some of the relationships, especially between soil Cu concentration and Cu concentrations in plants parts, linear regressions were also performed without samples 28 and 30. Relationships between root and shoot Cu concentrations and total soil Cu concentration are shown in Fig. 1. Shoot Cu concentration was correlated to total soil Cu concentration only when considering the 42 soils (Fig. 1a) ( $r = 0.32$ ,  $P < 0.05$ ), not when excluding the two most contaminated soils (samples 28 and 30) (Fig. 1b). In contrast, a stronger relationship was found for root Cu concentration which increased with increasing total soil Cu concentration ( $r = 0.56$ ,  $P < 0.01$ ) (Fig. 1c) even when excluding the two most contaminated soils ( $r = 0.49$ ,  $P < 0.01$ ) (Fig. 1d). In addition, Cu concentration in shoots and roots were positively correlated to EDTA extractable Cu ( $r = 0.42$  and  $0.65$ , respectively,  $P < 0.01$ ) for the 42 samples, even when excluding the two most Cu-contaminated soils ( $r = 0.34$ ,  $P < 0.05$  and  $0.59$ ,  $P < 0.01$ , respectively), Soil pH was positively correlated to root Cu concentration ( $r = 0.33$ ,  $P < 0.05$ ), even when excluding the two most Cu-contaminated soils ( $r = 0.32$ ,  $P < 0.05$ ). Conversely, organic carbon concentration was not correlated to both shoot and root Cu concentrations. Nevertheless, it was positively correlated to total soil Cu concentration ( $r = 0.54$ ,  $P < 0.01$ ) for the 42 soils and when excluding the two most Cu-contaminated soils ( $r = 0.47$ ,  $P < 0.01$ ). Moreover, root Cu concentration appeared negatively correlated to clay content ( $P < 0.01$ ), CEC ( $P < 0.01$ ), Mehra-Fe oxides ( $P < 0.05$ ) and Mn oxides ( $P < 0.01$ ), while it appeared positively correlated to CaCO<sub>3</sub> concentration ( $P < 0.01$ ), even when excluding the two most Cu-contaminated soils.

## Chemical changes in the rhizosphere

Soil pH changes in the rhizosphere were negatively correlated to bulk soil pH ( $r = -0.83$ ,  $P < 0.01$ ) (Fig. 4). In non calcareous soils, a significant ( $P < 0.05$ ) increase in rhizosphere pH was observed with decreasing soil pH. Rhizosphere alkalization was particularly pronounced in the most acidic soils (bulk soil pH equal or below 4.6 in samples 1-3) as it reached 0.8-1.1 pH units. In contrast, no significant change of rhizosphere pH was observed in the calcareous soils, as expected due to their large pH buffering capacity. The amount of Cu extracted by water varied from non detectable values (detection limit of  $3 \mu\text{g dm}^{-3}$ ) to  $1.2 \text{ mg kg}^{-1}$  in the bulk soil and from non detectable values to  $11.1 \text{ mg kg}^{-1}$  in the rhizosphere (Fig. 5a). Amounts of Cu extracted by water were thus significantly ( $P < 0.01$ ) larger in the rhizosphere whatever the bulk soil pH. The largest amounts of Cu extracted by water were observed in the rhizosphere of either those plants growing in the most acidic soils (samples 1 and 3) or to those plants exhibiting interveinal chlorosis symptoms (samples 28, 30 and 37, triangles in Fig. 5a) combined with the largest root Cu concentrations. The amounts of Cu extracted by water in the rhizosphere presented the largest values and were significantly ( $P < 0.01$ ) larger than the amounts of Cu extracted by  $\text{CaCl}_2$ . Indeed, the amounts of Cu extracted by  $\text{CaCl}_2$  varied from 0.06 to  $3.1 \text{ mg kg}^{-1}$  in the bulk soil and from 0.07 to  $1.0 \text{ mg kg}^{-1}$  in the rhizosphere (Fig. 5b). The amounts of Cu extracted by  $\text{CaCl}_2$  were slightly larger in the rhizosphere than in the bulk soil for 38 samples, but no significant difference was observed. In contrast, for 4 samples including the 3 most acidic soils (samples 1-3) the amounts of Cu extracted by  $\text{CaCl}_2$  were by far lower in the rhizosphere, compared with the bulk soil. Indeed, at bulk soil pH below 4.6, Cu extracted by  $\text{CaCl}_2$  reached  $0.6\text{-}3.1 \text{ mg kg}^{-1}$  in the bulk soil, while it amounted to only  $0.1\text{-}0.2 \text{ mg kg}^{-1}$  in the rhizosphere.



**Figure 4** Soil pH change (rhizosphere pH minus bulk soil pH) as a function of bulk soil pH (pH values measured in the  $\text{CaCl}_2$  extract).



**Figure 5** Copper extracted by water ( $\text{mg kg}^{-1}$  soil) (a) and Cu extracted by  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{mg kg}^{-1}$  soil) (b) as a function of the pH measured in the bulk soil. Open diamonds stand for Cu extracted in the bulk soil and open triangles stand for Cu extracted in the rhizosphere of plants exhibiting interveinal chlorosis symptoms while dark diamonds stand for Cu extracted in the bulk soil.



## II.1.4. Discussion

### Plant Cu uptake and Cu phytotoxicity in field-grown plants

In spite of the large range of total Cu concentration in the 42 investigated soils, Cu concentration in shoots varied within a narrow range, while root Cu concentration varied considerably (Table 2 and Fig. 1). The proportion of Cu actually absorbed by roots, i.e. symplasmic Cu, represented between 16-57% of total root Cu concentration. This confirmed for field-grown plants the results obtained in former studies conducted in the laboratory suggesting that the major part of root Cu was adsorbed onto root cell walls (Chaignon et al. 2002b), notably in calcareous soils as their high pH is prone to enhanced adsorption. With increasing soil Cu concentration, plants appeared capable of restricting Cu translocation towards their aerial parts, particularly in plants exhibiting interveinal chlorosis symptoms (shoot/root ratios in Table 2). As stressed in former studies, root Cu concentration was by far more sensitive to soil Cu contamination and thus appeared as a better indicator of Cu contamination than shoot Cu concentration presumably due to efficient control of Cu translocation from roots to shoots (Brun et al. 2001; McBride 2001; Chaignon and Hinsinger 2003; Chaignon et al. 2003).

Copper concentrations in plants exhibiting interveinal chlorosis were larger, particularly in roots, than in plants which did not display such symptoms (Table 2 and Fig. 2). Such interveinal chlorosis symptoms in leaves of cereals are widely recognized as indicative of lime-induced Fe deficiency (Marschner 1995; Mengel and Kirkby 2001). When comparing pairs of samples of durum wheat exhibiting or not such interveinal chlorosis as collected in nearby locations in the same field plots, larger soil Cu concentration in samples 26, 28, 30 and 37 occurred to be related to larger plant Cu concentrations and Fe deficiency symptoms, compared with samples 25, 27, 29 and 38. Several studies with hydroponically-grown plants have reported that Cu phytotoxicity can result in chlorosis as a consequence of induced Fe deficiency (Lexmond and Van der Vorm 1981; Wheeler and Power 1995; Koppitke and Menzies 2006). In addition, McBride (2001) observed interveinal chlorosis symptoms in maize grown in Cu-spiked soils. Historical Cu contamination of vineyard soils seems to have resulted in Cu accumulation in plants, and hence in Fe deficiency chlorosis symptoms presumably related to Cu phytotoxicity.

### Interaction between Fe nutrition and Cu phytotoxicity

Root Fe concentration decreased with increasing soil Cu concentration (Fig. 3a) and with increasing root Cu concentration (Fig. 3b), especially for calcareous soils for which even when excluding the two most contaminated soils (samples 28 and 30) such decrease was still noticeable. Moreover, interveinal chlorosis symptoms coincided with low root Fe concentration, especially in the two most Cu-contaminated soils (Table 2). This suggested an antagonistic relation between Cu and Fe which may have led to impaired Fe uptake and to decreased Fe concentration in roots. In contrast, no such relationship was observed for shoot Fe concentration (Table 2). It has been reported that leaves exhibiting Fe deficiency symptoms may have larger total Fe concentrations than control leaves, probably because of Fe immobilization in the leaf apoplast (Sattelmacher 2001). Moreover, former studies showed that metabolically active Fe in leaves was better predictor of the Fe status compared with total Fe (Lang and Reed 1987). Determining active Fe in shoots may thus have led to ascertain whether interveinal chlorosis is due to low Fe activity as a result of Cu phytotoxicity. In addition, it has been shown in bread wheat that Cu uptake increased under Fe deficiency in a

Cu-contaminated, calcareous soil as related to increased secretion of phytosiderophores (Chaignon et al. 2002b). In such soils, increased secretion of phytosiderophores might have increased the Cu uptake by plants at the expense of Fe uptake (Reichman and Parker 2005), so that symptoms of Cu phytotoxicity and induced Fe deficiency coincided, as shown by the interveinal chlorosis observed *in situ*.

### **Plant Cu concentration versus soil properties**

Among soil chemical properties, soil pH, organic carbon concentration and soil Cu concentration are expected to influence the solid phase speciation of Cu (McBride 1981) and hence, Cu bioavailability. The EDTA extractable fraction of a metal is considered as the environmentally available fraction, i.e. the fraction which is potentially available for soil organisms (Harmsen et al. 2005). In the present work EDTA extractable Cu was indeed slightly better correlated to plant Cu concentration than total soil Cu. Our results, in spite of having been obtained *in situ*, are in line with those of Brun et al. (2001), Chaignon et al. (2003) and Nolan et al. (2005) who reported in pot experiments that total Cu concentration could surprisingly be an adequate predictor of plant Cu concentration, especially for root Cu concentration (Fig. 1). Nevertheless, poor linear correlation coefficients between plant Cu concentration and soil Cu concentration were obtained especially for mild soil Cu-contamination. This may be explained by sources of variations among the studied sites, and hence of factors influencing plant growth and Cu uptake which are manifold and include for instance variations in microclimate, agricultural practices and durum wheat cultivars. In addition, more evenly distributed soil Cu concentrations in the investigated range would have possibly improved the relationships between soil Cu concentration and plant Cu concentration, or at least help to ascertain these.

Literature reported contradictory results concerning the effect of pH on Cu uptake by plants. In very acidic soils, plant Cu concentration increased compared to calcareous soils in rape (*Brassica napus* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) (Chaignon et al. 2002a, 2003; Cornu et al. 2007). Conversely, Cu accumulation in maize was as high in calcareous soils as in acid soils (Brun et al. 2001) and, according to Zhao et al. (2006) increasing soil pH may even increase Cu toxicity at a given free  $\text{Cu}^{2+}$  activity. The apparent paradox of increasing Cu toxicity with increasing pH, presumably due to decreased competition between proton and Cu for adsorption onto root cell walls, is partly explained by the Terrestrial Biotic Ligand Model (TBLM) which accounts for the effects of competing cations (proton, magnesium, calcium) at the biotic ligand sites and has been shown to adequately predict Cu toxicity (Thakali et al. 2006a, b). In the present study, no clear relationship between plant Cu uptake and soil pH was found. Nevertheless, root Cu concentration was positively correlated to soil pH and was significantly larger in calcareous soils than in non calcareous soils when considering the two most Cu-contaminated soils (samples 28 and 30), suggesting that root Cu concentration tended to increase with increasing pH. In addition, Fe chlorosis symptoms probably related to Cu phytotoxicity were observed only in calcareous soils. This suggests that plant Cu uptake and risks of Cu phytotoxicity might be greater in calcareous soils than in non calcareous soils. However, the investigated range of soil Cu concentration in non calcareous soils may have been too low to induce visible symptoms of Cu phytotoxicity. In addition to the abovementioned symptoms associated with induced Fe deficiency, it is well known that the primary symptom of Cu toxicity in plants is rhizotoxicity, which results in reduced root elongation (Koppitke and Menzies 2006). But, the sampling method employed in the present work was not suited to recover the whole root system and reliably measure root length.

## Root-induced changes in the rhizosphere of field-grown plants

Soil properties can differ between the bulk soil and the rhizosphere, so that chemical properties of the bulk soil might be poor predictor of Cu bioavailability which rather depends on the peculiar properties of the rhizosphere (Hinsinger and Courchesne 2007). Alkalization occurred at low pH in the rhizosphere compared with the bulk soil (Fig. 4). In non calcareous soils, such rhizosphere alkalization had been observed in pot experiment by Chaignon et al. (2002a), particularly at pH below 5.5. In the present work which reports on samples collected in field-grown plants, the large alkalization (0.8-1.1 pH unit) observed in the rhizosphere for the most acidic soils (samples 1-3) might have resulted from tolerance mechanism to low pH and resulting aluminium (Al) toxicity (Kochian et al. 2004). Such alkalization can affect rhizosphere chemistry, alleviate Al toxicity and similarly reduce Cu availability.

Copper extractability was indeed altered in the rhizosphere (Fig. 5). Water extractable Cu is supposed to represent dissolved Cu in the soil solution (Courchesne et al. 2006) and CaCl<sub>2</sub> extractable Cu represents exchangeable Cu (Chaignon et al. 2002a). Copper extracted by water was significantly larger in the rhizosphere than in the bulk soil whatever the soil pH (Fig. 5a). Conversely, amounts of Cu extracted by CaCl<sub>2</sub> in the most acidic soils (samples 1-3) were by far larger in the bulk soil (about 4- to 18-fold larger). It has been shown that alkalization in the rhizosphere of tomato resulted in a reduction in the solubility of soil Cu (Cornu et al. 2007). In the present work, rhizosphere alkalization in the most acidic soils might have reduced CaCl<sub>2</sub> extractability but not water extractability of Cu.

The percentage of free Cu<sup>2+</sup> has been shown to decrease with increasing pH and due to larger DOC (Vulkan et al. 2000). Actually, the major fraction of total soil solution Cu is usually present as a range of Cu-organic complexes, particularly at pH levels above 5 (Römken et al. 1999). Former studies have reported larger DOC concentration in the rhizosphere compared with the bulk soil and have concomitantly observed larger amounts of dissolved Cu in the rhizosphere than in the bulk soil (Cattani et al. 2006; Courchesne et al. 2006). In addition, it has been observed that Ca-induced coagulation of organic matter might lead to underestimate Cu bound to organic matter in CaCl<sub>2</sub> extracts (Sauvé et al. 1997). In the present study, greater water extractability of Cu in the rhizosphere, compared with CaCl<sub>2</sub> extractability, could thus result from greater DOC concentration in the rhizosphere and presumably from larger concentration of dissolved organic substances able to mobilize Cu from the solid phase by complexation. Indeed, cereals release phytosiderophores (Reichman and Parker 2007), which have been shown to contribute to Zn and Cu mobilization in calcareous soils especially as a response to Fe deficiency (Treeby et al. 1989; Chaignon et al. 2002b). In calcareous soils which are prone to induce Fe deficiency, the release of phytosiderophores might thus explain the greater water extractability of Cu observed in the rhizosphere, compared with the bulk soil, which was particularly elevated in the rhizosphere of those plants which exhibited Fe deficiency symptoms (interveinal chlorosis) and the largest root Cu concentration (samples 28, 30 and 37). This may explain the increased uptake of Cu by plants found in these soils leading to Fe chlorosis. Degryse et al. (2006) observed that at a given free Cu<sup>2+</sup> activity, Cu uptake was less in weakly buffered solutions than in solutions strongly buffered by soluble Cu complexes. In calcareous soils, larger amount of soluble organically bound Cu may serve as Cu buffer and lead to greater Cu uptake and phytotoxicity. Actually, the calcareous soils in which root Cu concentration and Cu phytotoxicity occurred had relatively high organic C contents (samples 26, 28 and 30). The buffering effect of DOC in the soil solution of calcareous soils may therefore be another reason for greater Cu phytotoxicity. Moreover, increased root exudation of organic anions as Cu- and Al-resistance mechanism was shown in

various species, including wheat (Rengel 1996; Ma et al. 2001). In very acid soils, such increase in organic anion exudation could have resulted in Cu mobilization from the solid phase, leading to larger water extractability of Cu and to lower concentration of free  $\text{Cu}^{2+}$  species in soil solution due to complexation with organic anions, ultimately resulting in lower Cu uptake by plants despite the strong acidic pH of the bulk soil.

In conclusion, our results showed that total soil Cu and EDTA extractable Cu could be reasonable predictors of Cu concentrations in field-grown plants, especially in elevated Cu-contaminated, former vineyard soils. This work revealed that plant Cu uptake and even risks of Cu phytotoxicity (interveinal chlorosis) as observed *in situ* might be larger in calcareous soils than in non calcareous soils due to a possible antagonism between Cu and Fe and larger DOC in soil solution. In addition, our results suggest the implication of root-induced changes of pH and DOC in the rhizosphere, leading to changes in solid phase speciation of Cu in the rhizosphere relative to the bulk soil, with potentially larger chemical mobility in the rhizosphere, as shown by the larger water extractability of Cu in the rhizosphere. In the most acidic soils, the large root-induced alkalisation may result in reduced Cu bioavailability. In the calcareous soils, the larger chemical mobility may be related to phytosiderophore secretion leading to greater Cu uptake in plants exhibiting Cu phytotoxic symptoms (interveinal chlorosis). Nevertheless, further experiments in controlled conditions are needed to demonstrate the implication of these root-induced chemical changes (e.g. pH, DOC) in the rhizosphere of cereals in Cu acquisition and phytotoxicity.

### II.1.5. Acknowledgements

We thank Jean-Pierre Barthès, Philippe Braun and Alain Alies for their technical support in this research and for identifying the soils to be sampled. The availability of farmers is gratefully acknowledged. We also thank Marc Benedetti, Laurence Denaix and André Schneider for their constructive comments. Financial support for this work was provided by the French Ministry of Ecology and Sustainable Development through its PNETOX programme, as well as an ECCO-ECODYN project.

### II.1.6. References

- Afnor 1999 Recueil de Normes Françaises. Qualité des sols. Afnor, Paris
- Baize D 2000 Guide des analyses en pédologie, 2ème édition revue et augmentée. INRA, Paris
- Braun P 2006 Diagnostic des accidents du blé dur. ARVALIS - Institut du végétal, Paris
- Brun LA, Maillet J, Hinsinger P and Pépin M 2001 Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils. *Environ. Pollut.* 111, 293–302
- Carrillo-Gonzalez R, Simunek J, Sauvé S and Adriano D 2006 Mechanisms and pathways of trace element mobility in soils. *Adv. Agron.* 91, 113–180
- Cattani I, Fragoulis G, Boccelli R and Capri E 2006 Copper bioavailability in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) grown in two Italian soils. *Chemosphere* 64, 1972–1979
- Chaignon V and Hinsinger P 2003 A biotest for evaluating copper bioavailability to plants in a contaminated soil. *J. Environ. Qual.* 32, 824–833
- Chaignon V, Bedin F and Hinsinger P 2002a Copper bioavailability and rhizosphere pH changes as affected by nitrogen supply for tomato and oilseed rape cropped on an acidic and a calcareous soil. *Plant Soil* 243, 219–228
- Chaignon V, Di Malta D and Hinsinger P 2002b Fe-deficiency increases Cu acquisition by wheat cropped in a Cu-contaminated vineyard soil. *New Phytol.* 154, 121–130

- Chaignon V, Sanchez-Neira I, Herrmann P, Jaillard B and Hinsinger P 2003 Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. *Environ. Pollut.* 123, 229–238
- Cornu JY, Staunton S and Hinsinger P 2007 Copper concentration in plants and in the rhizosphere as influenced by the iron status of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Plant Soil* 292, 63–77
- Coullery P 1997 Gestion des sols faiblement pollués par des métaux lourds. *Revue Suisse d'Agriculture* 29, 299–305
- Courchesne F, Kruyts N and Legrand P 2006 Labile zinc concentration and free copper ion activity in the rhizosphere of forest soils. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 635–642
- Degryse F, Smolders E and Parker DR 2006 Metal complexes increase uptake of Zn and Cu by plants: implications for uptake and deficiency studies in chelator-buffered solutions. *Plant Soil* 289, 171–185
- Harmsen J, Rulkens W and Eijsackers H 2005 Bioavailability, concept for understanding or tool for predicting? *Land Contam. Reclam.* 13, 161–171
- Hinsinger P and Courchesne F 2007 Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids at soil-root interface. In *Biophysico-Chemical Processes of Heavy Metals and Metalloids in Soil Environments*. Eds. A Violante, PM Huang and GM Gadd. John Wiley and Sons (in press)
- Hinsinger P, Gobran GR, Gregory PJ and Wenzel WW 2005 Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytol.* 168, 293–303
- ISO 1999 Soil Quality. Guidance on the ecotoxicological characterisation of soils and soil materials. Guidelines no ISO TC 190/SC 7 ISO/DIS 15799. ISO, Geneva, Switzerland
- Kochian LV, Hoekenga OA and Pineros MA 2004 How do crop plants tolerate acid soils? - Mechanisms of aluminium tolerance and phosphorous efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 459–493
- Kopittke PM and Menzies NW 2006 Effect of Cu toxicity on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant Soil* 279, 287–296
- Lang HJ and Reed DW 1987 Comparison of HCl extraction versus total iron analysis for iron tissue analysis. *J. Plant Nutr.* 10, 795–804
- Lebourg A, Sterckeman T, Ciesielshi H and Proix N 1998 Trace metal speciation in three unbuffered salt solutions used to assess their bioavailability in soil. *J. Environ. Qual.* 27, 584–590
- Lexmond TM and Van der Vorm PDJ 1981 The effect of pH on copper toxicity to hydroponically grown maize. *Neth. J. Agr. Sci.* 29, 217–238
- Ma JF, Ryan PR and Delhaize E 2001 Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci.* 6, 273–278
- Marschner H 1995 *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2nd edn. London, UK, Academic Press. 889 pp
- McBride MB 1981 Forms and distribution of copper in solid and solution phase of soil. In *Copper in soils and plants*. Eds. Lorenagan JF, Robson AD and Graham RD. pp 25–45. Academic Press
- McBride MB 2001 Cupric ion activity in peat soil as a toxicity indicator for maize. *J. Environ. Qual.* 30, 78–84
- Mengel K and Kirkby EA 2001 *Principles of Plant Nutrition*, 5th edn. Kluwer Academic Publishers
- Nolan AL, Zhang H and McLaughlin MJ 2005 Prediction of zinc, cadmium, lead, and copper availability to wheat in contaminated soils using chemical speciation, diffuse gradients in thin films, extraction, and isotopic dilution techniques. *J. Environ. Qual.* 34, 496–507

- Pietrzak U and McPhail DC 2004 Copper accumulation, distribution and fractionation in vineyard soils of Victoria, Australia. *Geoderma* 122, 151–166
- Reichman SM and Parker DR 2005 Metal complexation by phytosiderophores in the rhizosphere. In *Biogeochemistry of trace elements in the rhizosphere*. Eds. Huang PM and Bobran GR. pp 129–156. Elsevier
- Reichman SM and Parker DR 2007 Probing the effects of light and temperature on diurnal rhythms of phytosiderophore release in wheat. *New Phytol.* 174, 101–108
- Rengel Z 1996 Tansley review no 89 - Uptake of aluminium by plant cells. *New Phytol.* 134, 389–406
- Rieuwerts JS, Thornton I, Farago ME and Ashmore MR 1998 Factors influencing metal bioavailability in soils, preliminary investigations for the development of a critical loads approach for metals. *Chem. Spec. Bioavailab.* 10, 61–75
- Römkens PFAM, Bouwman LA and Boon GT 1999 Effect of plant growth on copper solubility and speciation in soil solution samples. *Environ. Pollut.* 106, 315–321
- Sattelmacher B 2001 The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. Tansley review, 22. *New Phytol.* 149: 167–192
- Sauvé S, Cook N, Hendershot WH and McBride MB 1996 Linking plant tissue concentrations and soil copper pools in urban contaminated soils. *Environ. Pollut.* 94, 153–157
- Sauvé S, McBride MB, Norvell WA and Hendershot WH 1997 Copper solubility and speciation of in situ contaminated soils, Effects of copper level, pH and organic matter. *Water Air Soil Poll.* 100, 133–149
- Thakali S, Allen HE, di Toro D, Ponizovsky AA, Rooney CP, Zhao FJ and McGrath SP 2006a A Terrestrial Biotic Ligand Model. 1. Development and application to Cu and Ni toxicities to barley root elongation in soils. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7085–7093
- Thakali S, Allan HE, di Toro DM, Ponizovsky AA, Rooney CP, Zhao FJ, McGrath SP, Criel P, van Eeckhout H, Janssen CR, Oorts K, Smolders E 2006b Terrestrial Biotic Ligand Model. 2. Application to Ni and Cu toxicities to plants, invertebrates, and microbes in soil. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7094–7100
- Treeby M, Marschner H and Römheld V 1989 Mobilization of iron and other micronutrient cations from a calcareous soil by plant-borne, microbial, and synthetic metal chelators. *Plant Soil* 114, 217–226
- Vulkan R, Zhao FJ, Barbosa-Jefferson V, Preston S, Paton GI and McGrath SP 2000 Copper speciation and impacts on bacterial biosensors in the pore water of copper-contaminated soils. *Environ. Sci. Technol.* 34, 5115–5121
- Wheeler DM and Power IL 1995 Comparison of plant uptake and plant toxicity of various ions in wheat. *Plant Soil* 172, 167–173
- Zhao FJ, Rooney CP, Zhang H and McGrath SP 2006 Comparison of soil solution speciation and diffusive gradients in thin-films measurement as an indicator of copper bioavailability to plants. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 733–742

## **Differential response to induced Fe-deficiency among 20 genotypes of durum wheat, bread wheat and triticale cropped in Cu-contaminated, calcareous soils**

A M Michaud<sup>1</sup>, C Chappellaz<sup>1</sup>, G Souche<sup>1</sup>, P Grilheres<sup>2</sup>, P Braun<sup>2</sup> and P Hinsinger<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRA – SupAgro, UMR 1222 Biogéochimie du Sol et de la Rhizosphère, Place Viala, 34060 Montpellier cedex 1, France

<sup>2</sup> ARVALIS, L'Institut du Végétal, 30000 Nîmes, France

Corresponding author:

Philippe Hinsinger

Tel: +33 4 99 61 22 49

Fax: +33 4 99 61 30 88

Email: [philippe.hinsinger@supagro.inra.fr](mailto:philippe.hinsinger@supagro.inra.fr)

## **Abstract**

This work assessed *in situ* the response to induced Fe-deficiency of a range of 20 genotypes of durum wheat, bread wheat and triticale when cropped in Cu-contaminated, calcareous soils. For this purpose, a field experiment was carried out in two former vineyard, calcareous plots in which Cu phytotoxicity had been previously observed in durum wheat. Durum wheat occurred to be more sensitive according to the extent of Fe-deficiency symptoms (i.e. interveinal chlorosis and low chlorophyll content) when cropped in Cu-contaminated, calcareous soils. It also exhibited a greater genotypic variation compared to bread wheat and triticale. Variation in sensitivity to Fe-deficiency was not related to alteration in shoot biomass or in Cu and Fe contents in plants. However, increasing shoot Cu content was related to a significant decrease in shoot and grain biomass for durum wheat, suggesting a putative implication of Cu phytotoxicity. Our results suggest that, compared with bread wheat and triticale, durum wheat was more sensitive to Fe-deficiency when cropped in soil Cu-contaminated, calcareous soils and to risks of Cu phytotoxicity which may have resulted in decreasing shoot and grain biomass.

## *Keywords*

cereals, copper, iron, iron deficiency, phytotoxicity, wheat



### II.2.1. Introduction

The repeated use of copper (Cu) salts on vines against the mildew of grape vine has been responsible for widespread Cu contamination of most vineyard soils in various countries (Flores-Velez et al. 1996; Brun et al. 2001; Chaignon et al. 2003; Pietrzak and McPhail 2004; Arias et al. 2005; Cattani et al. 2006; Michaud et al. 2007). In addition to its pesticide properties, Cu is also a micronutrient which is highly phytotoxic at larger concentrations (Chaney 1980; Sauvé 2006). Large accumulation of Cu in vineyard soils may thus cause phytotoxicity. Copper phytotoxicity has been reported occasionally for vines cropped in vineyard acidic soils (Delas 1963) and repeatedly for cereals cropped in former vineyard, calcareous soils in Switzerland and France (Coullery 1997; Michaud et al. 2007). Actually, Cu phytotoxicity in durum wheat cropped in former vineyard, calcareous soils is a well-known agronomical problem in the Languedoc-Roussillon region of Southern France (Braun 2006): it has also been reported in maize but not in other crops such as sunflower and rape grown in the same former vineyard, calcareous soils (Braun, personal communication). In this region, a major proportion of agricultural soils is calcareous and more than a third of the former vineyard surface area has been replaced by other crops, mainly durum wheat. Former studies showed that the bioavailability of micronutrients and other trace metals (particularly Cu) in calcareous soils was increased under iron (Fe) deficiency due to the putative implication of the increased secretion of phytosiderophores which occur as part of the specific Fe acquisition strategy evolved by Gramineae species (Treeby et al. 1989; Römheld and Awad 2000; Chaignon et al. 2002; Meda et al. 2007). In such circumstances, a strong competition between Cu and Fe for complexation by phytosiderophores may occur thereby leading to a lesser acquisition of Fe. This may lead to impaired Fe uptake and to increased risks of Fe deficiency in calcareous soils (Ma and Nomoto 1993; Reichman and Parker 2005). Actually, we have previously observed that Cu phytotoxicity was presumably related to induced Fe deficiency (i.e. interveinal chlorosis and reduced root Fe content) in field-grown durum wheat cropped in Cu-contaminated former vineyard, calcareous soils (Michaud et al. 2007).

Iron (Fe) and zinc (Zn) deficiencies are widespread agronomical problems that are particularly found in arid and semi arid regions such as Mediterranean regions due to the low availability of Fe and Zn in calcareous soils that are dominant in these regions (Lindsay 1979; Rengel and Römheld 2000a). Cereal species which are known to secrete phytosiderophores to acquire Fe and presumably Zn differ in their sensitivity to both Fe and Zn deficiencies (Marschner et al. 1986; Römheld and Marschner 1990; Cakmak et al. 1997). Triticale, barley, rye and bread wheat species have been shown to be more tolerant to Fe and Zn deficiencies, due to their higher acquisition efficiency, while maize and durum wheat seem to be more sensitive (Kawai et al. 1988; Römheld and Marschner 1990; Cakmak et al. 1997, 1998; Kalayci et al. 1999; Rengel and Römheld 2000a, b). In addition, marked differences in sensitivity to both Zn and Fe deficiencies exist among genotypes of a given species, as shown particularly in bread and durum wheat (Rengel and Römheld 2000a, b; Cakmak et al. 2001). The underlying mechanisms are still poorly understood. Some former studies showed that cereal species and genotypes which secreted larger amounts of phytosiderophores (rye, barley, bread wheat) were less sensitive to Fe and Zn deficiencies than those secreting lesser amounts of phytosiderophores such as durum wheat (Kawai et al. 1988; Römheld and Marschner 1990; Rengel and Römheld 2000a, b). However, it has been stressed that other mechanisms might be implied in their larger resistance to Fe and Zn deficiencies, such as greater root growth and root surface area (Cakmak et al. 1997, 1998; Erenoglu et al. 1999; Crowley et al. 2002). In addition, Gramineae secrete different types of phytosiderophores which may vary in their

capability to form stable complexes with Fe (Römheld and Marschner 1990; Von Wirén et al. 2000). This might be another reason for the observed differences in sensitivity to Fe deficiency among genotypes of Gramineae.

Our previous work had shown that Cu phytotoxicity in field-grown durum wheat may be related to induced Fe-deficiency, when grown in calcareous, former vineyard soils (Michaud et al. 2007). Our aim was thus to study whether cereal species and genotypes differ in sensitivity to Fe-deficiency when grown in such Cu-contaminated, calcareous soils. This work was conducted in a field experiment with 20 genotypes of durum wheat, bread wheat and triticale which were cropped in former vineyard, calcareous plots where Cu phytotoxicity had been previously observed in durum wheat.

## II.2.2. Materials and Methods

### Soils and plants

The field experiment was carried out between October 2006 and June 2007 at two sites called Bayssan and Vias which are located close to Béziers (Southern France, 60 km W of Montpellier). These two agricultural plots were chosen because they had formerly caused Cu phytotoxicity symptoms (i.e. interveinal chlorosis) in durum wheat (soils no 24 and 37 in Michaud et al. 2007). The two sites differed in soil physical and chemical properties: Bayssan soil had 114 mg kg<sup>-1</sup> total Cu, 49 mg kg<sup>-1</sup> EDTA-extractable Cu, 11 g kg<sup>-1</sup> total Fe, 5 mg kg<sup>-1</sup> EDTA-extractable Fe, pH<sub>water</sub> = 8.2, 279 g kg<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>, 8.2 g kg<sup>-1</sup> organic C, 133 g kg<sup>-1</sup> clay and 454 g kg<sup>-1</sup> sand; Vias soil had 146 mg kg<sup>-1</sup> Cu, 46 mg kg<sup>-1</sup> EDTA-extractable Cu, 15 g kg<sup>-1</sup> total Fe, 10 mg kg<sup>-1</sup> EDTA-extractable Fe, pH<sub>water</sub> = 8.4, 47 g kg<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>, 5.4 g kg<sup>-1</sup> organic C, 94 g kg<sup>-1</sup> clay and 730 g kg<sup>-1</sup> sand. The 20 commercial species and cultivars were chosen for their widespread use in Southern France: we compared 12 genotypes of durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.), 6 genotypes of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and 2 genotypes of triticale (*Triticum x Secale*).

### Field experimental design and plant sampling

The field experiment was conducted with 8 replicates (subplots) per cultivar which were randomised in a total area of 40 m per 18 m (Fig. 1). Each subplot was made of three rows, 1 m in length, with 20 cm spacing between rows, which were sown in October 2006. A visual marking method was employed for qualitative assessment of the overall physiological status of the cropped plants. This marking was conducted thrice, on March 1<sup>st</sup>, 21<sup>st</sup> and April 4<sup>th</sup> 2007 for each of the 8 replicates and for all genotypes. The marking was based on the severity of interveinal chlorosis symptoms and on the overall plant growth. It ranged from 0 (no germination) to 10 (no chlorosis symptoms and normal growth). In the present study the marking actually ranged from 6 to 10, as follows: 6 (severe chlorosis symptoms with putative deleterious effect on yield), 7 (marked chlorosis symptoms with putative effect on yield), 8 (noticeable chlorosis symptoms with putative minor effect on yield), 9 (slight chlorosis symptoms with no effect on yield) and 10 (no chlorosis symptoms and normal growth).

	1	8				18	3		17	6	13	4		12	5		2		7	11	14	9	20	10	15		16	19	4	2	14	3		16		6		10	5	
5	17	13	9	7		10	20	2	18	1	11	14	15				19	12	8	6	16	14	4				3			7	8	19		20		17	15	9	4	
2	14	3		16		6		10	5	7	8	19		20		17	15	9	4		1			11	12	13		18	5		1			11	12	13		18	14	
	4		15	19	12	11	14	16		9				20	18	10	13			3		5	1	2	7		6	17	8	3		4		15	19	12	11	14	16	
	1	8				18	3		17	12	13	4		12	5		2		7	11	14	9	20	10	15		16	19	6	9			20	18	10	13			3	
5	17	13	9	7		10	20	2	18	1	11		15				19	12	8	6	16	14	4				3				5	1	2	7		6	17	8		

**Figure 1** Distribution of genotypes in the field with 8 replicates (subplots of 1 m per 0.6 m) per cultivar in a total area of 40 m per 18 m. Empty spaces (rectangles) correspond to additional genotypes which were not sampled.

A total of six genotypes were selected for being representative of the variability in the marking obtained for each of the three species in order to conduct replicated sampling of plants in each of the three subplots: durum wheat genotypes no 1-3 which presented contrasted markings (from 6 to 9), bread wheat genotypes no 13-14 which presented contrasted markings (from 8 to 10) and triticale cultivar no 19 with an average marking of 9.3-9.7; for all other genotypes, only one subplot was sampled, which was representative of the eight subplots, hence no replicated measurements were made (Table 1). Plants were sampled twice during the growing season at the stage of 1 cm spike (end of tillering stage) between the end of March 2007 and the beginning of April 2007 and at maturity by mid June 2007. At the first sampling date, whole plants including roots were collected by sampling 20 x 20 x 20 cm topsoil around a wheat row which was representative of the subplot (according to the visual marking of the plants). Plants were separated manually from the soil clods. Roots and shoots of 5 plants were washed carefully with deionised water as described by Michaud et al. (2007). Shoots were oven dried at 105°C and roots were frozen at -20°C. At the second sampling date which occurred at maturity, the whole rows of each subplot were harvested. Shoots with spikes were oven dried at 35°C and grains were harvested to measure 1000-grain weight.

### Plant analyses

The measurement of chlorophyll content in plant leaves was carried out with a non destructive chlorophyll-meter (Hydro N-tester, Hydro Agri France, Nanterre) for each subplot sampled at the first sampling date. Copper bound to root cell walls (root apoplasmic Cu) was determined as described by Michaud et al. (2007). Briefly, after thawing, a subsample of 0.8 g of roots (on a fresh matter basis) was shaken end-over-end with 40 cm<sup>3</sup> of 1 mM HCl for 3 min, then 360 mm<sup>3</sup> of 1 M HCl were added to yield a final concentration of 10 mM HCl. After shaking for another 3 min, the suspensions were filtered through ashless filter paper (Whatman 541) and roots recovered and oven dried at 105°C. After extraction of root apoplasmic Cu, Cu remaining in roots was considered to be symplasmic Cu. The remaining portion of untreated roots was also oven dried at 105°C. The oven dried roots and shoots were digested separately in a microwave oven with hot concentrated HNO<sub>3</sub>. Concentrations of Cu and Fe in the root and shoot digests were determined by Flame Atomic Absorption Spectrometry (Varian SpectrAA-600, Australia) and reference plant materials (BCR 62, olive (*Olea europaea* L.) leaves; BIPEA V463, maize (*Zea mays* L.) shoots) were used as standards. Root symplasmic Cu was determined by measuring Cu concentration in the root digests of roots recovered after the extraction of root apoplasmic Cu. Grains were counted and weighted in order to measure 1000-grain weight.

**Table 1** Marking, chlorophyll content and shoot dry biomass expressed as g (mean value  $\pm$  standard deviation of three replicates). For durum wheat and bread wheat separately at Bayssan and Vias separately, mean values of the three replicates with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) as measured by a HSD Tukey test.

genotype		marking				chlorophyll content	shoot dry biomass g	
		1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	3 <sup>rd</sup>	average			
Bayssan								
durum wheat	Orlu	1	6	6	7	6.3 $\pm$ 0.0 a	276 $\pm$ 74 a	4.9 $\pm$ 0.7 a
	Acalou	2	8	8	7	7.7 $\pm$ 0.3 b	643 $\pm$ 23 b	10.4 $\pm$ 1.0 b
	Janeiro	3	9	9	9	8.9 $\pm$ 0.2 c	591 $\pm$ 27 b	10.1 $\pm$ 2.2 b
	Biensur	4	7	8	8	7.7	537	5.9
	Dakter	5	8	10	8	8.7	612	6.1
	Joyau	6	9	9	9	9.0	556	4.3
	Karur	7	7	7	8	7.3	520	9.5
	Nefer	8	8	8	8	8.0	684	9.2
	Pescadou	9	9	8	7	8.0	553	9.8
	Provenzal	10	6	6	6	6.0	316	9.9
	Saragolla	11	8	9	8	8.3	561	24.2
	Sachem	12	9	8	9	8.7	678	10.7
		average	8	8	8	7.9	544	9.6
bread wheat	PR2258	13	8	8	8	8.0 $\pm$ 0.3 a	456 $\pm$ 55 a	7.3 $\pm$ 0.7 a
	Garcia	14	10	9	9	9.6 $\pm$ 0.2 b	597 $\pm$ 194 a	10.3 $\pm$ 2.2 a
	Hysun	15	9	9	8	8.7	546	17.8
	Apache	16	9	9	9	9.0	462	6.5
	Aubusson	17	8	9	9	8.7	688	11.8
	Cezanne	18	10	8	8	8.7	667	8.1
		average	9	9	9	8.8	569	10.3
triticale	Trimour	19	9	9	10	9.3 $\pm$ 0.0	609 $\pm$ 23	13.9 $\pm$ 1.1
	Bienvenu	20	10	8	10	9.3	639	11.6
		average	10	9	10	9.3	609	13.9
Vias								
durum wheat	Orlu	1	6	6	7	6.2 $\pm$ 0.5 a	307 $\pm$ 111 a	3.4 $\pm$ 1.5 a
	Acalou	2	8	8	8	7.8 $\pm$ 0.5 b	373 $\pm$ 27 a	3.9 $\pm$ 0.3 a
	Janeiro	3	9	9	9	9.1 $\pm$ 0.5 c	442 $\pm$ 53 a	4.8 $\pm$ 2.6 a
	Biensur	4	8	7	9	8.0	411	2.0
	Dakter	5	8	8	8	8.0	382	3.9
	Joyau	6	8	8	8	8.0	492	2.5
	Karur	7	7	7	8	7.3	432	3.9
	Nefer	8	8	8	8	8.0	346	6.7
	Pescadou	9	8	8	9	8.3	553	3.4
	Provenzal	10	7	6	7	6.7	315	4.1
	Saragolla	11	8	8	7	7.7	423	7.1
	Sachem	12	9	9	9	9.0	573	4.2
		average	8	8	8	7.8	421	4.2
bread wheat	PR2258	13	9	9	8	8.8 $\pm$ 0.7 a	342 $\pm$ 28 a	5.5 $\pm$ 2.8 a
	Garcia	14	10	9	9	9.3 $\pm$ 0.1 a	452 $\pm$ 54 b	4.0 $\pm$ 1.1 a
	Hysun	15	10	7	8	8.3	367	3.5
	Apache	16	9	8	9	8.7	415	2.4
	Aubusson	17	9	9	10	9.3	559	12.1
	Cezanne	18	10	10	10	10.0	523	9.5
		average	10	9	9	9.1	443	6.2
triticale	Trimour	19	10	9	10	9.7 $\pm$ 0.3	497 $\pm$ 24	4.5 $\pm$ 0.6
	Bienvenu	20	10	10	9	9.7	406	4.2
		average	10	10	9	9.7	452	4.3

## Statistical analyses

Linear regressions (Spearman R) for all species ( $n = 20$ ), durum wheat ( $n = 12$ ) and bread wheat genotypes ( $n = 6$ ) and analyses of variance (HSD Tukey test and Kruskal-Wallis analyses) with nonparametric tests were performed with Statistica® (Statsoft Inc., version 6, Tulsa, OK, USA).

### II.2.3. Results

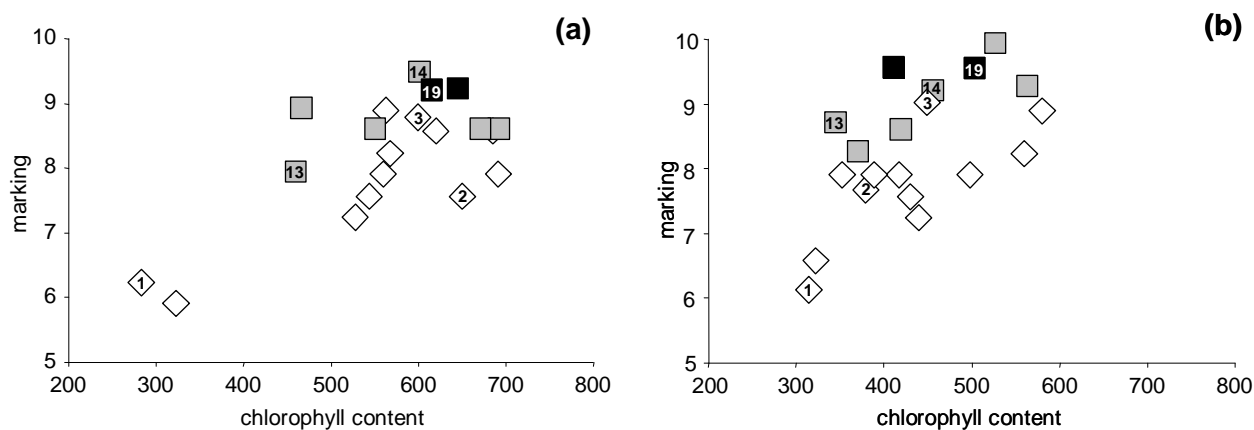
#### Plant growth

At both sites (Bayssan and Vias), interveinal chlorosis symptoms were observed in plants with markings ranging from 6 to 9, with severe symptoms for plants marked 6 and mild symptoms for plants marked 9. Globally, durum wheat genotypes presented more interveinal chlorosis symptoms and thus significantly lower markings at each marking dates compared to bread wheat and triticale genotypes (Tables 1 and 2 and Fig. 2). In addition, for both sites, durum wheat genotypes presented a broader range of markings (from 6 to 9), compared with bread wheat genotypes for which markings ranged from 8 to 10 and triticale genotypes for which markings were always 9 or 10. Markings were positively correlated to the chlorophyll content as measured by the chlorophyll-meter, particularly for durum wheat genotypes (Fig. 2). Genotypes of durum wheat and bread wheat exhibiting greater interveinal chlorosis symptoms and lower markings (no 1, 2 and 13) tended to have lower chlorophyll content (except no 2 at Bayssan), with the durum wheat cultivar no 1 having an average marking close to 6 in Bayssan (Fig. 2a) and Vias (Fig. 2b). In contrast, genotypes exhibiting lesser interveinal chlorosis symptoms and larger markings were no 3 for durum wheat, no 14 for bread wheat and no 19 for triticale.

Shoot dry biomass tended to be larger for triticale and bread wheat compared to durum wheat, particularly in Bayssan, but no significant difference was observed at  $P < 0.05$  (Tables 1 and 2). The durum wheat cultivar no 1 tended to have lower shoot dry biomass than genotypes no 2 and 3 which is in line with their differences in interveinal chlorosis symptoms and visual markings (Table 1). Shoot dry biomass was neither correlated to marking nor to chlorophyll content across all species and all durum wheat genotypes. As for chlorophyll content, shoot dry biomass was significantly lower in Vias compared to Bayssan across all species (Tables 1 and 2).

**Table 2** ANOVA probabilities calculated for difference between cereal species (species) independently for Bayssan and Vias (n = 20) and for both sites (n = 40) and, for difference between Bayssan and Vias sites (sites, n = 40) as measured by Kruskal-Wallis analyses. ns indicates non significant difference while \*, \*\*, \*\*\* indicate significant difference at the probability level of  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ , respectively.

		species			sites
		Bayssan	Vias	both sites	
marking	1 <sup>st</sup>	*	**	***	ns
	2 <sup>nd</sup>	ns	*	**	ns
	3 <sup>rd</sup>	*	ns	**	ns
	average	*	**	***	ns
chlorophyll content		ns	ns	ns	***
shoot dry biomass		ns	ns	ns	***
Cu content	shoots	ns	*	ns	ns
	roots (total)	ns	ns	ns	**
	roots (sytoplasmic)	ns	*	*	**
Fe content	shoots	ns	ns	ns	ns
	roots	ns	ns	ns	*
shoot amounts	Cu	ns	ns	ns	***
	Fe	ns	ns	ns	***
1 000-grain weight		ns	ns	ns	ns



**Figure 2** Marking as a function of chlorophyll content at Bayssan (a) and Vias (b) for durum wheat (open diamonds), bread wheat (grey squares) and triticale (black squares). Genotypes represented with no 1-3, 13-14 and 19 correspond to the average of the three replicates. Linear correlation coefficients are in (a)  $r = 0.40$ ,  $r = 0.60^*$  and  $r = 0.21$ , respectively for all species, durum wheat and bread wheat genotypes and in (b)  $r = 0.57^{**}$ ,  $r = 0.71^{**}$  and  $r = 0.77$ , respectively for all species, durum wheat and bread wheat genotypes. \* and \*\* indicate significant correlations at the probability level of  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

## Plant Cu and Fe contents

For all cereal species and genotypes, Cu content in shoots was far lower than Cu content in roots, particularly in Bayssan (Table 3). Root Cu content was significantly lower in plants cropped in Vias compared with plants cropped in Bayssan (Table 2). In Vias, significant differences among cereal species occurred for shoot Cu content which was globally lower for bread wheat compared to durum wheat and triticale, and for root symplasmic Cu content which was globally lower for durum wheat compared with bread wheat and triticale (Tables 2 and 3). In contrast, no significant difference in plant Cu contents among cereal species was observed in Bayssan. The durum wheat cultivar no 1, which exhibited among the greatest interveinal chlorosis symptoms and among the lowest markings, had the largest Cu content in shoots at both sites (above 20 mg kg<sup>-1</sup>) and in roots at Bayssan (384 mg kg<sup>-1</sup>), compared with genotypes which had lesser interveinal chlorosis symptoms and larger markings, such as genotypes no 2 and 3. Nevertheless, the other durum wheat cultivar no 10, which had also a marking close to 6 had lower shoot Cu content and larger shoot dry biomass than durum wheat cultivar no 1, particularly in Bayssan (Tables 1 and 3). Across all species and durum wheat genotypes, shoot Cu content was negatively correlated to shoot dry biomass at Bayssan (Fig. 3a) but not at Vias (Fig. 3b), although these two traits varied inversely at this site. Shoot Cu content was not correlated with marking at any of the two sites (Fig. 3c, d). Root Cu content was neither correlated with shoot dry biomass nor with marking.

As for Cu content, Fe content in shoots was far lower than Fe content in roots (Table 3). For all species, root Fe content was significantly larger in plants cropped at Vias than Bayssan (particularly for durum wheat plants) while shoot Fe content did not vary significantly between the two sites (Tables 2 and 3). In both sites, no significant difference between species was observed for plant Fe contents. Iron content in plant parts was neither correlated to shoot dry biomass nor to marking while it was positively correlated to shoot Cu content at Bayssan (Fig. 4a) and Vias (Fig. 4b) for all cereal species.

## Cu and Fe accumulated in shoots and 1000-grain weight

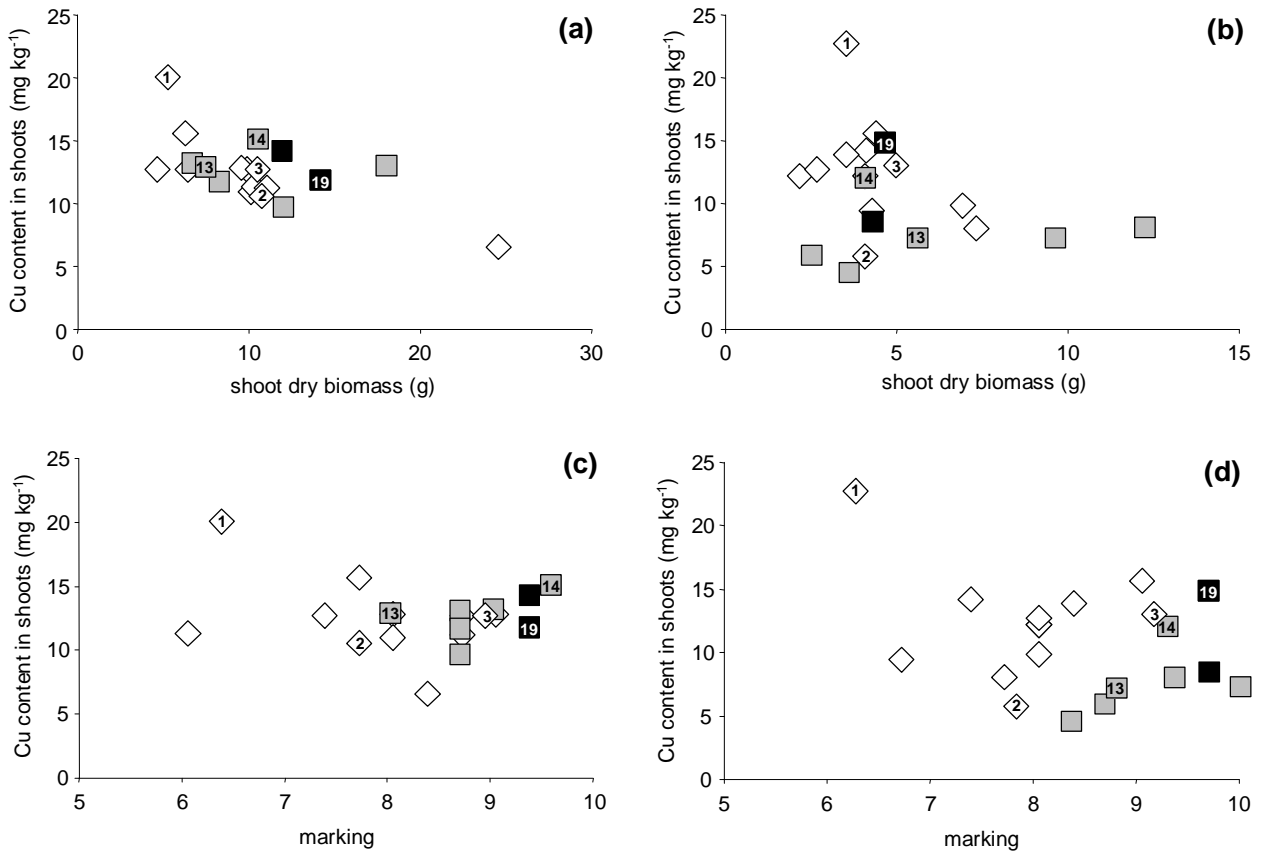
Amounts of Cu and Fe accumulated in shoots were significantly larger in plants cropped at Bayssan than Vias (Tables 2 and 4). They tended to be lower in durum wheat compared with bread wheat and more so with triticale at Bayssan, but no significant difference was observed between cereals species at  $P < 0.05$ . Amounts of Cu and Fe accumulated in shoots were positively correlated to shoot dry biomass both at Bayssan and Vias (Fig. 5) but they were not linearly correlated to marking. As for shoot Fe and Cu contents, amounts of Fe and Cu accumulated in shoots were positively correlated at Bayssan (Fig. 4c) and Vias (Fig. 4d).

The 1000-grain weight tended to be larger for triticale than durum wheat and bread wheat at Bayssan, but no significant difference between species was observed at  $P < 0.05$  (Tables 2 and 4). There was no significant difference between the two sites. At Bayssan, 1000-grain weight was positively correlated to shoot dry biomass across all species ( $r = 0.45$   $P < 0.05$ ) and negatively correlated with shoot Cu content for durum wheat ( $r = -0.71$   $P < 0.01$ ). At Vias, it was positively correlated with marking and chlorophyll content across all species ( $r = 0.56$  and  $r = 0.63$   $P < 0.01$ , respectively) and for durum wheat genotypes ( $r = 0.60$  and  $r = 0.68$   $P < 0.05$  respectively) but not with shoot dry biomass and shoot Cu content.

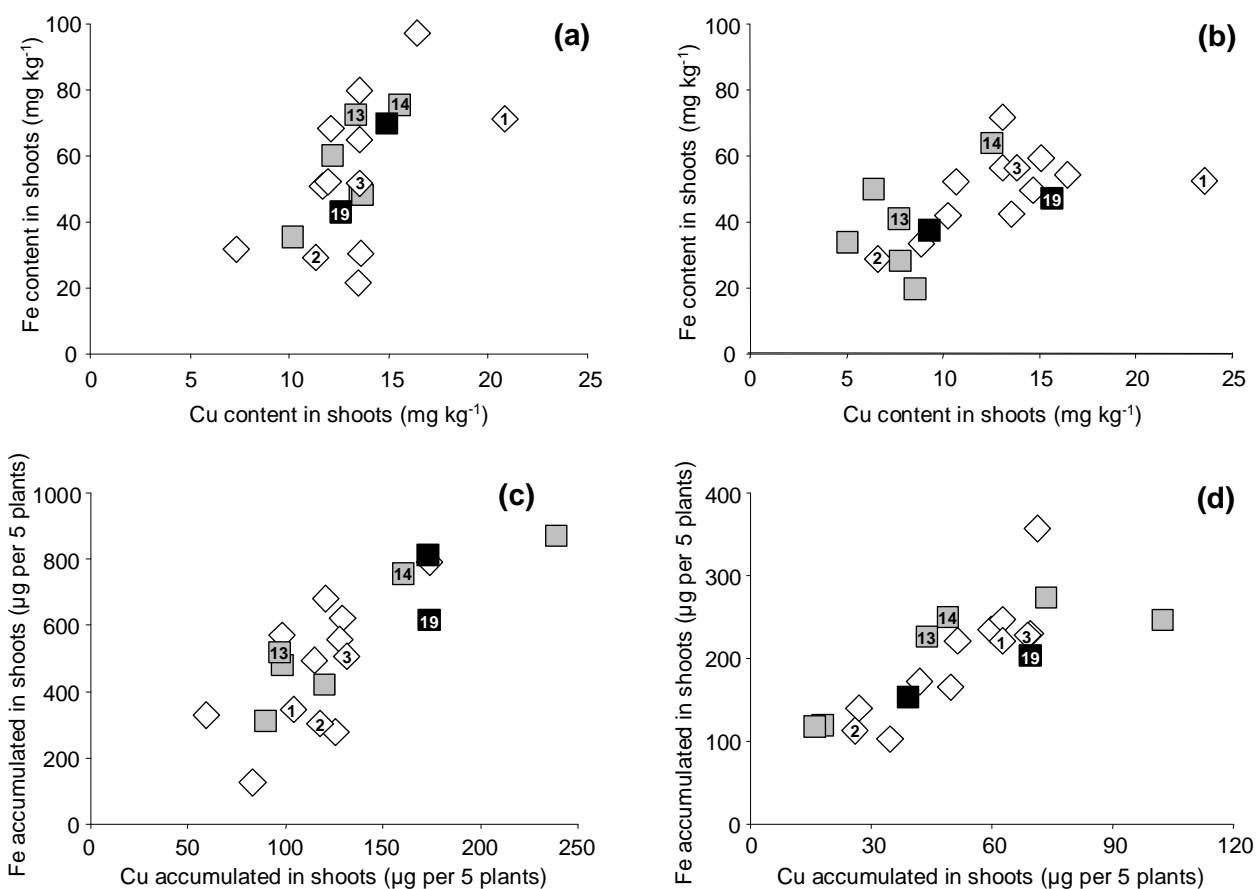
**Table 3** Cu content in shoots and roots (total and symplasmic) and Fe content in shoots and roots expressed as mg kg<sup>-1</sup> (mean value ± standard deviation of three replicates). For durum wheat and bread wheat separately at Bayssan and Vias separately, mean values of the three replicates with different letters are significantly different ( $P<0.05$ ) as measured by a HSD Tukey test.

site	species	genotype	Cu content mg kg <sup>-1</sup>			Fe content mg kg <sup>-1</sup>	
			shoots	roots (total)	roots (symplasmic)	shoots	roots
Bayssan	durum wheat	1	20.5 ±3.6 a	384 ±88 a	103 ±16 a	73 ±7 a	1814 ±321 a
		2	11.0 ±1.7 b	233 ±40 a	98 ±19 a	31 ±6 b	2497 ±411 a
		3	13.2 ±3.6 ab	218 ±64 a	63 ±20 a	54 ±14 ab	2570 ±320 a
		4	16.1	243	88	99	1890
		5	13.1	229	80	24	1169
		6	13.2	234	86	82	1671
		7	13.2	145	104	67	1431
		8	13.3	160	61	32	1905
		9	11.4	244	89	53	1857
		10	11.8	147	46	70	2014
		11	7.0	155	62	33	1351
		12	11.7	120	44	54	1483
	average	13.0	209	77	56	1804	
	bread wheat	13	13.2 ±2.5 a	252 ±50 a	96 ±23 a	74 ±19 a	2007 ±391 a
		14	15.4 ±0.7 a	299 ±48 a	109 ±7 a	77 ±15 a	2504 ±261 a
		15	13.3	267	90	49	1470
		16	13.5	250	91	49	2575
		17	10.0	222	82	37	1601
		18	12.0	257	80	61	1663
		average	12.9	220	91	58	1584
triticale	19	12.3 ±1.0	25 ±1 ±31	115 ±13	45 ±15	2171 ±351	
	20	14.7	252	98	72	2162	
	average	13.5	252	106	58	2166	
Vias	durum wheat	1	23.2 ± 17.6 a	172 ± 62 a	68 ± 24 a	54 ± 8 a	2529 ± 873 a
		2	6.3 ± 0.2 a	135 ± 15 a	79 ± 24 a	30 ± 2 a	3030 ± 270 a
		3	13.5 ± 3.3 a	153 ± 32 a	64 ± 10 a	58 ± 26 a	1828 ± 279 a
		4	12.7	201	74	73	1818
		5	12.7	196	51	58	2294
		6	13.2	129	52	44	2559
		7	14.7	155	59	61	1780
		8	10.3	120	59	54	2384
		9	14.3	178	57	51	4694
		10	9.9	132	69	44	2203
		11	8.5	179	50	36	1966
		12	16.1	179	50	56	3192
	average	13.0	161	61	52	2523	
	bread wheat	13	7.5 ± 0.9 a	128 ± 26 a	79 ± 12 a	42 ± 15 a	3190 ± 3216 a
		14	12.3 ± 1.2 b	178 ± 3 b	68 ± 18 a	65 ± 11 a	2093 ± 1508 a
		15	4.8	209	59	35	1056
		16	6.2	111	76	51	1571
		17	8.4	153	91	21	1742
		18	7.6	144	88	29	1726
		average	7.8	154	77	40	1896
triticale	19	15.4 ±4.7	181 ± 20	74 ± 12	49 ± 22	1881 ± 187	
	20	9.0	223	88	39	2668	
	average	12.2	202	81	44	2274	





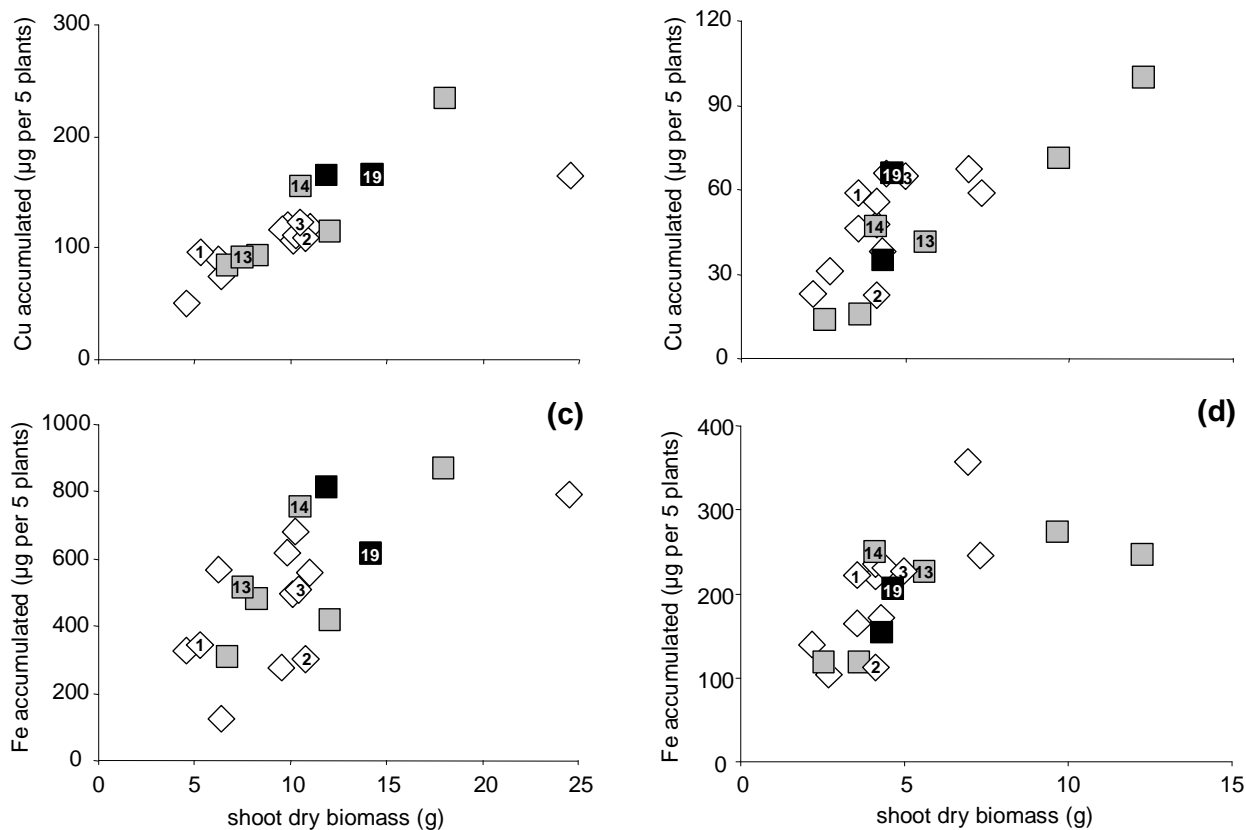
**Figure 3** Cu content expressed as  $\text{mg kg}^{-1}$  as a function of shoot dry biomass expressed as g (a, b) and marking (c, d) at Bayssan (a, c) and Vias (b, d) for durum wheat (open diamonds), bread wheat (grey squares) and triticale (black squares). Genotypes represented with no 1-3, 13-14 and 19 correspond to the average of the three replicates. Linear correlation coefficients are in (a)  $r = -0.46^*$ ,  $r = -0.83^{**}$  and  $r = -0.20$ , respectively for all species, durum wheat and bread wheat genotypes, in (b)  $r = -0.15$ ,  $r = -0.25$  and  $r = 0.60$ , respectively for all species, durum wheat and bread wheat genotypes, in (c)  $r = 0.16$ ,  $r = -0.16$  and  $r = 0.69$ , respectively for all species, durum wheat and bread wheat genotypes and, in (d)  $r = -0.15$ ,  $r = 0.19$  and  $r = 0.77$ , respectively for all species, durum wheat and bread wheat genotypes. \* and \*\* indicate significant correlations at the probability level of  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.



**Figure 4** Fe content as a function of Cu content in shoots expressed as  $\text{mg kg}^{-1}$  (a, b) and amounts of Fe accumulated in shoots as a function of amounts of Cu accumulated in shoots expressed as  $\mu\text{g per 5 plants}$  (c, d) at Bayssan (a, c) and Vias (b, d) for durum wheat (open diamonds), bread wheat (grey squares) and triticale (black squares). Genotypes represented with no 1-3, 13-14 and 19 correspond to the average of the three replicates. Linear correlation coefficients are in (a)  $r = 0.55^*$ ,  $r = 0.57$  and  $r = 0.49$ , respectively for all species, durum wheat and bread wheat genotypes, in (b)  $r = 0.65^{**}$ ,  $r = 0.52$  and  $r = 0.03$ , respectively for all species, durum wheat and bread wheat genotypes, in (c)  $r = 0.72^{**}$ ,  $r = 0.56$  and  $r = 0.77$ , respectively for all species, durum wheat and bread wheat genotypes and, in (d)  $r = 0.81^{**}$ ,  $r = 0.90^{**}$  and  $r = 0.83^*$ , respectively for all species, durum wheat and bread wheat genotypes. \* and \*\* indicate significant correlations at the probability level of  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

**Table 4** Amounts of Cu and Fe accumulated in shoots expressed as  $\mu\text{g}$  per 5 plants and 1000-grain weight expressed as g (mean value  $\pm$  standard deviation of three replicates). For durum wheat and bread wheat separately at Bayssan and Vias separately, mean values of the three replicates with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) as measured by a HSD Tukey test.

site	species	genotype	amounts in shoots		1000-grain weight g	
			$\mu\text{g}$ per 5 plants			
			Cu	Fe		
Bayssan	durum wheat	1	101 $\pm$ 20 a	363 $\pm$ 79 ab	36 $\pm$ 1.5 a	
		2	114 $\pm$ 15 a	322 $\pm$ 29 a	40 $\pm$ 1.5 a	
		3	128 $\pm$ 10 a	527 $\pm$ 77 b	29 $\pm$ 2.8 b	
		4	95	588	30	
		5	80	143	35	
		6	56	348	28	
		7	126	638	33	
		8	123	297	26	
		9	111	514	42	
		10	117	698	31	
		11	171	809	45	
		12	125	577	36	
		average	112	485	34	
		bread wheat	13	95 $\pm$ 12 a	528 $\pm$ 86 a	38 $\pm$ 0.9 a
			14	159 $\pm$ 38 b	766 $\pm$ 55 b	34 $\pm$ 2.5 a
			15	237	880	33
			16	88	321	30
			17	118	431	33
			18	97	492	34
			average	132	570	34
	triticale	19	171 $\pm$ 32	636 $\pm$ 244	44 $\pm$ 1.4	
		20	171	832	44	
		average	171	734	44	
Vias	durum wheat	1	61 $\pm$ 13 a	229 $\pm$ 49 a	33 $\pm$ 3.4 a	
		2	25 $\pm$ 2 a	120 $\pm$ 13 a	33 $\pm$ 2.2 a	
		3	67 $\pm$ 41 a	235 $\pm$ 65 a	40 $\pm$ 0.8 b	
		4	25	147	39	
		5	50	228	33	
		6	33	111	27	
		7	58	243	35	
		8	70	365	31	
		9	48	172	40	
		10	41	179	24	
		11	61	253	35	
		12	68	237	43	
		average	51	210	34	
		bread wheat	13	43 $\pm$ 27 a	231 $\pm$ 126 a	37 $\pm$ 0.5 a
			14	48 $\pm$ 10 a	255 $\pm$ 7 a	34 $\pm$ 1.0 b
			15	17	123	30
			16	15	123	28
			17	102	252	38
			18	73	279	42
			average	50	210	35
	triticale	19	68 $\pm$ 18	215 $\pm$ 62	38 $\pm$ 1.6	
		20	38	163	36	
		average	53	189	37	



**Figure 5** Amounts of Cu (a, b) and Fe (c, d) accumulated in shoots expressed as  $\mu\text{g}$  per 5 plants as a function of shoot dry biomass expressed as g at Bayssan (a, c) and Vias (b, d) for durum wheat (open diamonds), bread wheat (grey squares) and triticale (black squares). Genotypes represented with no 1-3, 13-14 and 19 correspond to the average of the three replicates. Linear correlation coefficients are in (a)  $r = 0.86^{**}$ ,  $r = 0.78^{**}$  and  $r = 0.94^{**}$ , respectively for all species, durum wheat and bread wheat genotypes, in (b)  $r = 0.76^{**}$ ,  $r = 0.76^{**}$  and  $r = 0.94^{**}$ , respectively for all species, durum wheat and bread wheat genotypes, in (c)  $r = 0.60^{**}$ ,  $r = 0.44$  and  $r = 0.60$ , respectively for all species, durum wheat and bread wheat genotypes and, in (d)  $r = 0.76^{**}$ ,  $r = 0.83^{**}$  and  $r = 0.71$ , respectively for all species, durum wheat and bread wheat genotypes. \* and \*\* indicate significant correlations at the probability level of  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

## II.2.4. Discussion

### Differential sensitivity to induced Fe-deficiency

Plants exhibiting severe interveinal chlorosis symptoms and thus the smallest markings had lower chlorophyll content than plants with larger markings and lesser or no symptoms (Table 1 and Fig. 2). Such interveinal chlorosis symptoms in cereal leaves were typical of lime-induced Fe deficiency (Mengel and Kirkby 2001). The chlorophyll content measured in the present study by a chlorophyll-meter is a semi-quantitative and non-destructive measurement used in field experiments to assess chlorophyll content in plant leaves which may be considered as an indicator of plant Fe status (Gratani 1992; Parvizi et al. 2004; Fernandez et al. 2006). Globally, durum wheat genotypes exhibited greater interveinal chlorosis symptoms and lower marking and chlorophyll content compared with bread wheat and triticale, but such difference was significant only for marking (Table 1 and Fig. 2). In addition, marking and chlorophyll rate were positively correlated across all species and durum wheat genotypes but not for bread wheat genotypes, indicating that decreasing marking was related to significant decrease in chlorophyll content, mostly for durum wheat genotypes. These results suggest that, compared with bread wheat and triticale, durum wheat was more prone to exhibit Fe-deficiency symptoms (i.e. interveinal chlorosis) as related to lower chlorophyll content when cropped in Cu-contaminated, calcareous soils. In addition, durum wheat genotypes exhibited larger variation in markings and chlorophyll content than bread wheat genotypes, indicating that durum wheat might display larger genotypic variation compared with bread wheat. In fact, the most severe Fe chlorosis symptoms were observed in durum wheat genotypes no 1 and 10 which had lower marking and chlorophyll content than the other genotypes of durum wheat (Table 1 and Fig. 2). Nevertheless, the number of bread wheat genotypes may not have been large enough to appropriately evaluate the genotypical differences in sensitivity to Fe-deficiency. Former studies showed that, compared with bread wheat and triticale, durum wheat was more sensitive to Fe and Zn deficiencies which are prone to occur in calcareous soils and that important genotypic variation in tolerance to Zn and Fe deficiencies occurred in bread and durum wheat (Cakmak et al. 1998, 2001; Kalayci et al. 1999; Rengel and Römheld 2000a, b). Our observations agreed with these findings.

Durum wheat which exhibited more Fe-deficiency symptoms in Cu-contaminated, calcareous soils did not have significantly lower shoot dry biomass and Fe content than bread wheat and triticale (Tables 1, 2 and 3). In addition, plant Cu and Fe content were not significantly different between species and were not related to variation in marking (i.e. indicator of interveinal chlorosis symptoms). No significant difference between species was observed in shoot dry biomass and amounts of Cu and Fe accumulated in shoots and no significant correlation was observed between marking or chlorophyll content and shoot dry biomass or amounts of Cu and Fe accumulated in shoots (Tables 2, 3, 4 and Fig. 3). This suggests that variation in sensitivity (particularly for durum wheat genotypes) to induced Fe-deficiency (i.e. extent of interveinal chlorosis symptoms) as shown by variation in marking and chlorophyll content was not related to altered shoot dry biomass and plant Cu and Fe status. It has been shown that differences in tolerance to Zn and Fe deficiency amongst cereal species and genotypes was not related to variation in plant Fe and Zn content but may result from larger plant uptake capacity of Zn and Fe (Cakmak et al. 1997, 1998, 2001; Kalayci et al. 1999; Rengel and Römheld 2000a; Imtiaz et al. 2006). However, Erenoglu et al. (1999) observed that bread wheat genotypes differing in Zn efficiency did not differ in their capacity to take up Zn when grown under Zn-deficient conditions. In addition, high sensitivity of durum wheat genotypes to both Zn and Fe deficiency has been ascribed to their low capacity to take up

adequate Zn and Fe under deficient supply conditions (Cakmak et al. 1998; Rengel and Römheld 2000a), possibly due to low synthesis and secretion of phytosiderophores (Cakmak et al. 1994, 1996; Rengel et al. 1998; Rengel and Römheld 2000b). Nevertheless, some studies suggested that larger secretion of phytosiderophores might not be the sole reason for larger inter- and intra-species tolerance to Zn deficiency for triticale, bread wheat and durum wheat (Erenoglu et al. 1996, 1999; Cakmak et al. 1997). Higher uptake capacity might thus also result from other physiological adaptations such as greater root growth, root surface area, differences in uptake kinetics and transport capacities of root cell membranes, modified translocation towards shoots, and efficient re-translocation within the plant (Cakmak et al. 1996, 1997; Rengel and Römheld 2000a; Crowley et al. 2002). Those studies underlined the difficulty to establish relationships between variation in tolerance to Fe and Zn deficiency, indicators of plant physiological status (contents and amounts taken up) and related physiological adaptations. This may explain the difficulty encountered in the present study to find relationships between the variation in sensitivity to induced Fe-deficiency and the physiological status of the plants (e.g. shoot biomass, Cu and Fe content), particularly for durum wheat genotypes.

### **Plant growth and Cu phytotoxicity**

Negative correlation was found between shoot dry biomass and Cu content for plants cropped in Bayssan, particularly for durum wheat, while an inverse relationship was observed in Vias (Fig. 3a and b). Significant decrease in shoot dry biomass with increasing shoot Cu content might result from putative Cu phytotoxicity and resulting reduced shoot growth and/or dilution of Cu content with increasing shoot biomass. We had previously observed that durum wheat plants cropped at these two sites (Bayssan and Vias) which were exhibiting interveinal chlorosis symptoms had greater root Cu content and lower root Fe content than plants which had been sampled at other locations within the same plots and did not exhibit interveinal chlorosis symptoms (Michaud et al. 2007). This suggested that interveinal chlorosis symptoms may have originated in Cu phytotoxicity, as related to Cu-Fe antagonism and induced Fe-deficiency. Actually, the largest plant Cu content and the lowest shoot dry biomass were observed in the durum wheat cultivar no 1 which also exhibited among the most pronounced Fe chlorosis symptoms and lowest markings and chlorophyll contents. Nevertheless, this was not observed for the durum wheat cultivar no 10 which also exhibited the most pronounced Fe chlorosis symptoms but had among the lowest plant Cu content and the largest shoot dry biomass. In addition, shoot Cu content of the durum wheat cultivar no 1 corresponded to critical levels of Cu phytotoxicity reported for wheat shoots of 15-20 mg kg<sup>-1</sup> (Davis and Beckett 1978; Taylor and Foy 1985). Root Cu content for this cultivar amounted to 384 mg kg<sup>-1</sup> in Bayssan, which is above the critical level of about 200 mg kg<sup>-1</sup> corresponding to the appearance of severe Fe chlorosis symptoms that we found for durum wheat cropped in Cu-contaminated soils (Michaud et al. 2007). Nevertheless, this was not observed for the durum wheat cultivar no 10. Moreover, durum wheat, bread wheat and triticale genotypes which had no symptoms showed quite often root Cu content close to 200 mg kg<sup>-1</sup>, especially at Bayssan. This suggests that (i) the decrease in shoot dry biomass and appearance of Fe chlorosis symptoms might be related to the elevated plant Cu content, thus presumably to Cu phytotoxicity, for the cultivar no 1 but not for the cultivar no 10 and (ii) critical values of Cu phytotoxicity are likely to vary according to genotypes and species. The present results also indicated that, as for Fe and Zn contents, plant Cu content may not be a suitable indicator of the plant physiological status, particularly shoot Cu content since former studies showed that root Cu content appeared as a more sensitive indicator of plant Cu

contamination than shoot Cu content presumably due to efficient control of Cu translocation from roots to shoots (Marschner 1995; Chaignon et al. 2003; Michaud et al. 2007).

Amounts of Cu and Fe accumulated in shoots were positively correlated to shoot dry biomass (Fig. 5), suggesting that decreasing shoot accumulation of Cu and Fe was related to decreasing shoot dry biomass which might result from various reasons including Cu phytotoxicity but also lower acquisition of micro- and macronutrients and any other source of variation of plant growth. At Bayssan, 1000-grain weight was positively correlated to shoot dry biomass for all species and negatively correlated to shoot Cu content for durum wheat genotypes. This suggests that larger shoot biomass might have resulted in larger grain biomass while increasing shoot Cu content might be related to significant decrease in grain biomass. Phytotoxic effect of Cu might thus have resulted in significant decrease in both shoot and grain biomass. However, in Vias 1000-grain weight was not correlated to shoot dry biomass and shoot Cu content while it was positively correlated to marking and chlorophyll content for all species and for durum wheat genotypes, suggesting that sensitivity to induced Fe-deficiency might be related to reduced grain biomass. The present results suggest that sensitivity to Cu phytotoxicity and/or to induced Fe-deficiency in calcareous soils might have resulted in reduced shoot dry biomass and/or grain yield particularly in durum wheat genotypes. Nevertheless, further field experiments are needed to study more precisely whether Cu phytotoxicity is really implied in reduced shoot and grain biomass and to induced Fe-deficiency for cereals cropped in Cu-contaminated, calcareous soils, particularly for durum wheat.

#### **Variation between the two study sites**

Poor correlations were found between marking and plant physiological status (shoot dry biomass and plant Cu and Fe) which might result from heterogeneity in soil physical and chemical properties in the two sites, particularly soil Cu content. Significant differences were observed between the two sites for chlorophyll content, shoot dry biomass, root Cu and Fe content and amounts of Cu and Fe accumulated in shoots (Table 2). This may originate in the many differences between the two sites, such as differences in microclimates, agricultural practices and soil properties. Actually, nitrogen fertilizers had been applied at Bayssan which may contribute to a portion of the observed larger plant chlorophyll content and shoot dry biomass compared with plants cropped at Vias. In addition, crop health was poorer at Vias, due to attacks of nematodes and phytopathogen fungi, which might also explain the lower shoot dry biomass observed compared with Bayssan. Root Cu content was significantly larger in plants cropped at Bayssan compared with Vias, while the opposite was observed for root Fe content (Tables 2 and 3). Actually, the contents of total and available Fe in soil were larger at Vias than Bayssan. This may explain the larger root Fe content found for plants cropped at Vias compared with Bayssan. Total soil Cu content was larger at Vias ( $146 \text{ mg kg}^{-1}$ ) than Bayssan ( $114 \text{ mg kg}^{-1}$ ), while soil EDTA-extractable Cu fraction was similar at Vias ( $46 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and Bayssan ( $49 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Nevertheless, root Cu content was significantly larger in plants cropped at Bayssan compared with Vias. It is known that Fe deficiency is prone to occur in calcareous soils due to decreased Fe availability at alkaline pH and large calcium carbonate content. In line with its lower level of EDTA-extractable Fe, the soil at Bayssan was much more calcareous ( $279$  and  $45 \text{ g kg}^{-1}$  total and active  $\text{CaCO}_3$ , respectively) than the soil at Vias ( $47$  and  $0 \text{ g kg}^{-1}$  total and active  $\text{CaCO}_3$ , respectively). Therefore, risks of Fe-deficiency were greater at Bayssan compared with Vias. Gramineous species are known to secrete larger amounts of ferric complexing compounds (i.e. phytosiderophores) in response to Fe-deficiency (Römheld 1987). In addition, former studies showed that the uptake and

bioavailability of trace elements (including Cu) increased under Fe-deficiency as a result of increased secretion of phytosiderophores (Treeby et al. 1989; Römheld and Awad 2000; Chaignon et al. 2002; Meda et al. 2007). As shown by Reichman and Parker (2005), Fe would be unable to compete with Cu for phytosiderophore complexation at neutral to alkaline pH, so that Fe uptake may be impaired by the inhibiting effect of Cu-phytosiderophore complexes in Cu-contaminated soils. Moreover, antagonism between root Cu and Fe contents has been observed in durum wheat cropped in Cu-contaminated, calcareous soils, suggesting that increasing Cu uptake may have impaired Fe uptake (Michaud et al. 2007). Larger root Cu content and lower root Fe content observed in plants cropped at Bayssan compared with plants cropped at Vias may result from larger Cu uptake at the expense of that of Fe due to (i) larger phytosiderophore secretion in response to lower Fe availability and larger calcium carbonate content (thus larger Fe deficiency), and (ii) to larger competition between Cu and Fe for phytosiderophore complexation as a result of larger soil Cu availability compared with that of Fe at Bayssan than Vias.

To conclude, the present study showed that durum wheat was more sensitive to induced Fe-deficiency (i.e. severe interveinal chlorosis symptoms as related to low chlorophyll content) when cropped in Cu-contaminated, calcareous soils, compared with bread wheat and triticale. Durum wheat also exhibited larger intra-genotypic difference than bread wheat. Variation in sensitivity to induced Fe-deficiency was not related to alteration in shoot biomass, Cu and Fe contents. Nevertheless, the present work showed that increasing shoot Cu content was related to significant decrease in shoot and grain biomass for durum wheat at one of the two study sites, suggesting a putative implication of Cu phytotoxicity. Further experiments at different sites are needed to (i) ascertain whether durum wheat is more sensitive than bread wheat and triticale to Fe-deficiency when cropped in Cu-contaminated, calcareous soils and to (ii) study if soil Cu contamination of calcareous soils and resulting Cu phytotoxicity may result in increased risks of Fe-deficiency: these should compare a larger number of genotypes cropped in more Cu-contaminated, calcareous soils.

### **II.2.5. Acknowledgments**

We thank the farmers for providing access to their fields for conducting this experiment. Financial support for this work was provided by the French ECCO-ECODYN programme.

### **II.2.6. References**

- Arias M, Lopez E and Soto B 2005 Copper distribution and fractionation in aggregate fractions from vineyard soils: Comparison with zinc. *Agrochimica* 49, 60–69
- Braun P 2006 Diagnostic des accidents du blé dur. ARVALIS - Institut du végétal, Paris
- Brun LA, Maillet J, Hinsinger P and Pépin M 2001 Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils. *Environmental Pollution* 111, 293–302
- Cakmak I, Ekiz H, Yilmaz A, Torun B, Köleli N, Gültekin I, Alkan A and Eker S 1997 Differential response of rye, triticale, bread and durum wheats to zinc deficiency in calcareous soils. *Plant and Soil* 188, 1–10
- Cakmak I, Torun B, Erenoglu B, Öztürk L, Marschner H, Kalayci M, Ekiz H and Yilmaz A 1998 Morphological and physiological differences in the response of cereals to zinc deficiency. *Euphytica* 100, 349–357



- Cakmak I, Sari N, Marschner H, Ekiz H, Kalayci M, Yilmaz A and Braun HJ 1996 Phytosiderophore release in bread and durum wheat genotypes differing in zinc efficiency. *Plant and Soil* 180, 183–189
- Cakmak O, Ozturk L, Karanlik S, Ozkan H, Kaya Z and Cakmak I 2001 Tolerance of 65 durum wheat genotypes to zinc deficiency in a calcareous soil. *Journal of Plant Nutrition* 24, 1831–1847
- Cakmak S, Gulut KY, Marschner H and Graham RD 1994 Effect of zinc and iron deficiency on phytosiderophore release in wheat genotypes differing in zinc efficiency. *Journal of Plant Nutrition* 17, 1–17
- Cattani I, Fragoulis G, Boccelli R and Capri E 2006 Copper bioavailability in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) grown in two Italian soils. *Chemosphere* 64, 1972–1979
- Chaignon V, Di Malta D and Hinsinger P 2002 Fe-deficiency increases Cu acquisition by wheat cropped in a Cu-contaminated vineyard soil. *New Phytologist* 154, 121–130
- Chaignon V, Sanchez-Neira I, Herrmann P, Jaillard B and Hinsinger P 2003 Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. *Environmental Pollution* 123, 229–238
- Chaney RL 1980 Health risks associated with toxic metals in municipal sludge. In: Bitton G, Damro DL, Davidson GT, Davidsson JM (Eds), *Sludge: Health risks of land application*. Ann Arbor Science, Ann Arbor, Michigan, pp. 59–83
- Coullery P 1997 Gestion des sols faiblement pollués par des métaux lourds. *Revue Suisse d'Agriculture* 29, 299–305
- Crowley DE, Wu CL, Gries D, Brünn S and Parker DR 2002 Quantitative traits associated with adaptation of three barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars to suboptimal iron supply. 10th International Symposium on iron nutrition and interactions in plants, Houston, Texas, USA, May 2000. *Plant and Soil* 241, 57–65
- Davis RD and Beckett PHT 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 Phytologist* 80, 23–32
- Delas J 1963 La toxicité du cuivre accumulé dans les sols. *Agrochimica* 7, 258–288
- Erenoglu B, Cakmak I, Romheld V, Derici R and Rengel Z 1999 Uptake of zinc by rye, bread wheat and durum wheat cultivars differing in zinc efficiency. *Plant and Soil* 209, 245–252
- Erenoglu B, Cakmak I, Marschner H, Romheld V, Eker S, Daghan H, Kalayci M and Ekiz H 1996 Phytosiderophore release does not relate well with zinc efficiency in different bread wheat genotypes. *Journal of Plant Nutrition* 19, 1569–1580
- Fernandez V, Del Rio V, Abadia J and Abadia A 2006 Foliar iron fertilization of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch): effects of iron compounds, surfactants and other adjuvants. *Plant and Soil* 289, 239–252
- FloresVelez LM, Ducaroir J, Jaunet AM and Robert M 1996 Study of the distribution of copper in an acid sandy vineyard soil by three different methods. *European Journal of Soil Science* 47, 523–532
- Gratani 1992 A non-destructive method to determine chlorophyll content of leaves. *Photosynthetica* 26, 469–473
- Imtiaz M, Alloway BJ, Khan P, Memon MY, Siddiqui SUH, Aslam M and Shah SKH 2006 Zinc deficiency in selected cultivars of wheat and barley as tested in solution culture. *Communications in soil science and plant analysis* 37, 1703–1721
- Kalayci M, Torun B, Eker S, Aydin M, Ozturk L and Cakmak I 1999 Grain yield, zinc efficiency and zinc concentration of wheat cultivars grown in a zinc-deficient calcareous soil in field and greenhouse. *Field Crops Research* 63, 87–98

- Kawai S, Takagi S and Sato Y 1988 Mugineic acid-family phytosiderophores in root-secretions of barley, corn and sorghum varieties. *Journal of Plant Nutrition* 11, 633–642
- Lindsay WL 1979 *Chemical equilibria in soils*. John Wiley and Sons, 449 pp.
- Ma JF and Nomoto K 1993 Inhibition of mugineic acid-ferric complex uptake in barley by copper, zinc and cobalt. *Physiologia Plantarum* 89:331–334
- Marschner H, Römheld V and Kissel M 1986 Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *Journal of Plant Nutrition* 9, 695–713
- Meda AR, Scheuermann EB, Prechsl UE, Erenoglu B, Schaaf G, Hayen H, Weber G and von Wirén N 2007 Iron acquisition by phytosiderophores contributes to cadmium tolerance. *Plant Physiology* 143, 1761–1773
- Mengel K and Kirkby EA 2001 *Principles of Plant Nutrition*, 5th edn. Kluwer Academic Publishers
- Michaud AM, Bravin MN, Galleguillos M and Hinsinger P 2007 Copper uptake and phytotoxicity as assessed in situ for durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cultivated in Cu-contaminated, former vineyard soils. *Plant and Soil* 298, 99–111
- Parvizi Y, Ronaghi A, Maftoun M and Karimian NA 2004 Growth, nutrient status, and chlorophyll meter readings in wheat as affected by nitrogen and manganese. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 35, 1387–1399
- Pietrzak U and McPhail DC 2004 Copper accumulation, distribution and fractionation in vineyard soils of Victoria, Australia. *Geoderma* 122, 151–166
- Reichman SM and Parker DR 2005 Metal complexation by phytosiderophores in the rhizosphere. In *Biogeochemistry of trace elements in the rhizosphere*. Eds. Huang PM and Gobran GR. Elsevier pp 129–156
- Rengel Z, Römheld V and Marschner H 1998 Uptake of zinc and iron by wheat genotypes differing in tolerance to zinc deficiency. *Physiologia Plantarum* 152, 433–438
- Rengel Z and Römheld V 2000a Root exudation and Fe uptake and transport in wheat genotypes differing in tolerance to Zn deficiency. *Plant and Soil* 222, 25–34
- Rengel Z and Römheld V 2000 b Differential tolerance to Fe and Zn deficiencies in wheat germplasm. *Euphytica* 113, 219–225
- Römheld V 1987 Different strategies for iron acquisition in higher plants. *Physiologia Plantarum* 70, 231–234
- Römheld V and Awad F 2000 Significance of root exudates in acquisition of heavy metals from a contaminated calcareous soil by graminaceous species. *Journal of Plant Nutrition* 23, 1857–1866
- Römheld V and Marschner H 1990 Genotypical differences among graminaceous species in release of phytosiderophores and uptake of iron phytosiderophores. *Plant and Soil* 123, 147–153
- Sauvé S 2006 Copper inhibition of soil organic matter decomposition in a seventy-year field exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 854–857
- Taylor GJ and Foy CD 1985 Differential uptake and toxicity of ionic and chelated copper in *Triticum aestivum*. *Canadian Journal of Botany* 63, 1271–1275
- Treeby M, Marschner H and Römheld V 1989 Mobilization of iron and other micronutrient cations from a calcareous soil by plant-borne, microbial, and synthetic metal chelators. *Plant and Soil* 114, 217–226.
- VonWirén N, Khodr H and Hider RC 2000 Hydroxylated phytosiderophore species possess an enhanced chelate stability and affinity for iron(III). *Plant Physiology* 124, 1149–1157

## Chapitre III : Caractérisation de la phytotoxicité de Cu chez le blé dur

---

### Introduction

Nous avons observé dans le chapitre précédent que des problèmes de phytotoxicité de Cu, visibles au travers de chloroses ferriques, étaient rencontrés notamment chez le blé dur cultivé en sols calcaires à antécédent viticole. Les plantes présentant ces symptômes avaient de plus fortes teneurs en Cu et de plus faibles teneurs en Fe dans les racines, suggérant que l'augmentation du prélèvement de Cu se produirait au détriment de celui de Fe, jusqu'à vraisemblablement induire une déficience en Fe et l'apparition de chloroses internervaires en sols calcaires contaminés en Cu. D'autre part, nous avons constaté que le blé dur cultivé en sols calcaires à antécédent viticole présentait une sensibilité supérieure à l'apparition de problèmes de déficience en Fe (chloroses ferriques), comparativement au blé tendre et au triticale.

Nous avons constaté *in situ* que la translocation de Cu vers les parties aériennes du blé dur était restreinte par l'accumulation de Cu dans les racines et que les teneurs en Cu dans les racines étaient de meilleurs indicateurs de la contamination en Cu que les teneurs en Cu des parties aériennes, confirmant ainsi des résultats observés sous conditions contrôlées chez d'autres espèces végétales (McBride 2001 ; Chaignon et al. 2003). La rhizotoxicité est connue pour être le principal effet de la phytotoxicité de Cu, se manifestant par une réduction de l'élongation racinaire. Cependant, la littérature ne fournit pas ou peu de données concernant les teneurs en Cu admissibles dans les racines (Chaignon 2001 ; Kopittke et Menzies 2006). D'autre part, il a été montré que la phytotoxicité de Cu induisait parfois une déficience en Fe et l'apparition de symptômes de chlorose ferrique. Toutefois, aucune étude n'a vraiment évalué chez les céréales l'impact de la phytotoxicité de Cu sur la nutrition en Fe avec la mise en place de réponses spécifiques à la déficience en Fe, comme l'augmentation de la libération par les racines de composés complexants, les phytosidérophores.

L'objectif de ce chapitre était de caractériser la phytotoxicité de Cu chez le blé dur en fonction de la disponibilité de Fe afin de (i) déterminer des valeurs seuils de phytotoxicité de Cu dans les racines en lien avec la diminution de l'élongation racinaire et (ii) de mettre en évidence l'impact de la phytotoxicité de Cu sur la nutrition en Fe (mise en place d'une déficience induite en Fe).

Pour cela, une expérimentation en hydroponie a été réalisée avec du blé dur exposé à différentes concentrations de Cu et cultivé à deux niveaux contrastés de Fe pour simuler la disponibilité de Fe rencontrée dans les sols calcaires et non calcaires. Il s'agit d'un article à soumettre à la revue *Plant and Soil*, intitulé 'Copper phytotoxicity affects root elongation and iron nutrition in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.)'

**Copper phytotoxicity affects root elongation and iron nutrition in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.)**

Aurélia M Michaud, Carole Chappellaz and Philippe Hinsinger

INRA – SupAgro, UMR 1222 Biogéochimie du Sol et de la Rhizosphère, Place Viala, 34060 Montpellier cedex 1, France

Corresponding author:

Philippe Hinsinger

Tel: +33 4 99 61 22 49

Fax: +33 4 99 61 30 88

Email: philippe.hinsinger@supagro.inra.fr

Short running title: Cu phytotoxicity in *Triticum turgidum durum* L.

## Abstract

This work investigated how copper (Cu) phytotoxicity affected iron (Fe) nutrition and root elongation in hydroponically-grown durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) in order to establish the critical level of Cu concentration in roots above which significant Cu phytotoxicity occurs. This was assessed at two levels of Fe supply (2 and 100  $\mu\text{M}$ ). Severe symptoms of Cu phytotoxicity were observed at  $\text{Cu}^{2+}$  concentration above 1  $\mu\text{M}$ , i.e. interveinal chlorosis symptoms and global root growth alteration. Root Cu concentration of about 100, 150 and 250-300  $\text{mg kg}^{-1}$  corresponded to 10, 25% and 50% reduction in root elongation, respectively. Copper and Fe concentrations as well as amounts of Cu and Fe accumulated in shoots varied inversely which suggested an antagonism between Cu and Fe leading to Fe deficiency. In addition, the root-induced release of complexing compounds increased significantly with increasing Cu concentration in nutrient solution and was positively correlated with Cu uptake without significant difference between the two Fe treatments (high and low Fe supply). This work suggests that root Cu concentration might be a simple, sensitive indicator of Cu rhizotoxicity. It also indicated that Cu phytotoxicity which may have resulted in Fe deficiency and significant increase in root-induced release of complexing compounds (presumably phytosiderophores) was independent of the level of Fe supply provided that the threshold values of phytotoxicity were based on the free Cu-ion concentration.

### Keywords

copper, iron, phytosiderophore, phytotoxicity, root exudates, rhizotoxicity, *Triticum turgidum durum* L.

### III.1. Introduction

Copper (Cu) is a micronutrient which is highly phytotoxic above micromolar concentrations (Marschner 1995). When compared with other potentially toxic trace elements such as cadmium (Cd), nickel (Ni) and zinc (Zn), Cu is more phytotoxic and not so toxic to animals and human beings (Chaney 1980; Wheeler and Power 1995; Kinraide et al. 2004). Copper is also an efficient pesticide, so that Cu salts have been heavily used as fungicides against the mildew of grape vine. This resulted in diffuse Cu contamination of vineyard soils and raises the question of the ecotoxicological risks for plants cropped in such soils. Actually, Cu phytotoxicity has occasionally been reported *in situ* in vines cropped in acidic soils (Delas 1963) and in cereals cropped in former vineyard calcareous soils (Michaud et al. 2007). The prime and early effect of Cu toxicity in plants is rhizotoxicity (Marschner 1995; Sheldon and Menzies 2005; Kopittke and Menzies 2006). Copper translocation towards shoots is indeed efficiently restricted by the large accumulation of Cu in roots, so that important Cu rhizotoxicity and deleterious physiological effects (e.g. altered root growth and nutrient uptake) are expected to occur before shoot Cu concentration reaches abnormal values. To evaluate ecotoxicological risks that excess Cu can generate, simple and sensitive indicators of Cu phytotoxicity based on early and primarily Cu rhizotoxic effects need to be identified. Nevertheless, few references of such Cu phytotoxicity are available in the literature and most of these were established for shoots (e.g. critical Cu concentration), not for roots (Davis and Beckett 1978; MacNicol and Beckett 1985; Reuter and Robinson 1997; Kopittke and Menzies 2006).

Copper rhizotoxicity results in stunting, reduced branching, thickening and dark coloration of the roots and in global reduction of root elongation (Marschner 1995; Sheldon and Menzies 2005; Kopittke and Menzies 2006), i.e. in similar symptoms as the much more documented aluminium (Al) rhizotoxicity (e.g. Marschner 1995; Parker 1995; Kinraide et al. 2004). Damages to the root cell membranes and to root meristems have also been reported (Sheldon and Menzies 2005). Copper and Al accumulated in roots are largely immobilized onto root cell walls by adsorption (Marschner 1995; Chaignon et al. 2002; Kinraide and Yermiyahu 2007). As for  $Al^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  can then inhibit root elongation by reducing cell expansion due to increased rigidity of root cell walls (Blamey 2001). Moreover, Cu as well as Ni rhizotoxicity may increase with increasing pH due to their larger adsorption onto functional groups such as carboxylic groups (COOH), which are increasingly negatively charged (deprotonated) with increasing pH (Lexmond and Van der Vorm 1981; Weng et al. 2003; Thakali et al. 2006; Zhao et al. 2006; Rooney et al. 2007).

In addition to rhizotoxicity, Cu phytotoxicity is also known to induce oxidative stress and resulting damages to membranes (e.g. thylakoid membranes), inhibitory effect on photosynthetic activity (inhibition of oxygen evolution in the photosystem II), and sometimes Fe deficiency and Fe chlorosis symptoms (Lexmond and van der Vorm 1981; Taylor and Foy 1985; Marschner 1995; Yruela et al. 1996; Quartacci et al. 2000; McBride 2001). We have previously observed Cu phytotoxicity symptoms, as evidenced by interveinal chlorosis (induced Fe chlorosis), in field-grown durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cropped in Cu-contaminated (former vineyards), calcareous soils (Michaud et al. 2007). Plants exhibiting such symptoms had larger Cu concentrations and lower root Fe concentrations compared with plants which did not show such symptoms, suggesting that Cu phytotoxicity might have impaired Fe nutrition and induced some Fe deficiency in these soils. Similar problems were only reported in cereals such as durum wheat and maize (*Zea mays* L.), and not in other crops such as sunflower (*Helianthus annuus* L.) and rape (*Brassica napus* L.) grown in former

vineyard, calcareous soils in Southern France (Braun, personal communication). Actually, Gramineous species have a specific response to Fe deficiency which is prone to occur in calcareous soils due to low Fe availability: they secrete Fe complexing compounds called phytosiderophores (Marschner et al. 1989; Marschner 1995; Kraemer et al. 2006; Robin et al. 2008). Former studies showed that increasing Cu concentration in soil and nutrient solution resulted in reduced mobilization and uptake of Fe presumably due to (i) a competition between Cu and Fe for complexation by phytosiderophores and/or (ii) the inhibitory effect of Cu-phytosiderophore complexes on Fe uptake (Zhang et al. 1991; Ma and Nomoto 1993). In addition, based on model computations, Reichman and Parker (2005) reported that at neutral to alkaline pH values, Fe would be unable to outcompete with Cu for complexation by phytosiderophores, so that soil Cu contamination in calcareous soils may impair Fe uptake and enhance the risks of induced Fe deficiency.

The aim of the present study was thus to investigate how Cu phytotoxicity affected (i) Fe nutrition and (ii) root elongation in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.), in order to establish the critical level of Cu concentration in roots as a simple indicator of Cu phytotoxicity. As Cu phytotoxicity seems to be prone to occur in calcareous soils and to increase risks of Fe deficiency presumably due to the interaction with the specific Fe acquisition strategy of Gramineous species, we studied the effects of Cu phytotoxicity at two levels of Fe supply in nutrient solution to simulate Fe levels occurring in calcareous and non calcareous soils.

## III.2. Materials and methods

### Plant growth conditions

In a first stage, durum wheat (*Triticum turgidum durum* L., cv Acalou) plants were cultivated for three weeks in hydroponic conditions with complete nutrient solution while in a second stage, plants were exposed for 8 days to one of 14 nutrient solutions differing in Fe and Cu concentrations (2 Fe levels x 7 Cu concentrations which makes up 14 treatments). The two stages of the experiment were conducted in a growth chamber with the following day/night conditions: 16 h, 25°C, relative humidity 75% and a photon flux density of about 550  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (in the range 400-700 nm)/8h, 20°C, relative humidity 100% and darkness.

For the first stage, two seeds of durum wheat which were surface sterilised with 6%  $\text{H}_2\text{O}_2$  were sown on top of a grid (1.5 mm pore diameter) in pots (40 mm diameter) and germinated for one week with a nutrient solution containing 600  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  and 2  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ . The pots were then transferred for two weeks to 6-dm<sup>3</sup> buckets (10 pots per bucket) filled with continuously aerated nutrient solution of following composition: 2 mM  $\text{KNO}_3$ , 2 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100  $\mu\text{M}$   $\text{FeNaEDTA}$ , 2  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 0.05  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 1  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$ . All nutrient solutions had an initial pH of about 5.5 and were renewed every third day to avoid large pH changes and nutrient depletion. At the end of the first stage, three replicates were collected and analysed separately to provide reference plants for the second stage of the experiment.

For the second stage, couples of plants were transferred for 8 days on top of 1-dm<sup>3</sup> containers filled with continuously aerated solution of following composition: 2 mM  $\text{KNO}_3$ , 2 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 50  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 0.05  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , with either 2 or 100  $\mu\text{M}$   $\text{FeNaEDTA}$  and one of the  $\text{CuCl}_2$  concentrations

mentioned in Table 1 which ranged from 0.3 to 120  $\mu\text{M}$ . The  $\text{CuCl}_2$  concentrations were chosen to obtain equivalent  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations or identical total Cu concentrations in the two Fe treatments (2 and 100  $\mu\text{M}$ ), thereafter called low and high. Free Cu concentrations in nutrient solutions were estimated with the GEOCHEM-PC speciation code (Parker et al. 1995). All nutrient solutions had an initial pH of 5.5 and were renewed every second day to avoid large pH changes and nutrient depletion. At the end of the second stage, all the three replicates (each comprising two plants) were collected and analysed separately.

**Table 1** Concentration of Fe and Cu (total and  $\text{Cu}^{2+}$ ) expressed as  $\mu\text{M}$  and percentage of free  $\text{Cu}^{2+}$  species and Cu-EDTA complex in nutrient solutions at low Fe (2 $\mu\text{M}$ ) and high Fe (100 $\mu\text{M}$ ) supplies as estimated with the GEOCHEM-PC speciation code (Parker et al. 1995).

Fe $\mu\text{M}$	Cu $\mu\text{M}$	Cu <sup>2+</sup>		Cu-EDTA %
		$\mu\text{M}$	%	
2	0.3	0.074	25	73
2	1	0.30	31	66
2	2.5	1.1	44	51
2	5	3.0	61	33
2	7.5	5.1	69	24
2	10	7.4	74	18
2	30	25.1	85	7
100	1	0.006	0.6	99
100	5	0.035	0.7	99
100	10	0.083	0.8	99
100	20	0.25	1.2	99
100	40	1.1	2.8	97
100	80	5.1	6.5	93
100	120	24.5	20	78

### Collection and quantification of root exudates

At the end of the second stage of the experiment, before being harvested, intact plants were used to collect root exudates. Roots were rinsed for 1 min with deionised water and then transferred to 250  $\text{cm}^3$  containers filled with 30  $\text{cm}^3$  of aerated deionised water for 3 h. The procedure started 3 h after the onset of the light period in order to coincide with the peak of phytosiderophore secretion (Reichman and Parker 2007a). After a 3 h collection period, solutions of root exudates were immediately frozen at  $-20^\circ\text{C}$ . The plants were then harvested as described below.

The amount of complexing compounds in root exudates was qualitatively estimated by the indirect method of the Cu mobilizing assay as previously described by several authors for phytosiderophore quantification (Treeby et al. 1989; Chaignon et al. 2002; Reichman and Parker 2007b) which is based on the mobilisation of Cu from a Cu-loaded resin (Chelite-P, Serva, Heildeberg, Germany). The Cu-Chelite P complex was prepared by stirring 5 g of Chelite P in 500  $\text{cm}^3$  of 50 mM  $\text{CuSO}_4$  for 15 min. This suspension was filtered and washed with deionised water until the water was free of Cu. Then, the Cu-loaded resin was equilibrated with 500  $\text{cm}^3$  of 10 mM MES (2-(N-morpholino) ethane-sulfonic acid) buffer (pH 5) and used for Cu mobilization tests. A volume of 2  $\text{cm}^3$  of root exudates which were filtered at 0.45  $\mu\text{m}$  just after thawing was mixed with 2  $\text{cm}^3$  of Cu-loaded resin suspended in



MES buffer (pH 5) and 6 cm<sup>3</sup> of deionised water for 45 min, before being filtered through an ashless filter paper (Whatman 40). The concentration of Cu in the filtrates was measured by Flame Atomic Absorption Spectrometry (AAS Varian SpectrAA-600, Australia) and the estimated amount of complexing compounds in the root exudates was calculated as mobilized Cu equivalents per two plants per 3 h.

### **Plant analyses**

After collection of root exudates, roots and shoots were harvested and weighed. Shoots were oven dried at 105°C and roots were frozen at -20°C. Copper bound to root cell walls was extracted as described by Chaignon et al. (2002). Briefly, after thawing a subsample of 0.8 g of roots (on a fresh matter basis) was shaken end-over-end with 40 cm<sup>3</sup> of 1 mM HCl for 3 min, then 360 mm<sup>3</sup> of 1 M HCl were added to yield a final concentration of 10 mM HCl. After shaking for another 3 min, the suspensions were filtered through an ashless filter paper (Whatman 540) and roots were recovered and oven dried at 105°C. After extraction of root apoplasmic Cu, Cu remaining in roots was considered to be the root symplasmic Cu. The remaining portion of untreated roots was also oven dried at 105°C. The oven dried roots and shoots were digested separately in a microwave oven with hot concentrated HNO<sub>3</sub>. Concentrations of Cu and Fe in the root and shoot digests were determined by Flame Atomic Absorption Spectrometry and reference plant materials (BCR 62, olive (*Olea europaea* L.) leaves; BIPEA V463, maize (*Zea mays* L.) shoots) were used as standards. Root symplasmic Cu was determined by measuring Cu concentration in the root digests of roots recovered after extraction of root apoplasmic Cu.

The length and surface of the root system were estimated by scanning the root system and subsequent analysis with the WinRhizo® image analysis software package (Regent Instrument Inc. 2005). Root elongation was estimated by subtracting root length measured at the end of the first stage to the root length measured at the end of the second stage. Root elongation was used to evidence Cu rhizotoxicity. Effective concentrations of free Cu species were estimated by the Hill equation with RegTox®, which is an Excel<sup>TM</sup> macro for dose-response curve analysis, as provided by Vindimian (2001).

### **Statistical analyses**

Linear regressions with Spearman R test and analyses of variance with Kruskal-Wallis test were performed with Statistica® (Statsoft Inc., version 6, Tulsa, OK). ANOVA probabilities presented in tables were calculated (i) separately for each Fe treatment for Cu concentration effect (ANOVA Cu) and, (ii) for equivalent Cu<sup>2+</sup> concentrations (i.e. low Fe treatment: 0.074, 0.3, 1.1, 5.1, 25.1 μM Cu<sup>2+</sup>; high Fe treatment: 0.083, 0.25, 1.2, 5.1, 24.5 μM Cu<sup>2+</sup>) for Fe treatment effect (ANOVA Fe). The data presented in the figures and tables are displayed as average value ± standard deviation (indicated as bars in figures) calculated from the three replicates per treatment.

### III.3. Results

#### Copper speciation in nutrient solutions

Free Cu concentrations were ranging from 0.074 to 25.1  $\mu\text{M}$  in nutrient solutions containing 2  $\mu\text{M}$  FeNaEDTA (low Fe treatment) and from 0.006 to 24.5  $\mu\text{M}$  with 100  $\mu\text{M}$  FeNaEDTA (high Fe treatment)(Table 1). Five  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations were comparable across the two Fe treatments, while only three total Cu concentrations coincided. Copper predominantly occurred as Cu-EDTA complexes in nutrient solutions at high Fe supply at all Cu concentrations due to the large concentration of EDTA supplied with Fe. This is the reason why much larger total Cu concentrations were used compared with low Fe supply, in order to reach equivalent  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations. At low Fe supply, Cu predominantly occurred as Cu-EDTA complexes for the three lowest Cu concentrations (0.3-2.5  $\mu\text{M}$ ) while free Cu species predominantly occurred for the four highest Cu concentrations (5-30  $\mu\text{M}$ ).

#### Visual symptoms and plant growth

Interveinal chlorosis symptoms appeared in plants for both low Fe and high Fe treatments at  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations above 1  $\mu\text{M}$ , corresponding to 2.5  $\mu\text{M}$  Cu at low Fe supply and to 40  $\mu\text{M}$  Cu at high Fe supply (Table 2). Those symptoms were more pronounced for low Fe treatment than for high Fe treatment at  $\text{Cu}^{2+}$  concentration of about 1  $\mu\text{M}$ , while they were similar at  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations above 5.1  $\mu\text{M}$  in both Fe treatments. At  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations below 1  $\mu\text{M}$ , plants at high Fe supply did not exhibit interveinal chlorosis, while plants at low Fe supply exhibited a little interveinal fading. With increasing Cu concentration shoot dry biomass decreased from 1.40 to 1.14 g for low Fe treatment and from 1.45 to 1.26 g for high Fe treatment, but this effect was not significant at  $P < 0.05$ .

Roots were stunted, thickened and brown above 1  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ . The severity of these symptoms increased with increasing Cu concentration. In addition, root growth (dry biomass, root surface and length) decreased significantly ( $P < 0.01$ ) and considerably with increasing Cu concentration in nutrient solutions for both Fe treatments, particularly above 1  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  (Tables 2 and 3). The largest effect was found for the root length of the thicker roots ( $> 1.5$  mm) which was divided by up to 10-20 fold. Dry biomass, surface and length of the whole root system were positively correlated for both Fe treatments ( $P < 0.01$ ) and no significant difference was observed between the two Fe treatments.

#### Plant Cu and Fe concentration

Shoot, root and root symplasmic Cu concentrations increased significantly ( $P < 0.01$ ) with increasing Cu concentration in nutrient solution for both Fe treatments (Table 4). The shoot/root ratio of Cu concentration in plant parts decreased significantly with increasing Cu concentration, ranging from 0.11 to 0.03 (about 4-fold decrease) in low Fe treatment and from 0.28 to 0.04 (7-fold decrease) in high Fe treatment. At identical total Cu concentration (1, 5, and 10  $\mu\text{M}$ ), Cu concentration in both shoots and roots was far larger for low Fe treatment compared with high Fe treatment. At equivalent  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations, the Fe treatment did not induce significant difference, except a significant increase in shoot Cu concentration for high Fe treatment.

Shoot Fe concentration decreased during the second stage of the experiment relative to the first stage, particularly for low Fe treatment (Table 5) and at total Cu concentration above 20-40  $\mu\text{M}$  at high Fe supply. During the second stage of the experiment, root Fe concentration increased largely for high Fe treatment and rather decreased for low Fe treatment relative to the first stage plants. With increasing Cu concentration in nutrient solution, Fe concentration decreased significantly ( $P<0.05$ ) in shoots, while it did not in roots. It can be noted that root Fe concentration for the high Fe treatment was relatively large for hydroponically grown plants, which might be due to the precipitation of Fe phosphates on the root surface. The shoot/root ratio of Fe concentration in plant parts decreased with increasing Cu concentration but significantly only for low Fe treatment. The low Fe treatment resulted in significant decrease in shoot and root Fe concentrations ( $P<0.01$ ) and in a significant increase in the shoot/root ratio of Fe concentration ( $P<0.01$ ), compared with high Fe treatment.

Shoot Fe and Cu concentrations varied inversely, suggesting an antagonistic relationship (Figure 1a). In contrast, root Fe and Cu concentrations were positively correlated:  $r = 0.75$ ,  $P<0.01$  and  $r = 0.49$ ,  $P<0.05$ , for low Fe and high Fe treatments, respectively (Figure 1b).

**Table 2** Visual symptoms of Cu phytotoxicity and biomass in shoots and roots expressed as g (mean values  $\pm$  standard deviation of three replicates) and interveinal chlorosis or altered root morphology in low Fe (-Fe) and high Fe (+Fe) treatments as a function of Cu concentration in nutrient solution expressed as  $\mu\text{M}$ . ANOVA was performed separately for low Fe (-Fe) and high Fe (+Fe) treatments to test the Cu concentration effect (ANOVA Cu) and, for equivalent  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations to test the Fe treatment effect (ANOVA Fe): ns stands for no significant difference while \* and \*\* indicate significant difference at the probability level of  $P<0.05$  and  $P<0.01$ , respectively.

	Cu $\mu\text{M}$	$\text{Cu}^{2+}$ $\mu\text{M}$	interveinal chlorosis	dry biomass g		altered root morphology
				shoots	roots	
1 <sup>st</sup> stage			-	0.41 $\pm$ 0.07	0.14 $\pm$ 0.02	-
-Fe	0.3	0.074	+/-	1.40 $\pm$ 0.09	0.66 $\pm$ 0.01	-
	1	0.30	+/-	1.47 $\pm$ 0.22	0.60 $\pm$ 0.11	-
	2.5	1.1	++	1.40 $\pm$ 0.04	0.61 $\pm$ 0.09	+
	5	3.0	++	1.57 $\pm$ 0.14	0.40 $\pm$ 0.03	+
	7.5	5.1	+++	1.42 $\pm$ 0.25	0.36 $\pm$ 0.02	++
	10	7.4	+++	1.19 $\pm$ 0.05	0.25 $\pm$ 0.00	+++
	30	25.1	+++	1.14 $\pm$ 0.13	0.24 $\pm$ 0.03	+++
ANOVA Cu				ns	**	
+Fe	1	0.006	-	1.45 $\pm$ 0.11	0.66 $\pm$ 0.10	-
	5	0.036	-	1.45 $\pm$ 0.15	0.76 $\pm$ 0.11	-
	10	0.083	-	1.59 $\pm$ 0.22	0.92 $\pm$ 0.32	-
	20	0.25	-	1.58 $\pm$ 0.19	0.69 $\pm$ 0.10	-
	40	1.2	+	1.29 $\pm$ 0.18	0.53 $\pm$ 0.03	+
	80	5.1	+++	1.23 $\pm$ 0.21	0.35 $\pm$ 0.02	++
	120	24.5	+++	1.26 $\pm$ 0.18	0.25 $\pm$ 0.01	+++
ANOVA Cu				ns	**	
ANOVA Fe				ns	ns	

**Table 3** Root parameters (mean values  $\pm$  standard deviation of three replicates) as determined with WinRhizo in low Fe (-Fe) and high Fe (+Fe) treatments as a function of Cu concentration in nutrient solution expressed as  $\mu\text{M}$ : root surface expressed as  $\text{m}^2$  and root length of the whole root system expressed as m, while root length per class diameter is expressed as cm. ANOVA was performed separately for low Fe (-Fe) and high Fe (+Fe) treatments to test the Cu concentration effect (ANOVA Cu) and, for equivalent  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations to test the Fe treatment effect (ANOVA Fe): ns stands for no significant difference while \* and \*\* indicate significant difference at the probability level of  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

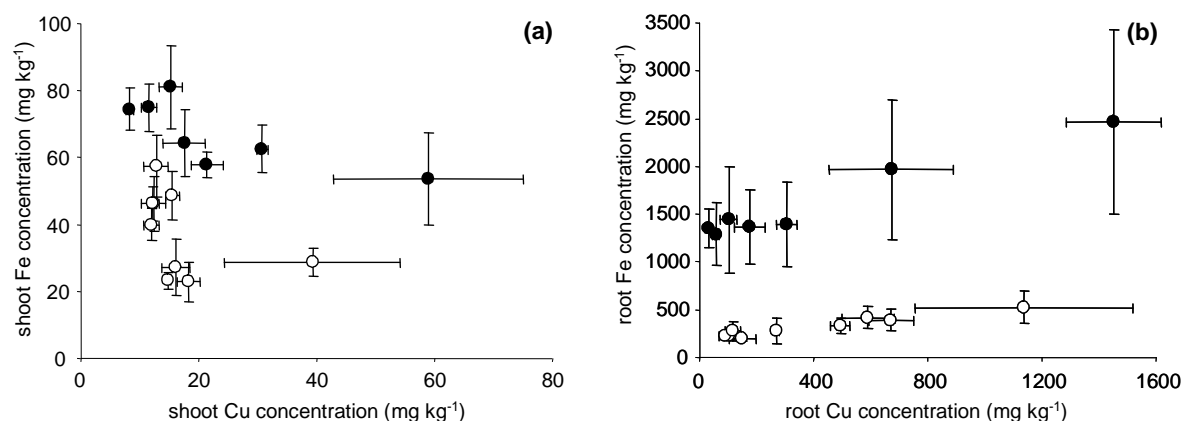
	Cu $\mu\text{M}$	$\text{Cu}^{2+}$ $\mu\text{M}$	root surface $\text{m}^2$	root length m	root length per root diameter (mm) class cm			
					0.0 - 0.5	0.5 - 1	1 - 1.5	> 1.5
1 <sup>st</sup> stage			0.02 $\pm$ 0.00	16 $\pm$ 2	1451 $\pm$ 226	166 $\pm$ 16	13 $\pm$ 6	0 $\pm$ 1
-Fe	0.3	0.074	0.07 $\pm$ 0.00	71 $\pm$ 7	6417 $\pm$ 760	588 $\pm$ 88	97 $\pm$ 21	11 $\pm$ 6
	1	0.30	0.06 $\pm$ 0.01	52 $\pm$ 10	4488 $\pm$ 822	616 $\pm$ 185	88 $\pm$ 20	10 $\pm$ 5
	2.5	1.1	0.06 $\pm$ 0.01	48 $\pm$ 7	4077 $\pm$ 502	631 $\pm$ 233	50 $\pm$ 14	3 $\pm$ 3
	5	3.0	0.03 $\pm$ 0.00	22 $\pm$ 4	1799 $\pm$ 394	350 $\pm$ 58	49 $\pm$ 17	1 $\pm$ 1
	7.5	5.1	0.03 $\pm$ 0.00	21 $\pm$ 4	1734 $\pm$ 387	321 $\pm$ 49	52 $\pm$ 14	2 $\pm$ 1
	10	7.4	0.02 $\pm$ 0.00	16 $\pm$ 1	1369 $\pm$ 117	201 $\pm$ 4	18 $\pm$ 6	0 $\pm$ 0
	30	25.1	0.02 $\pm$ 0.00	17 $\pm$ 3	1515 $\pm$ 300	198 $\pm$ 55	19 $\pm$ 10	1 $\pm$ 0
ANOVA Cu			**	**	**	**	**	*
+Fe	1	0.006	0.07 $\pm$ 0.01	73 $\pm$ 5	6441 $\pm$ 525	689 $\pm$ 54	100 $\pm$ 18	24 $\pm$ 7
	5	0.036	0.08 $\pm$ 0.01	84 $\pm$ 7	7560 $\pm$ 691	733 $\pm$ 150	70 $\pm$ 22	12 $\pm$ 6
	10	0.083	0.09 $\pm$ 0.01	90 $\pm$ 14	8098 $\pm$ 1462	711 $\pm$ 58	94 $\pm$ 45	34 $\pm$ 35
	20	0.25	0.07 $\pm$ 0.01	62 $\pm$ 12	5474 $\pm$ 1119	677 $\pm$ 97	63 $\pm$ 25	9 $\pm$ 7
	40	1.2	0.04 $\pm$ 0.00	35 $\pm$ 1	2935 $\pm$ 241	510 $\pm$ 126	55 $\pm$ 11	4 $\pm$ 2
	80	5.1	0.02 $\pm$ 0.00	21 $\pm$ 2	1707 $\pm$ 274	319 $\pm$ 51	30 $\pm$ 3	1 $\pm$ 2
	120	24.5	0.02 $\pm$ 0.00	22 $\pm$ 3	1903 $\pm$ 235	225 $\pm$ 48	21 $\pm$ 9	1 $\pm$ 1
ANOVA Cu			**	**	**	*	*	*
ANOVA Fe			ns	ns	ns	ns	ns	ns

**Table 4** Cu concentration in shoots and roots expressed as  $\text{mg kg}^{-1}$ , and shoot/root ratios in low Fe (-Fe) and high Fe (+Fe) treatments as a function of Cu concentration in nutrient solution expressed as  $\mu\text{M}$  (mean values  $\pm$  standard deviation of three replicates). ANOVA was performed separately for low Fe (-Fe) and high Fe (+Fe) treatments to test the Cu concentration effect (ANOVA Cu) and, for equivalent  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations to test the Fe treatment effect (ANOVA Fe): ns stands for no significant difference while \* and \*\* indicate significant difference at the probability level of  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

	Cu $\mu\text{M}$	$\text{Cu}^{2+}$ $\mu\text{M}$	Cu concentration $\text{mg kg}^{-1}$			shoot/root ratios
			shoots	roots (total)	roots (symplasmic )	
1 <sup>st</sup> stage			9 $\pm$ 1	61 $\pm$ 23	19 $\pm$ 6	0.17 $\pm$ 0.05
-Fe	0.3	0.074	12 $\pm$ 2	117 $\pm$ 28	30 $\pm$ 6	0.11 $\pm$ 0.01
	1	0.30	12 $\pm$ 1	150 $\pm$ 47	53 $\pm$ 14	0.08 $\pm$ 0.02
	2.5	1.1	16 $\pm$ 1	269 $\pm$ 8	133 $\pm$ 39	0.06 $\pm$ 0.01
	5	3.0	15 $\pm$ 0	494 $\pm$ 33	341 $\pm$ 67	0.03 $\pm$ 0.00
	7.5	5.1	16 $\pm$ 2	591 $\pm$ 92	326 $\pm$ 25	0.03 $\pm$ 0.00
	10	7.4	18 $\pm$ 2	672 $\pm$ 78	340 $\pm$ 39	0.03 $\pm$ 0.00
	30	25.1	39 $\pm$ 15	1138 $\pm$ 381	349 $\pm$ 36	0.03 $\pm$ 0.01
ANOVA Cu			**	**	**	*
+Fe	1	0.006	8 $\pm$ 1	30 $\pm$ 5	8 $\pm$ 1	0.28 $\pm$ 0.07
	5	0.036	11 $\pm$ 1	56 $\pm$ 10	14 $\pm$ 4	0.21 $\pm$ 0.02
	10	0.083	15 $\pm$ 2	101 $\pm$ 29	17 $\pm$ 2	0.16 $\pm$ 0.05
	20	0.25	18 $\pm$ 4	176 $\pm$ 54	41 $\pm$ 12	0.10 $\pm$ 0.02
	40	1.2	21 $\pm$ 3	304 $\pm$ 35	94 $\pm$ 17	0.07 $\pm$ 0.02
	80	5.1	31 $\pm$ 1	672 $\pm$ 219	177 $\pm$ 19	0.05 $\pm$ 0.01
	120	24.5	59 $\pm$ 16	1450 $\pm$ 166	598 $\pm$ 176	0.04 $\pm$ 0.01
ANOVA Cu			**	**	**	**
ANOVA Fe			*	ns	ns	ns

**Table 5** Fe concentration in shoots and roots expressed as  $\text{mg kg}^{-1}$ , and shoot/root ratios in low Fe (-Fe) and high Fe (+Fe) treatments as a function of Cu concentration in nutrient solution expressed as  $\mu\text{M}$  (mean values  $\pm$  standard deviation of three replicates). ANOVA was performed separately for low Fe (-Fe) and high Fe (+Fe) treatments to test the Cu concentration effect (ANOVA Cu) and, for equivalent  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations to test the Fe treatment effect (ANOVA Fe): ns stands for no significant difference while \* and \*\* indicate significant difference at the probability level of  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

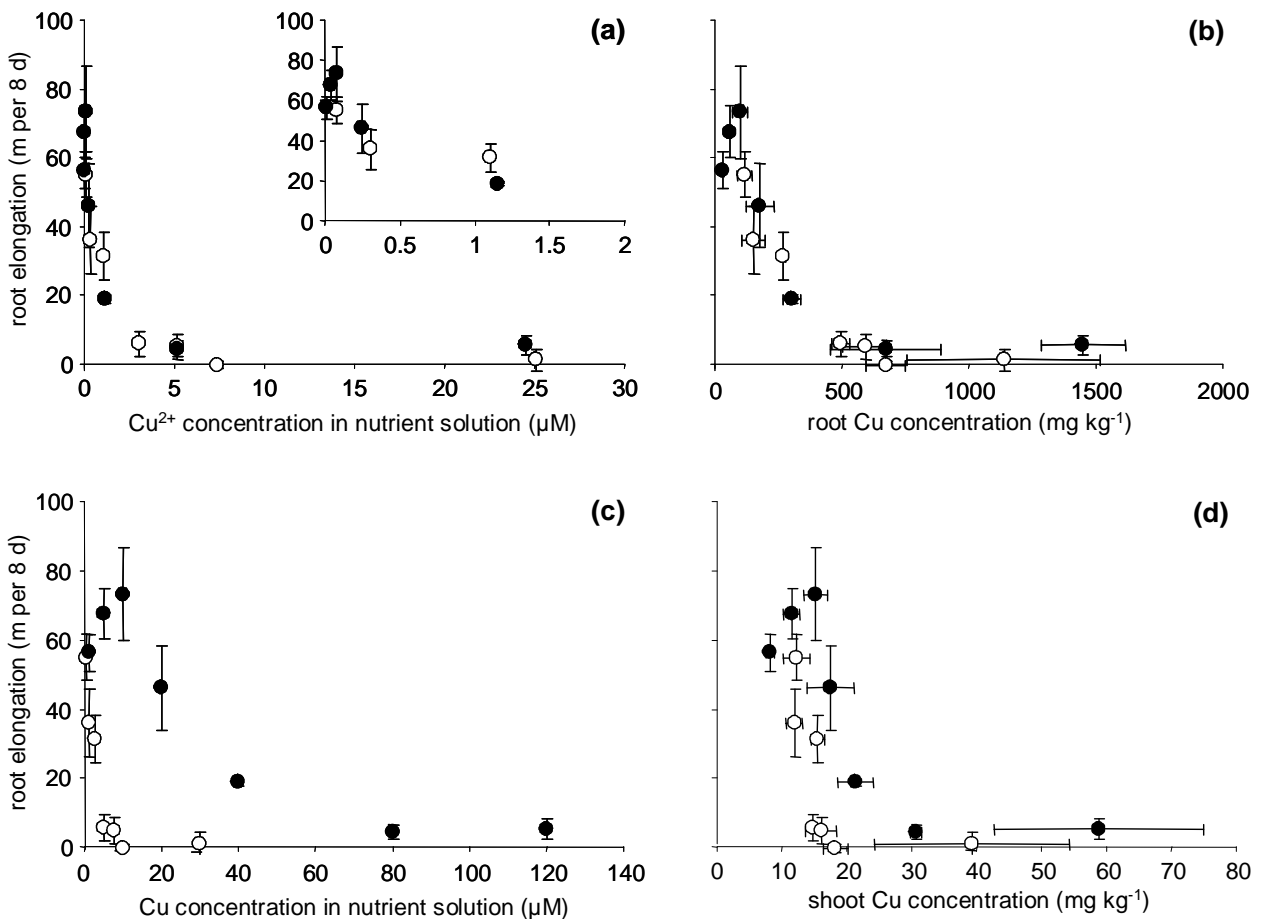
	Cu $\mu\text{M}$	$\text{Cu}^{2+}$ $\mu\text{M}$	Fe concentration $\text{mg kg}^{-1}$		shoot/root ratios
			shoots	roots	
1 <sup>st</sup> stage			78 $\pm$ 19	684 $\pm$ 231	0.12 $\pm$ 0.05
-Fe	0.3	0.074	46 $\pm$ 5	277 $\pm$ 98	0.18 $\pm$ 0.06
	1	0.30	40 $\pm$ 5	196 $\pm$ 19	0.21 $\pm$ 0.04
	2.5	1.1	49 $\pm$ 7	278 $\pm$ 131	0.21 $\pm$ 0.13
	5	3.0	23 $\pm$ 3	338 $\pm$ 77	0.07 $\pm$ 0.01
	7.5	5.1	27 $\pm$ 8	416 $\pm$ 115	0.07 $\pm$ 0.01
	10	7.4	23 $\pm$ 6	395 $\pm$ 108	0.06 $\pm$ 0.01
	30	25.1	29 $\pm$ 4	526 $\pm$ 165	0.06 $\pm$ 0.01
ANOVA Cu			*	ns	*
+Fe	1	0.006	74 $\pm$ 6	1358 $\pm$ 199	0.06 $\pm$ 0.01
	5	0.036	75 $\pm$ 7	1293 $\pm$ 328	0.06 $\pm$ 0.02
	10	0.083	81 $\pm$ 13	1447 $\pm$ 556	0.06 $\pm$ 0.03
	20	0.25	64 $\pm$ 10	1371 $\pm$ 389	0.05 $\pm$ 0.01
	40	1.2	58 $\pm$ 4	1393 $\pm$ 441	0.04 $\pm$ 0.02
	80	5.1	63 $\pm$ 7	1967 $\pm$ 731	0.03 $\pm$ 0.01
	120	24.5	54 $\pm$ 14	2461 $\pm$ 965	0.02 $\pm$ 0.01
ANOVA Cu			*	ns	ns
ANOVA Fe			**	**	**



**Figure 1** Fe concentration as a function of Cu concentration in shoots (a) and roots (b) expressed as  $\text{mg kg}^{-1}$ . Open circle stand for low Fe treatment and dark circles stand for high Fe treatment. The error bars are standard deviations

## Root elongation

Root elongation, i.e. the cumulated length increase of the whole root system over the 8 days of exposition, decreased significantly with increasing Cu concentration ( $P < 0.01$ ) from 55 to 1 m per 8 days for low Fe treatment and from 56-74 to 5 m per 8 days for high Fe treatment, without significant difference between the two Fe treatments (Fig. 2a). There was a significant difference however when expressed as a function of total Cu concentration in the nutrient solution (Fig. 2c). In addition, root elongation decreased with increasing root Cu concentration (Fig. 2b) and shoot Cu concentration (Fig. 2d). Root elongation was used for the diagnosis of Cu rhizotoxicity: effective concentrations of  $\text{Cu}^{2+}$  were calculated and corresponding root Cu concentration were determined from Figure 2 and Table 4 as a function of effective concentrations and related root elongation reduction (Table 6). As no significant difference in root elongation was observed between the two Fe treatments (Fig. 2a), effective concentrations of  $\text{Cu}^{2+}$  were estimated for the two Fe treatments together. Estimated  $\text{Cu}^{2+}$  concentration that inhibit root elongation by 10%, 25%, 50% and 90% amounted to 0.1, 0.2, 0.6 and 3.9  $\mu\text{M}$  respectively (Table 6). Root Cu concentration corresponding to 10%, 25%, 50% and 90% of root elongation inhibition amounted to approximately 100, 150, 250 and 500  $\text{mg kg}^{-1}$  respectively (Fig. 2b and Table 6).



**Figure 2** Root elongation expressed as m per 8 days as a function of  $\text{Cu}^{2+}$  (a) and Cu (c) concentrations in nutrient solution ( $\mu\text{M}$ ) and Cu concentration in roots (b) and shoots (d) ( $\text{mg kg}^{-1}$ ). Open circle stand for low Fe treatment and dark circles stand for high Fe treatment. The error bars are standard deviations.

**Table 6** Effective concentrations of Cu<sup>2+</sup> (expressed as μM) that inhibit root elongation by 10% to 90%. Approximately corresponding root Cu concentration expressed as mg kg<sup>-1</sup> was deduced from Figure 2 and Table 4 as a function of effective concentrations and corresponding root elongation reduction expressed as m per 8 days of growth.

Effective concentration	Cu <sup>2+</sup> μM	root Cu concentration mg kg <sup>-1</sup>	root elongation m per 8 days
EC 10	0.1	≈ 100	58
EC 25	0.2	≈ 150	49
EC 50	0.6	≈ 250	32
EC 75	1.5	≈ 350	16
EC 90	3.9	≈ 500	6

### Plant Cu and Fe uptake

The amounts of Cu and Fe accumulated during the second stage of the experiment were deduced from the amounts of plant Cu and Fe at the end of the second stage (biomass x concentration) by subtracting the initial amount of Cu and Fe in plants at the end of the first stage.

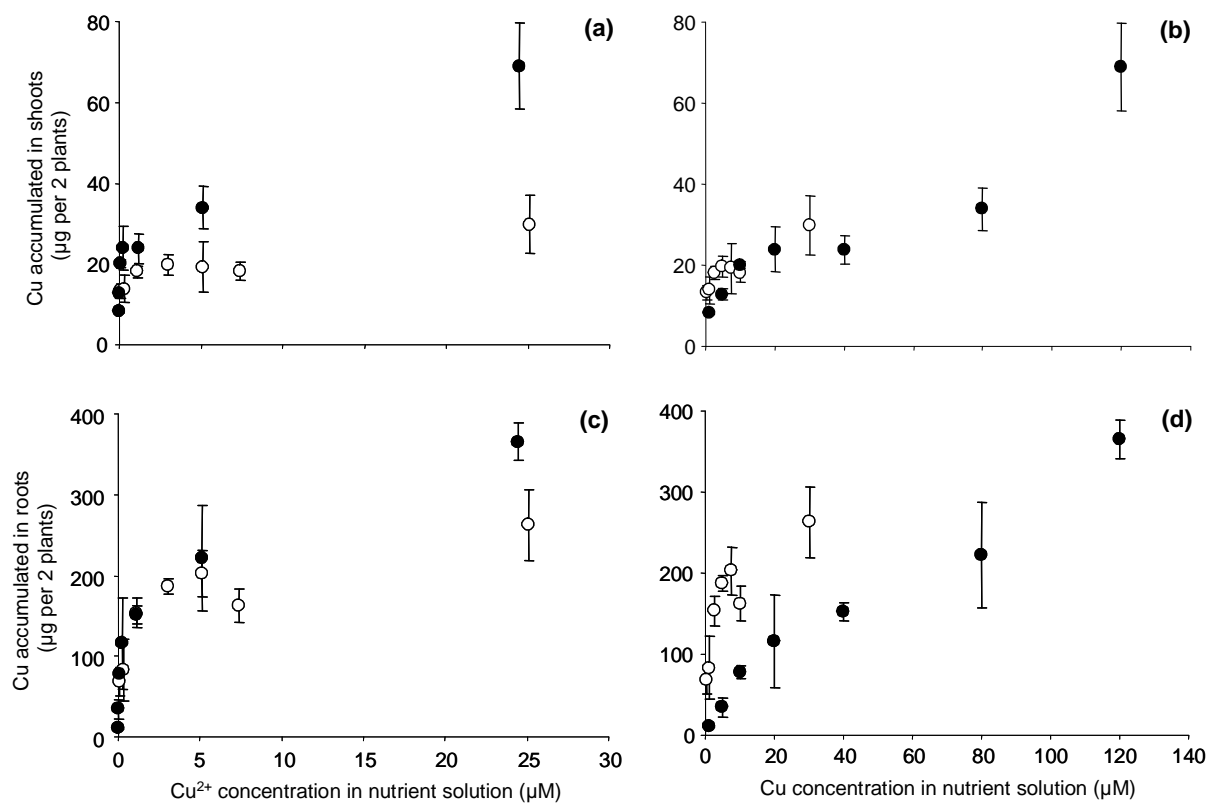
The amounts of Cu accumulated in shoots (Fig. 3a, b) and roots (Fig. 3c, d) increased significantly with increasing Cu concentration in nutrient solution more so in roots than shoots. Across all the equivalent Cu<sup>2+</sup> concentrations, amounts of Cu accumulated in shoots were significantly larger for high Fe treatment ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3a), while amounts of Cu accumulated in roots was not significantly different between the two Fe treatments (Fig. 3c). At equivalent total Cu concentration (1, 5 and 10 μM), amounts of Cu accumulated in both shoots (Fig. 3b) and roots (Fig. 3d) were larger at low Fe supply than at high Fe supply.

With increasing Cu concentration in nutrient solution, amounts of accumulated Fe decreased significantly in shoots ( $P < 0.01$ ) (Fig. 4a) but not in roots (Fig. 4b) for both Fe treatments. Low Fe treatment resulted in a significant decrease in the amounts of Fe accumulated in both shoots and roots ( $P < 0.01$ ). In addition, amounts of Cu and Fe accumulated in shoots were negatively correlated at low Fe supply ( $r = -0.51$ ,  $P < 0.05$ ) and high Fe supply ( $r = -0.60$ ,  $P < 0.01$ ). In contrast, amounts of Cu and Fe accumulated in roots were not correlated.

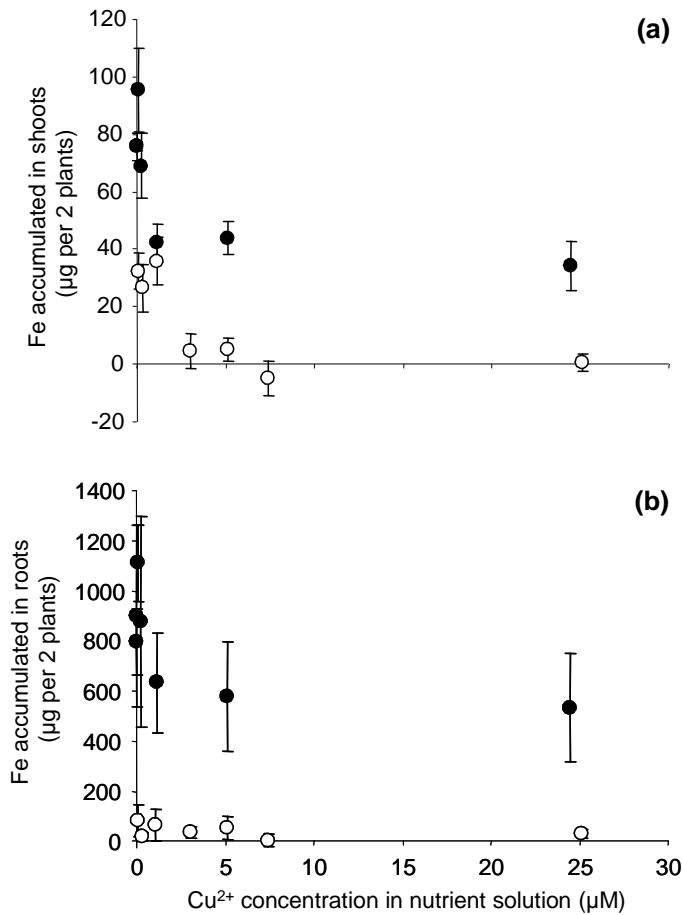
### Estimated root-induced release of complexing compounds

The estimated flux of complexing compound released by roots was computed by dividing amounts of Cu mobilized from the Cu-loaded resin expressed as μmol per 2 plants per 3 h by the root surface expressed as m<sup>2</sup>. It increased significantly with increasing Cu concentration in nutrient solution at low Fe supply ( $P < 0.05$ ) and globally for the two Fe treatments ( $P < 0.01$ ) but not at high Fe supply (Fig. 5a). The estimated release of complexing compounds did not vary significantly between the two Fe treatments. In addition, it was positively correlated to Cu uptake at low Fe supply ( $r = 0.82$ ,  $P < 0.01$ ) and for the two Fe treatments ( $r = 0.75$ ,  $P < 0.01$ ), but not at high Fe supply (Fig. 5b). Same results were obtained when the estimated amounts of complexing compounds released by roots expressed as μmol per 2 plants per 3 h were expressed relative to the root dry biomass, as usually expressed in the literature, instead of the root surface (data not shown).

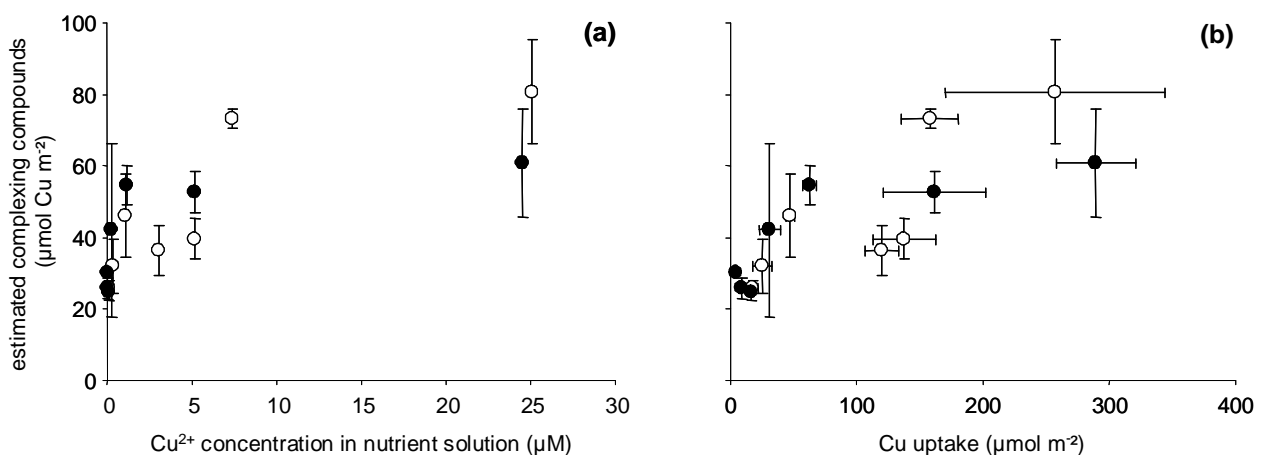




**Figure 3** Amounts of Cu accumulated in shoots (a, b) and roots (c, d) expressed as  $\mu\text{g}$  per 2 plants as a function of  $\text{Cu}^{2+}$  (a, c) and Cu (b, d) concentrations in nutrient solution ( $\mu\text{M}$ ). Open circle stand for low Fe treatment and dark circles stand for high Fe treatment. The error bars are standard deviations.



**Figure 4** Amounts of Fe accumulated in shoots (a) and roots (b) expressed as  $\mu\text{g}$  per 2 plants as a function of  $\text{Cu}^{2+}$  concentration in nutrient solution ( $\mu\text{M}$ ). Open circle stand for low Fe treatment and dark circles stand for high Fe treatment. The error bars are standard deviations.



**Figure 5** Estimated release of complexing compounds per root surface area expressed as  $\mu\text{mol Cu m}^{-2}$  as a function of  $\text{Cu}^{2+}$  concentration in nutrient solution ( $\mu\text{M}$ ) (a) and Cu taken up by whole plants ( $\mu\text{mol m}^{-2}$ ) (b). Open circle stand for low Fe treatment and dark circles stand for high Fe treatment. The error bars are standard deviations.

### III.4. Discussion

#### Plant Cu uptake

Copper concentration and amounts of Cu accumulated in roots varied over a broader range of values with increasing Cu concentration in nutrient solution and was always larger than in shoots (Table 4 and Fig. 3). In addition, the shoot/root ratio of Cu concentration decreased significantly with increasing Cu concentrations. These results agreed with numerous former studies showing that plants can efficiently restrict Cu translocation towards their shoots and that root Cu concentration was more responsive to soil Cu contamination than shoot Cu concentration (McBride 2001; Chaignon et al. 2002, 2003; Michaud et al. 2007). At identical total Cu concentrations in nutrient solutions (1, 5 and 10  $\mu\text{M}$  Cu), Cu concentration and amounts of Cu accumulated in plant parts were larger at low Fe supply, presumably due to larger  $\text{Cu}^{2+}$  concentration in nutrient solution (Table 4 and Fig. 3b, d). At equivalent  $\text{Cu}^{2+}$  concentration in nutrient solution, Cu concentration and amounts of Cu accumulated in shoots were globally significantly larger at high Fe supply (Table 4 and Fig. 3a). In contrast, overall the Fe treatment did not induce a significant difference of Cu concentration and amounts of Cu accumulated in roots even though Cu uptake tended to be larger for high Fe treatment at the largest Cu concentration (Table 4 and Fig. 3c). These results were rather unexpected, as Fe deficiency has been found to increase Cu uptake from Cu-contaminated, calcareous soils in bread wheat (*Triticum aestivum* L.), with concomitantly increased phytosiderophore secretion (Chaignon et al. 2002). Former studies showed that at equivalent free-ion activity, Cu uptake and phytotoxicity were larger in solutions strongly buffered by soluble Cu complexes than in weakly buffered solutions (Degryse et al. 2006). We did not find such a difference in toxicity when Cu was more buffered (by EDTA at high Fe supply). However, Cu concentration was indeed larger in roots and more so in shoots when Cu was more buffered (Table 4), in line with the former results of Degryse et al. (2006). In the present work, the concentration of EDTA at high Fe supply may have induced larger plant Cu uptake at the largest Cu concentrations presumably due to dissociation of Cu-EDTA complexes and release of  $\text{Cu}^{2+}$  in nutrient solution. This might have masked or compensated for the expected effect of the low Fe treatment on Cu uptake. Moreover, Schaidler et al. (2006) observed that metal-EDTA complexes were found in xylem sap of *Brassica juncea*, suggesting the possible uptake of intact complexes. Direct uptake of Cu-EDTA complexes might have contributed to the observed larger amounts of Cu accumulated in plants for high Fe treatment at the largest Cu concentrations, particularly in shoots.

#### Root elongation as affected by Cu phytotoxicity

The primary and early effect of Cu phytotoxicity is rhizotoxicity which results in global reduction of root elongation (Marschner 1995; Kopittke and Menzies 2006). Moreover, root Cu concentration has been found to be more responsive to Cu contamination than shoot Cu concentration (Taylor and Foy 1985; McBride 2001; Ali et al. 2002; Chaignon and Hinsinger 2003; Chaignon et al. 2003; Kopittke and Menzies 2006) even for field-grown cereals cropped (Michaud et al. 2007). This suggests that Cu phytotoxicity parameters established from shoots (e.g. biomass response, critical levels of Cu concentration) might be poor indicators of the actual Cu phytotoxicity, while those established from roots would be more sensitive.

Root dry biomass, surface and length decreased significantly with increasing Cu concentration in nutrient solution without significant difference between the two Fe treatments (Table 2 and

3). In contrast, shoot dry biomass did not decrease significantly with increasing Cu concentration, confirming that shoot growth was less affected by Cu phytotoxicity than root growth. At  $\text{Cu}^{2+}$  concentration above  $1 \mu\text{M}$ , symptoms of stunting, thickening and brown coloration of roots were observed. Similar symptoms of Cu rhizotoxicity had been previously reported (Ali et al. 2002; Sheldon and Menzies 2005; Kopittke and Menzies 2006). In addition, symptoms of interveinal chlorosis which are typical of induced Fe chlorosis (Marschner 1995) were observed at  $\text{Cu}^{2+}$  concentration above  $1 \mu\text{M}$ . Copper concentrations found in plants exhibiting severe Cu phytotoxic symptoms amounted to 16 and  $21 \text{ mg kg}^{-1}$  in shoots for low Fe and high Fe treatments, respectively, and, to 269 and  $304 \text{ mg kg}^{-1}$  in roots for low Fe and high Fe treatments, respectively (Tables 2 and 4).

As for global root growth (dry biomass, surface and length) root elongation decreased significantly with increasing Cu concentration (Fig. 2a, c). It also decreased with increasing Cu concentrations in plant parts, particularly in roots (Fig. 2b, d). Root Cu concentration corresponding to 10%, 25%, 50% and 90% reduction of root elongation amounted to about 100, 150, 250 and  $500 \text{ mg kg}^{-1}$  respectively (Table 6 and Fig. 2b). In contrast, shoot Cu concentration observed in plants exhibiting from 10% to 90% reduction of root elongation varied only from 10 to about  $15 \text{ mg kg}^{-1}$  for low Fe treatment and from 10 to about 20-30  $\text{mg kg}^{-1}$  for high Fe treatment (Table 4 and Fig. 2d). These findings showed that root Cu concentration variation was more sensitive to both early, moderate (i.e. 10-25% root elongation reduction) and severe (i.e. 50-90% root elongation reduction, chlorosis symptoms) Cu phytotoxicity than shoot Cu concentration variation for durum wheat. In addition, the present results indicate that root concentration of about  $100\text{-}150 \text{ mg kg}^{-1}$  is a critical level corresponding to early and moderate Cu phytotoxicity, i.e. 10-25% decrease in root elongation which may substantially depress plant growth in soil-grown plants. Root concentration of about  $250\text{-}300 \text{ mg kg}^{-1}$  is a critical level corresponding to severe symptoms of phytotoxicity, i.e. chlorosis symptoms and 50% decrease in root elongation. Compared with the present results former studies found similar shoot critical levels of about  $15\text{-}20 \text{ mg kg}^{-1}$  for bread wheat (Davis and Beckett 1978; Taylor and Foy 1985), durum wheat (Michaud et al. 2007) and maize (Borkert et al. 1998). However it shall be stressed that this threshold is difficult to use as it only slightly differs from normal concentrations. In contrast, root Cu critical levels found in previous works were fewer and largely variable as stressed by Kopittke and Menzies (2006), particularly for wheat. The Cu critical level in roots of about  $250\text{-}300 \text{ mg kg}^{-1}$  as found in the present work agreed with the root critical level of  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  found for field-grown durum wheat exhibiting interveinal chlorosis symptoms (Michaud et al. 2007). It also agreed with the value of  $300 \text{ mg kg}^{-1}$  found by Wheeler and Power (1995) for bread wheat for which more than 50% decrease in root and shoot yields occurred when supplied with  $0.5 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  and  $2.5 \mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$ . In contrast, it disagreed with the root Cu concentration of  $2300 \text{ mg kg}^{-1}$  reported by Taylor and Foy (1985) for bread wheat cropped in nutrient solution containing  $30 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  and  $17.9 \mu\text{M}$  FeHEDTA which corresponded to the appearance of Fe chlorosis symptoms, inhibition of lateral root initiation and large decrease in shoot (40%) and root (more than 50%) biomass. The variability in root critical levels found between these studies may result from variation in the experimental design employed (e.g. form and concentrations of Cu and Fe supplied, plant age, species and cultivars) and parameters used to establish critical levels which may be more or less sensitive to Cu phytotoxicity (Fe chlorosis, root growth, shoot growth). In addition, no significant decrease in shoot dry biomass was observed in the present work, suggesting that Cu phytotoxicity might be less than in former studies such as that of Taylor and Foy (1985).

## Iron nutrition as affected by Cu phytotoxicity

Copper phytotoxicity has been reported to induce Fe deficiency (Lexmond and van der Vorm 1981; Taylor and Foy 1985; McBride 2001). We previously observed in field-grown durum wheat cropped in Cu-contaminated soils that Cu phytotoxicity may occur in calcareous soils as evidenced by induced Fe deficiency (Fe chlorosis), presumably due to impaired Fe uptake with increasing Cu uptake (Michaud et al. 2007).

Both Fe concentration and amounts of Fe accumulated in shoots decreased significantly with increasing Cu concentration in nutrient solution for both Fe treatments (Table 5 and Fig. 4). Actually, with increasing Cu concentration, shoot Fe concentration decreased 1.6-fold and 1.4-fold for low Fe and high Fe treatments, respectively and, amounts of Fe accumulated in shoots decreased 32-fold and only 3-fold for low Fe and high Fe treatments, respectively. This showed that with increasing Cu concentration, the decrease in shoot Fe was more pronounced for low than high Fe supply. Former studies also reported that increasing Cu concentration in nutrient solution resulted in decreased shoot Fe concentration (Lexmond and van der Vorm 1981, Taylor and Foy 1985; McBride 2001; Kopittke and Menzies 2006). In addition, Cu and Fe concentrations as well as amounts of Cu and Fe accumulated in shoots varied inversely, suggesting an antagonism between Cu and Fe in shoots, i.e. impaired Fe translocation towards shoots (Fig. 1a). This may have resulted in Fe deficiency as interveinal chlorosis symptoms were observed at larger Cu concentrations. Actually, with increasing Cu concentration shoot Fe concentration decreased, particularly for low Fe treatment, far below the level reported to be adequate in green plant tissues, which is generally about  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  (Ma and Nomoto 1996; Reuter and Robinson 1997; Ma 2005). In contrast to shoots, Fe concentration in roots tended to increase with increasing Cu concentration in nutrient solution and was positively correlated to root Cu concentration (Table 5 and Fig. 1b). This is in agreement with the results found for Cu and Ni in hydroponically grown cowpea (*Vigna unguiculata*) (Kopittke and Menzies 2006; Kopittke et al. 2007) but contradicts our previous results obtained for field grown durum wheat (Michaud et al. 2007).

Although Fe concentration in both shoots and roots was significantly lower after eight days at low Fe supply, the estimated root-induced release of complexing compounds did not vary significantly between the two Fe treatments (Fig. 5). These results were rather unexpected because root-induced release of complexing compounds (presumably phytosiderophores) has been found to be increased under Fe deficiency in bread wheat using the same indirect method of quantification (Chaignon et al. 2002). The effect of Cu exposition possibly masked the differences which might have occurred between the two Fe treatments by inducing a Fe deficiency in both Fe treatments, as evidenced by the observed decrease in shoot Fe concentration and appearance of interveinal chlorosis with increasing Cu concentration in nutrient solution. Actually, the root-induced release of complexing compounds increased significantly with increasing Cu concentration in nutrient solution at low Fe supply and globally for the two Fe treatments but not at high Fe supply (Fig. 5a). In addition, it was positively correlated with Cu uptake at low Fe supply and for the two Fe treatments, but not at high Fe supply (Fig. 5b). This suggests that increasing Cu concentration in nutrient solution and resulting increased Cu uptake were possibly related to increased release of complexing compounds by roots without significant difference between the two Fe treatments. Beside the secretion of phytosiderophores, copper rhizotoxicity may have altered the root membrane integrity which may have induced the leakage of root exudates (Marschner 1995) at the largest Cu concentrations in nutrient solution (above  $1 \mu\text{M Cu}^{2+}$ ). This may have contributed

to the observed increase in the release of complexing compound with increasing Cu concentrations.

Meda et al. (2007) observed that increasing Cd concentration in nutrient solution resulted in decreasing Fe uptake and increasing phyto siderophore secretion due to Fe deficiency induced by excess Cd. The method employed in the present work for quantifying the complexing capacity of root exudates has been previously used to quantify phyto siderophore secretion (Treeby et al. 1989; Chaignon et al. 2002). Actually, phyto siderophore secretion is known to be enhanced in response to Fe deficiency in strategy II plant (Graminaceous) species (Marschner et al. 1989; Kraemer et al. 2006; Robin et al. 2008). Increase in the release of complexing compounds with increasing Cu concentration in nutrient solution might thus also be partly due to enhanced phyto siderophore secretion as a response to Fe deficiency induced by excess Cu. Nevertheless, as recently stressed by Reichman and Parker (2007b), (i) the method we used is not specific for phyto siderophores, which means that other complexing compounds such as organic and phenolic acids, amino acids and siderophores can also contribute to mobilize Cu from the Cu-loaded resin and (ii) values obtained by this indirect method are not absolute values but rather largely underestimated values since phyto siderophores may not be strong enough chelators to strip Cu quantitatively off the resin. Increased root exudation of organic anions as Al- and Cu-resistance mechanisms has been evidenced in wheat (Ma et al. 2001; Nian et al. 2002). Increasing secretion of complexing compounds with increasing Cu concentration and Cu uptake (Fig. 5) might thus also be partly due to increased secretion of carboxylates or other organic ligands. However, phyto siderophores exhibit far larger association constants with metal ions (e.g. Cu and Fe) than organic anions (Murakami et al. 1989; Callahan et al. 2006; Kraemer et al. 2006), so that contribution of carboxylates to mobilize Cu from the Cu-loaded resin may be marginal compared with that of phyto siderophores. The use of phyto siderophore detection with chromatography coupled to mass spectrometry (Xuan et al. 2006) would have helped to ascertain whether increasing Cu concentration in nutrient solution and resulting Cu phytotoxicity were definitely implied in increased phyto siderophore secretion as a response to induced Fe deficiency.

In conclusion, our results showed that excess Cu induced (i) a rhizotoxicity with global reduction of root elongation and (ii) a significant decrease in shoot Fe concentration and the development of interveinal chlorosis symptoms suggesting the induction of Fe deficiency. In addition, increasing Cu concentration in nutrient solution and resulting enhanced Cu uptake were related to significant increase in the root-induced release of complexing compounds, presumably phyto siderophores, without significant difference between the two Fe treatments. Further experiments are needed to ascertain whether Cu phytotoxicity is directly implied in increased phyto siderophore secretion in response to induced Fe deficiency by using direct detection techniques. This work revealed that root Cu concentration corresponding to reduced root elongation might be a simple, sensitive indicator of Cu phytotoxicity: concentrations of 16-20 mg kg<sup>-1</sup> in shoots and of about 250-300 mg kg<sup>-1</sup> in roots may be suitable critical levels of severe Cu phytotoxicity corresponding to the appearance of chlorosis symptoms and to considerable reduction (50%) of root elongation for durum wheat. More importantly, 10-25% reduction in root length was found for root Cu concentrations of 100-150 mg kg<sup>-1</sup> while shoot Cu was not significantly changed compared with normal Cu supply: these appeared as safer, more environmentally relevant, threshold values. Further studies are needed to validate these critical levels with various genotypes and species of soil-grown plants in pot experiments.

### III.5. Acknowledgments

We thank Didier Arnal, Nicole Balsera and Lucien Roger for technical help. We also thank Jean-François Briat, Michel Mench and Erik Smolders for their constructive comments. Financial support for this work was provided by the French ECCO-ECODYN programme.

### III.6. References

- Ali NA, Bernal MP and Ater M. 2002. Tolerance and bioaccumulation of copper in *Phragmites australis* and *Zea mays*. *Plant Soil* 239, 103–111
- Blamey FP 2001 The role of the root cell wall in aluminium toxicity. *Plant nutrition acquisition: new perspectives, workshop on new concepts of plant nutrient acquisition*, Tsukuba, 1998. pp. 201–226
- Borkert CM, Cox FR and Tucker MR 1998 Zinc and copper toxicity in peanut, soybean, rice, and corn in soil mixtures. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 29, 2991–3005
- Callahan DL, Baker AJM, Kolev SD and Wedd AG 2006 Metal ion ligands in hyperaccumulating plants *J. Biol. Inorg. Chem.* 11, 2–12
- Chaignon V and Hinsinger P 2003 A biotest for evaluating copper bioavailability to plants in a contaminated soil. *J. Environ. Qual.* 32, 824–833
- Chaignon V, Di Malta D and Hinsinger P 2002 Fe-deficiency increases Cu acquisition by wheat cropped in a Cu-contaminated vineyard soil. *New Phytol.* 154, 121–130
- Chaignon V, Sanchez-Neira I, Herrmann P, Jaillard B and Hinsinger P 2003 Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. *Environ. Pollut.* 123, 229–238
- Chaney RL 1980 Health risks associated with toxic metals in municipal sludge. In: Bitton G, Damro DL, Davidson GT, Davidsson JM (Eds), *Sludge: Health risks of land application*. Ann Arbor Science, Ann Arbor, Michigan, pp. 59–83
- Davis RD and Beckett PHT 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
- Degryse F, Smolders E and Parker DR 2006 Metal complexes increase uptake of Zn and Cu by plants: implications for uptake and deficiency studies in chelator-buffered solutions. *Plant Soil* 289, 171–185
- Delas J 1963 La toxicité du cuivre accumulé dans les sols. *Agrochimica* 7, 258–288
- Kinraide TB and Yermiyahu U 2007 A scale of metal ion binding strengths correlating with ionic charge, Pauling electronegativity, toxicity, and other physiological effects. *J. Inorg. Chem.* 101, 1201–1213.
- Kinraide TB, Pedler JF and Parker DR 2004 Relative effectiveness of calcium and magnesium in the alleviation of rhizotoxicity in wheat induced by copper, zinc, aluminum, sodium, and low pH. *Plant Soil* 259, 201–208.
- Kopittke PM and Menzies NW 2006 Effect of Cu toxicity on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant Soil* 279, 287–296
- Kopittke PM, Asher CJ and Menzies NW 2007 Toxic effects of Ni<sup>2+</sup> on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant Soil* 292, 283–289
- Kraemer SM, Crowley DE and Kretschmar R 2006 Geochemical aspects of phytosiderophore-promoted iron acquisition by plants. *Adv. Agron.* 91, 1–46
- Lexmond TM and Van der Vorm PDJ 1981 The effect of pH on copper toxicity to hydroponically grown maize. *Neth. J. Agr. Sci.* 29, 217–238

- Nian H, Yang ZM, Ahn SJ, Cheng ZJ and Matsumoto HA 2002 comparative study on the aluminium- and copper-induced organic acid exudation from wheat roots. *Physiol. Plant.* 116, 328–335
- Ma JF 2005 Plant root responses to three abundant soil minerals: silicon, aluminium and iron. *Crit. Rev. Plant Sci.* 24, 267–281
- Ma JF and Nomoto K 1993 Inhibition of mugineic acid-ferric complex uptake in barley by copper, zinc and cobalt. *Physiol. Plantarum* 89, 331–334
- Ma JF and Nomoto K 1996 Effective regulation of iron acquisition in graminaceous plants. The role of mugineic acids as phytosiderophores. *Physiol. Plantarum* 97, 609–617
- Ma JF, Ryan PR and Delhaize E 2001 Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci.* 6, 273–278
- MacNicol RD and Beckett PHT 1985 Critical tissue concentrations of potentially toxic elements. *Plant Soil* 85, 107–129
- Marschner H 1995 *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2<sup>nd</sup> edn. London, UK, Academic Press. 889 pp
- Marschner H, Treeby M and Römheld V 1989 Role of root-induced changes in the rhizosphere for iron acquisition in higher plants. *Z. Pflanz. Bodenkunde* 152, 197–204
- McBride MB 2001 Cupric ion activity in peat soil as a toxicity indicator for maize. *J. Environ. Qual.* 30, 78–84
- Meda AR, Scheuermann EB, Prechsl UE, Erenoglu B, Schaaf G, Hayen H, Weber G and von Wirén N 2007 Iron acquisition by phytosiderophores contributes to cadmium tolerance. *Plant Physiol.* 143, 1761–1773
- Michaud AM, Bravin MN, Galleguillos M and Hinsinger P 2007 Copper uptake and phytotoxicity as assessed in situ for durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cultivated in Cu-contaminated, former vineyard soils. *Plant Soil* 298, 99–111
- Murakami T, Ise K, Hayakawa M, Kamei S and Takagi S (1989) Stabilities of metal complexes of mugineic acids and their specific affinities for iron (III). *Chem. Lett.* 2137–2140
- Parker DR 1995 Root growth analysis: an underutilised approach to understanding aluminium rhizotoxicity. *Plant Soil* 171, 151–157.
- Parker DR, Chaney RL and Norvell WA 1995 Chemical equilibrium models: applications to plant nutrition research. In: Loeppert RH, Schwab AP, Goldberg S (eds) *Chemical equilibrium and reaction models*. Soil Sci. Soc. Amer. Spec. Pub. No. 42, Madison, WI, pp. 163–200.
- Reichman SM and Parker DR 2005 Metal complexation by phytosiderophores in the rhizosphere. In *Biogeochemistry of trace elements in the rhizosphere*. Eds. Huang PM and Gobran GR, Elsevier. pp 129–156
- Reichman SM and Parker DR 2007a Probing the effects of light and temperature on diurnal rhythms of phytosiderophore release in wheat. *New Phytol.* 174, 101–108
- Reichman SM and Parker DR 2007b Critical evaluation of three indirect assays for quantifying phytosiderophores released by the roots of *Poaceae*. *Eur. J. Soil Sci.* 58, 844–853
- Reuter DJ and Robinson 1997 *Plant Analysis: an Interpretation Manual*. Collingwood, Australia: CSIRO, 572 pp.
- Robin A, Vansuyt G, Hinsinger P, Meyer JM, Briat JF and Lemanceau P 2008. Iron dynamics in the rhizosphere: consequences for plant health and nutrition. *Adv. Agron.* (submitted)
- Rooney CP, Zhao FJ and McGrath SP 2007 Phytotoxicity of nickel in a range of European soils: Influence of soil properties, Ni solubility and speciation. *Environ. Poll.* 145, 596–605



- Quartacci MF, Pinzino C, Sgherri CLM, Dalla Vecchia F and Navari-Izzo F 2000 Growth in excess copper induces changes in the lipid composition and fluidity of PSII-enriched membranes in wheat. *Physiol. Plantarum* 108, 87–93
- Schaider LA, Parker DR and Sedlak DL 2006 Uptake of EDTA-complexed Pb, Cd and Fe by solution- and sand-cultured *Brassica juncea*. *Plant Soil* 286, 377–391
- Sheldon AR and Menzies NW 2005 The effect of copper toxicity on the growth and root morphology of Rhodes grass (*Chloris gayana* Knuth.) in resin buffered solution culture. *Plant Soil* 278, 341–349
- Taylor GJ and Foy CD 1985 Differential uptake and toxicity of ionic and chelated copper in *Triticum aestivum*. *Can. J. Bot.* 63, 1271–1275
- Thakali S, Allen HE, di Toro D, Ponizovsky AA, Rooney CP, Zhao FJ and McGrath SP 2006 A Terrestrial Biotic Ligand Model. 1. Development and application to Cu and Ni toxicities to barley root elongation in soils. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7085–7093
- Treeby M, Marschner H and Römheld V (1989) Mobilization of iron and other micronutrient cations from a calcareous soil by plant-borne, microbial, and synthetic metal chelators. *Plant Soil* 114, 217–226
- Vindimian E 2001 <http://eric.vindimian.9online.fr/> (last access on 08/08/2007)
- Weng L, Lexmond TM, Wolthoorn A, Temminghoff EJM, van Riemsdijk WH 2003 Phytotoxicity and bioavailability of nickel: chemical speciation and bioaccumulation. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2180–2187
- Wheeler DM and Power IL 1995 Comparison of plant uptake and plant toxicity of various ions in wheat. *Plant Soil* 172, 167–173
- Xuan Y, Scheuermann EB, Meda AR, Hayen H, von Wirén N and Weber G 2006 Separation and identification of phytosiderophores and their metal complexes in plants by zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatography* 1136, 73–81
- Yruela I, Pueyo JJ, Alonso PJ and Picorel R (1996) Photoinhibition of photosystem II from higher plants - Effect of copper inhibition. *Journal of Biological Chemistry* 271, 27408–27415
- Zhang FS, Treeby M, Römheld V and Marschner H 1991 Mobilization of iron by phytosiderophores as affected by other micronutrients. *Plant Soil* 130, 173–178
- Zhao FJ, Rooney CP, Zhang H and McGrath SP 2006 Comparison of soil solution speciation and diffusive gradients in thin-films measurement as an indicator of copper bioavailability to plants. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 733–742

## **Chapitre IV : Biodisponibilité de Cu chez le blé dur, effet de la déficience en Fe et modifications chimiques induites dans la rhizosphère**

---

### **Introduction**

Les résultats obtenus dans le chapitre précédent ont permis de déterminer des valeurs seuils de phytotoxicité de Cu dans les parties aériennes et surtout dans les racines chez le blé dur. Nous avons par ailleurs constaté la mise en place d'une déficience en Fe sous phytotoxicité de Cu, accompagnée d'une augmentation de la libération de complexants par les racines. En revanche, ce travail n'a pas permis de mettre en évidence l'implication de la déficience en Fe dans l'augmentation des risques de phytotoxicité de Cu. D'autre part, les résultats obtenus dans le chapitre II mettaient en évidence des modifications chimiques induites dans la rhizosphère de blé dur cultivé *in situ* en sols calcaires et non calcaires, sans établir le lien avec la biodisponibilité de Cu.

La biodisponibilité est définie par Harmsen et al. (2005) comme le prélèvement (aboutissant à une accumulation ou à un effet) d'un composé par un organisme cible considéré pendant une période de temps fixée et à partir d'une unité de masse de sol donnée. La disponibilité et *in fine* la biodisponibilité d'un élément comme Cu peuvent être modifiées par l'activité racinaire au niveau de la rhizosphère (zone bio-influencée par les racines), *via* notamment des modifications de pH et l'exsudation de ligands organiques (Chaignon et al. 2002a et 2002b ; Cornu et al. 2007 ; Hinsinger et Courchesne 2008). Les graminées sont ainsi connues pour sécréter davantage de phytosidérophores (i.e. complexants de Fe ferrique) en réponse à la déficience en Fe (stratégie II d'acquisition de Fe, selon Marschner et al. 1986) qui peut être induite en sols calcaires par la faible disponibilité de Fe. D'ailleurs, la sécrétion accrue de phytosidérophores sous déficience en Fe a été reliée à l'augmentation de la biodisponibilité d'éléments en traces métalliques comme Cu, Ni et Cd, suggérant l'implication de cette stratégie d'acquisition de Fe des graminées dans l'augmentation de leur biodisponibilité (Römheld et Awad 2000 ; Chaignon et al. 2002b ; Meda et al. 2007).

L'objectif de ce volet de la thèse était d'étudier la biodisponibilité de Cu et les risques de phytotoxicité de Cu chez le blé dur en hydroponie et en sols non acides (principalement calcaires) en lien avec le statut en Fe de la plante et les modifications chimiques induites dans la rhizosphère.

Deux expérimentations ont été conduites sous conditions contrôlées avec un biotest adapté de celui développé par Chaignon et Hinsinger (2003) :

- du blé dur déficient et non déficient en Fe a été cultivé en hydroponie en présence de différentes concentrations de Cu et avec deux sols calcaires contaminés en Cu pour déterminer l'effet du statut en Fe de la plante sur la biodisponibilité et la phytotoxicité de Cu chez le blé dur (article intitulé : 'Copper uptake and phytotoxicity as affected by Fe deficiency in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.)' à soumettre à *Plant and Soil*).

- du blé dur déficient et non déficient en Fe a été cultivé en biotest sur 22 sols non acides (dont 20 calcaires) parmi ceux étudiés dans le chapitre II (dans l'article intitulé : 'Copper uptake and phytotoxicity as assessed in situ for durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cultivated in Cu-contaminated, former vineyard soils') afin d'étudier la biodisponibilité de Cu en lien avec le statut en Fe de la plante et les modifications chimiques induites dans la rhizosphère (article intitulé : 'Cu bioavailability in Cu-contaminated, non acidic soils as related to root-induced chemical changes in the rhizosphere of durum wheat' à soumettre à *Environmental Pollution*).

**Copper uptake and phytotoxicity as affected by Fe deficiency in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.)**

A M Michaud and P Hinsinger

INRA – SupAgro, UMR 1222 Biogéochimie du Sol et de la Rhizosphère, Place Viala, 34060 Montpellier cedex 1, France

Corresponding author:

Philippe Hinsinger

Tel: +33 4 99 61 22 49

Fax: +33 4 99 61 30 88

Email: philippe.hinsinger@supagro.inra.fr

Short running title: Cu uptake under Fe deficiency in durum wheat

## **Abstract**

This work assessed copper (Cu) uptake, bioavailability and phytotoxicity as affected by iron (Fe) deficiency in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.). For this purpose a hydroponic experiment was carried out to study Cu uptake and phytotoxicity at two levels of Fe supply and a soil experiment was carried out to study whether Cu bioavailability was altered by Fe deficiency in plants. Iron deficiency resulted in significant increase in root-induced release of complexing compounds. Copper concentrations in both shoots and roots and Cu bioavailability for plants cropped with the two Cu-contaminated, calcareous soils were significantly enhanced under Fe deficiency in durum wheat. In contrast, Cu concentration in plant parts and Cu uptake were not significantly increased under Fe deficiency in durum wheat cropped under hydroponic conditions. In addition, Fe deficiency was not related to increased risks of Cu phytotoxicity. Our results suggest that Fe deficiency and the resulting increase in root-induced release of complexing compounds (presumably phytosiderophores) may lead to increased Cu bioavailability in durum wheat only for soil-grown plants.

### *Key words*

copper, deficiency, iron, phytosiderophore, phytotoxicity, root exudates, *Triticum turgidum durum* L.

### IV.1.1. Introduction

Copper was established as an essential element for higher plants in the 1930s (Adriano 2001). It is involved in numerous physiological processes which imply redox reactions, such as photosynthesis (plastocyanin), respiration (cytochrome oxidase), oxidative stress response (superoxide dismutase) and cell wall metabolism (polyphenol oxidase and diamine oxidase) (Marschner 1995). Although Cu is an essential element for plant growth, it is also extremely phytotoxic at larger concentrations. The critical level of Cu phytotoxicity reported for wheat shoots is about 15-18 mg kg<sup>-1</sup> DM (Davis and Beckett 1978). However there is a highly efficient Cu homeostasis in higher plants and at elevated Cu exposition, Cu is mainly accumulated in roots (Chaignon et al. 2002; Ali et al. 2004). Excess Cu supply induces rhizotoxicity as observed by stunting, reduced branching, thickening and unusually dark coloration of the roots and global reduction of root elongation (Marschner 1995; Sheldon and Menzies 2005; Kopittke and Menzies 2006). In addition, Cu phytotoxicity is also known to sometimes result in chlorosis symptoms due to induced Fe deficiency (Lexmond and Van der Vorm 1981; Taylor and Foy 1985; Wheeler and Power 1995; Michaud et al. 2007).

Iron is an essential micronutrient for all higher plants which is involved in major physiological processes, such as photosynthesis and respiration (Marschner 1995). Although abundant in soils, most of soil Fe is not available for plant uptake, primarily because the solubility of soil iron oxides is low and dramatically decreases with increasing pH (Lindsay 1979; Robin et al. 2008). Therefore, at neutral soil pH levels and even more critically so in calcareous soils, soluble Fe concentrations are far below those required for optimum plant growth. To cope with such constraint, higher plants have evolved two efficient strategies (Marschner et al. 1986). Under Fe deficiency Strategy I plants exhibit increased Fe-reductase activity as well as increased release of protons and possibly reductants/chelators. Strategy II plants, which are Gramineous species, are characterized by an increased secretion of ferric chelating compounds (phytosiderophores) under Fe deficiency (Römheld 1987; Marschner et al. 1989) and bear a specific Fe-phytosiderophore uptake system which has been identified in maize (*Zea mays* L.)(ZmYS1) by Curie et al. (2001) and barley (*Hordeum vulgare* L.)(HvYS1) by Murata et al. (2006). Phytosiderophores are able to form chelates with Cu which are as stable as those formed with Fe (Murakami et al. 1989). According to speciation calculations made by Reichman and Parker (2005), at neutral to alkaline pH values, Cu may outcompete Fe for chelate formation with phytosiderophores. Under Fe deficiency, increased secretion of phytosiderophores in barley was shown to mobilize Fe from calcareous soils, and also other micronutrients such as zinc (Zn), manganese (Mn) and Cu (Treeby et al. 1989). In addition, increased secretion of phytosiderophores in cereals has been shown to correlate with the increased uptake of nickel (Ni), cadmium (Cd), Zn and Cu by plants cultivated in calcareous, contaminated soils (Römheld and Awad 2000; Chaignon et al. 2002). In contrast, for tomato (*Lycopersicon esculentum* L.), which is a Strategy I plant, Fe deficiency resulted in increased Cu uptake in acidic soils but not in calcareous soils (Cornu et al. 2007).

It is often considered that bioavailability which is defined by Harmsen et al. (2005) as 'the uptake (resulting in accumulation or an effect) of a component by a specific organism during a fixed period of time from the unit mass of soil involved' and phytotoxicity of metals decrease with increasing pH. However, in the Languedoc region (Southern France), cases of Cu phytotoxicity as evidenced by interveinal chlorosis symptoms have been frequently reported in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cropped in Cu-contaminated, calcareous soils (Braun 2006). In calcareous, former vineyard soils, Michaud et al. (2007) have recently shown that the plants which were displaying those symptoms had greater root

Cu concentrations and lesser root Fe concentrations than normal plants growing in the vicinity outside of the patches of Cu contaminated soils. In such calcareous soils which are prone to induce Fe deficiency, one may thus question whether Strategy II mechanisms of Fe acquisition might explain the larger Cu uptake by durum wheat leading to Cu phytotoxicity. The aim of this work was thus to assess the impact of Fe deficiency and root-induced release of complexing compounds on Cu uptake, bioavailability and phytotoxicity in durum wheat.

#### **IV.1.2. Materials and methods**

##### **Plant growth conditions**

The cropping device used for the present experiments was the root mat biotest developed by Chaignon and Hinsinger (2003) to enable an easy recovery of shoots, roots, and rhizosphere. In the first stage of the two experiments, plants were cultivated for 4 weeks in hydroponic conditions to obtain plants with different Fe status: deficiency (-Fe) and sufficiency (+Fe). In the second stage, plants were exposed for 8 days either (i) to six different levels of Cu concentration in the hydroponic experiment or (ii) to two calcareous soils differing in their total Cu concentration in the soil experiment. The two stages of each experiment were conducted in a growth chamber with the following day/night conditions: 16 h, 25°C, 75% relative humidity and a photon flux density of about 550  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (in the range 400-700 nm)/8h, 20°C, 100% relative humidity. The cropping device was made of two PVC pipes, the small one (32 mm external diameter) being inserted into the large one. The large pipe was closed at the bottom by a nylon mesh (30  $\mu\text{m}$  pore diameter) and the small pipe by a grid (1.5 mm pore diameter). For the first stage, two seeds of durum wheat (*Triticum turgidum durum* L., cv Acalou) which were surface sterilised with 6%  $\text{H}_2\text{O}_2$  were sown on top of the grid in each pot and germinated for one week with a nutrient solution containing 600  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  and 2  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ . The pots were then transferred for 3 weeks to 6-dm<sup>3</sup> buckets (10 pots per bucket) filled with continuously aerated nutrient solution. During the two first weeks, plants were supplied with a complete nutrient solution of following composition: 2 mM  $\text{KNO}_3$ , 2 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100  $\mu\text{M}$   $\text{FeNaEDTA}$ , 2  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 0.05  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 1  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$ . During the last week of the first stage of growth, plants were exposed to nutrient solution containing either 2 or 100  $\mu\text{M}$   $\text{FeNaEDTA}$  in order to induce contrasting Fe status. All nutrient solutions had an initial pH of about 5.5 and were renewed every third day to avoid large pH changes and nutrient depletion. At the end of this first stage, five replicates (five pots taken from different buckets) were collected and analysed separately for each Fe treatment. The analyses of these plants provided reference values (initial Cu concentration) to be compared with those obtained at the end of the second stage of both hydroponic and soil experiments.

##### **Hydroponic experiment**

For the second stage of the hydroponic experiment, pots containing 4-week-old wheat plants were transferred individually for 8 days on top of 1-dm<sup>3</sup> containers filled with continuously aerated nutrient solution of following composition: 2 mM  $\text{KNO}_3$ , 2 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 50  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100  $\mu\text{M}$   $\text{FeNaEDTA}$ , 2  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 0.05  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  and with one of the following six  $\text{CuCl}_2$  concentrations: 1, 5, 10, 20, 30, 60  $\mu\text{M}$ . Free Cu concentrations in nutrient solutions were estimated with the GEOCHEM computer code (Parker et al. 1995). Copper predominantly occurred as Cu-EDTA complexes, while concentrations of the free Cu ionic species were: 0.006, 0.036, 0.08, 0.25, 0.6 and 2.4

$\mu\text{M}$  respectively for total solution Cu concentration of 1, 5, 10, 20, 30 and 60  $\mu\text{M}$ . All nutrient solutions had an initial pH of 5.5 and were renewed every day. At the end of the second stage, all of the five replicates of each treatment were collected and analysed separately.

### **Soil experiment**

For the second stage of the soil experiment, pots with 4 week-old wheat plants were transferred individually for 8 days onto soils disks (1.5 mm thickness, 40 mm diameter) that were connected to nutrient solution reservoirs (1-dm<sup>3</sup> containers). Before the contact, the soils had been incubated for 10 days with a nutrient solution of identical composition as the one used for the hydroponic experiment minus CuCl<sub>2</sub> and FeNaEDTA so that soil was the only source of Fe and Cu for the plants. The two studied soils were calcareous topsoils sampled in vineyards and formerly studied by Chaignon et al. (2002) and Cornu et al. (2007). The least contaminated soil had 145 mg Cu kg<sup>-1</sup>, pH<sub>water</sub> = 8.7 and 273 g CaCO<sub>3</sub> kg<sup>-1</sup>, while the most contaminated soil had 398 mg Cu kg<sup>-1</sup>, pH<sub>water</sub> = 8.1 and 87 g CaCO<sub>3</sub> kg<sup>-1</sup>. For additional soil properties, please refer to Chaignon et al. (2003) and Cornu et al. (2007). At the end of the second stage, all of the five replicates were collected and analysed separately for each treatment.

### **Collection and quantification of root exudates**

For the collection of root exudates, intact plants were used before being harvested at the end of the first stage and at the end of the second stage of soil and hydroponic experiments. Roots were rinsed for 1 min with deionised water and then transferred to 250 cm<sup>3</sup> vials containing 30 cm<sup>3</sup> of aerated deionised water for 3 h. The procedure started 3 h after the onset of the light period in order to coincide with the peak period of exudation of phytosiderophores (Takagi et al. 1984; Reichman and Parker 2007a). After a 3 h collection period, solutions of root exudates were filtered at 0.45  $\mu\text{m}$  and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The plants were then harvested as described below.

The complexing capability of the root exudates was estimated indirectly by the amount of Cu mobilised from a Cu-loaded resin (Chelite-P, Serva, Heidelberg, Germany) as previously described by several authors for the indirect quantification of phytosiderophore secretion (Treeby et al. 1989; Chaignon et al. 2002). The Cu-Chelite P complex was prepared by stirring 5 g of Chelite P in 500 cm<sup>3</sup> of 50 mM CuSO<sub>4</sub> for 15 min. This suspension was filtered and washed with deionised water until the water was free of Cu. Then, the Cu-loaded resin was equilibrated with 500 cm<sup>3</sup> of 10 mM MES (2-(N-morpholino) ethane-sulfonic acid) buffer (pH 5) and used for Cu mobilization tests. A volume of 2 cm<sup>3</sup> of root exudates was mixed with 2 cm<sup>3</sup> of Cu-loaded resin suspended in MES buffer (pH 5) and 6 cm<sup>3</sup> of deionised water for 45 min, before being filtered through an ashless filter paper (Whatman 40). The concentration of Cu in the filtrates was measured by Flame Atomic Absorption Spectrometry (AAS Varian SpectrAA-600, Australia) and the amount of complexing compounds in the root exudates was calculated as mobilized Cu equivalents per two plants per 3 h.

## **Plant analyses**

After collection of root exudates, roots and shoots were harvested and weighed. Shoots were oven dried at 105°C and roots were frozen at -20°C. Copper bound to root cell walls (root apoplasmic Cu) was determined as described by Chaignon et al. (2002). Briefly, after thawing, a subsample of 0.8 g of roots (on a fresh matter basis) was shaken end-over-end with 40 cm<sup>3</sup> of 1 mM HCl for 3 min, then 360 mm<sup>3</sup> of 1 M HCl were added to yield a final concentration of 10 mM HCl. After shaking for another 3 min, the suspensions were filtered through an ashless filter paper (Whatman 40) and roots were recovered and oven dried at 105°C. After extraction of root apoplasmic Cu, Cu remaining in roots was considered to be the root symplasmic Cu. The remaining portion of untreated roots was also oven dried at 105°C. The oven dried roots and shoots were digested separately in a microwave oven with hot concentrated HNO<sub>3</sub>. Concentrations of Cu and Fe in the root and shoot digests were determined by Flame Atomic Absorption Spectrometry and reference plant materials (BCR 62, olive (*Olea europaea* L.) leaves; BIPEA V463, maize (*Zea mays* L.) shoots) were used as standards. Root symplasmic Cu was determined by measuring Cu concentration in the root digests of roots recovered after extraction of root apoplasmic Cu. In hydroponic experiment, the root length was estimated by scanning the root system and subsequent analysis with the WinRhizo® image analysis software package (Regent Instruments Inc., 2005). Root elongation was deduced by subtracting root length measured in reference plants harvested at the end of the first stage to root length measured at the end of hydroponic experiment.

## **Statistical analyses**

Analyses of variance with Tukey HSD test were performed to identify significant differences between treatments. The data presented in the figures and tables are displayed as average ± standard deviation (indicated as bars in the figures) calculated for the five replicates per treatment. The software used for this purpose was Statistica® (Statsoft Inc., version 6, Tulsa, OK, USA).

### **IV.1.3. Results**

#### **Visual symptoms and biomass**

At the end of the first stage, visual symptoms of Fe deficiency (interveinal chlorosis) were observed in Fe-deficient plants grown at low Fe supply for one week. However, shoot and root dry biomass did not vary significantly between Fe-deficient and Fe-sufficient plants (Table 1).

In hydroponic experiment, interveinal chlorosis symptoms disappeared more or less quickly during the course of the second stage of growth depending on nutrient solution Cu concentration, ranging from two days at 1 µM and five days at 60 µM. In the mean time, no symptoms of Fe deficiency appeared in Fe-sufficient plants. Whatever the Cu concentration, shoot and root dry biomass of both Fe-deficient and Fe-sufficient plants increased significantly during the second stage of the experiment relative to the first stage (Table 1). Although there were some significant differences between some of the treatments, there was no consistent effect of Cu concentration on either shoot or root biomass. In most cases, no significant difference was observed between the two Fe treatments for the root and shoot dry biomass.



In soil experiment, Fe-deficient plants exhibited less marked Fe chlorosis symptoms at the end of the second stage in contact with soils compared with Fe chlorosis symptoms observed at the end of the first stage, while Fe-sufficient plants did not exhibit such symptoms. As for hydroponic experiment, root and shoot dry biomass increased during the second stage of the experiment (Table 1). In addition, root and shoot dry biomass did not differ significantly between the two studied soils. Iron deficiency did not induce any significant decrease in plant dry biomass, except for shoot dry biomass of plants grown with the soil containing 145 mg Cu kg<sup>-1</sup>. It shall be noticed that compared with the hydroponic experiment, the plants exhibited smaller shoot and larger root biomass, and hence a bigger root/shoot ratio.

**Table 1** Dry biomass of shoots and roots expressed as g per two plants in first stage plants, hydroponic experiment and soil experiment (mean value ± standard deviation of five replicates). In hydroponic experiment, Cu concentration (Cu) in nutrient solution (1 – 60) is in µM; in soil experiment, soil Cu concentration (145 and 398) is in mg Cu kg<sup>-1</sup>. For each experiments (hydroponic and soil) separately, mean values with different letters within a column are significantly different ( $P<0.05$ ) as measured by a Tukey HSD test. Asterisk indicates that dry biomass differed significantly ( $P<0.05$ ) between Fe-deficient (-Fe) and Fe-sufficient (+Fe) plants as measured by a Tukey HSD test.

	Cu	dry biomass			
		g			
		shoots		roots	
		-Fe	+Fe	-Fe	+Fe
first stage		1.6 ± 0.2	1.8 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.0
hydroponic	1	4.1 ± 0.5 a	4.2 ± 0.6 a	1.1 ± 0.2 a	1.0 ± 0.1 a
	5	4.1 ± 0.4 a	4.4 ± 0.7 ab	1.2 ± 0.1ab	1.3 ± 0.2 bc
	10	4.3 ± 0.9 a	3.9 ± 0.6 a	1.3 ± 0.3 ab	1.1 ± 0.1 ab
	20	4.6 ± 0.7 a	4.6 ± 0.8 ab	1.3 ± 0.1 b	1.2 ± 0.1 bc
	30	4.0 ± 0.4* a	5.2 ± 0.6 b	1.2 ± 0.1 ab	1.3 ± 0.2 c
	60	4.2 ± 1.1* a	5.1 ± 0.3 b	1.1 ± 0.2 a	1.2 ± 0.1 abc
soil	145	2.5 ± 0.4* a	3.2 ± 0.4 a	1.8 ± 0.2 a	2.0 ± 0.2 a
	398	2.5 ± 0.6 a	2.9 ± 0.3 a	1.7 ± 0.3 a	1.8 ± 0.2 a

### Cu and Fe concentration

At the end of the first stage, shoot Cu concentration varied little but significantly ( $P<0.05$ ) with Fe supply, being slightly greater in Fe-deficient plants, while root Cu concentration did not vary significantly (Table 2). With increasing Cu concentration in hydroponic experiment, shoot Cu concentration varied from 7 to 43 mg kg<sup>-1</sup> DM in Fe-deficient plants and from 6 to 40 mg kg<sup>-1</sup> DM in Fe-sufficient plants while total root Cu concentration varied widely from 16 to 489 mg kg<sup>-1</sup> in Fe-deficient plants and from 14 to 376 mg kg<sup>-1</sup> DM in Fe-sufficient plants (Table 2). The root symplasmic Cu concentration increased from 4 to 115 mg kg<sup>-1</sup> DM in Fe-deficient plants and from 6 to 91 mg kg<sup>-1</sup> DM in Fe-sufficient plants. It corresponded to 22-31 % and 23-43 % of the total root Cu concentration in Fe-deficient and Fe-sufficient plants, respectively. Across all Cu treatments, in spite of the weak increase in Cu concentration in both shoots and roots (total and symplasmic) found for Fe-deficient plants compared with Fe-sufficient plants, no significant difference was generally observed between the two Fe treatments. The shoot/root ratios of Cu concentration in plant parts decreased

significantly with increasing Cu concentration, ranging from 0.47 to 0.09 in Fe-deficient plants and from 0.43 to 0.11 in Fe-sufficient plants without significant difference between the two Fe treatments (Table 2). In contrast, in soil experiment, Cu concentration in both shoots and roots increased significantly in Fe-deficient plants compared with Fe-sufficient plants (Fig. 1). The root symplasmic Cu corresponded to 47-30 % and 41-52 % of the total root Cu concentration in Fe-deficient and Fe-sufficient plants, respectively.

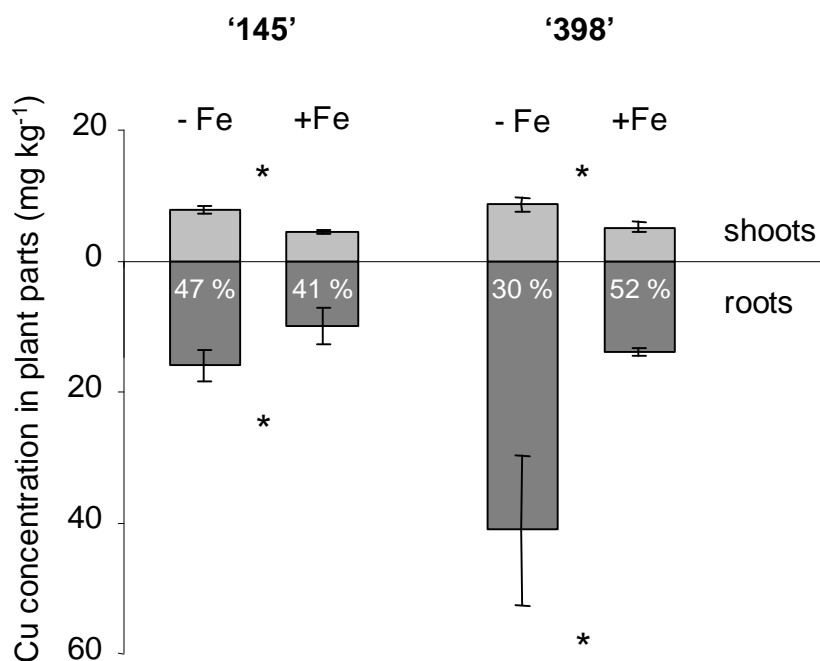
At the end of the first stage, Fe concentration in both shoots and roots was not significantly lower in Fe-deficient than Fe-sufficient plants (Table 3). In hydroponic experiment, decrease in shoot Fe concentration was observed with increasing Cu concentration in nutrient solution but it was significant ( $P<0.05$ ) only in Fe-sufficient plants. In contrast, no such decrease was observed for root Fe concentration. In addition, across all Cu treatments Fe concentration in shoots did not vary significantly between the two Fe treatments, while it was significantly larger in roots ( $P<0.01$ ) in Fe-sufficient plants compared with Fe-deficient plants. In soil experiment, Fe concentration in both shoots and roots was significantly larger in Fe-sufficient plants compared with Fe-deficient plants, except for root Fe concentration in plants grown on the soil containing 398 mg Cu kg<sup>-1</sup> for which no significant difference was observed (Table 3). The values were rather lower than those in plants grown in hydroponics, especially in the shoots.

**Table 2** Cu concentration in shoots and roots expressed as mg kg<sup>-1</sup>, and, shoot/root ratios of the Cu concentration in plant parts, deduced from the shoot Cu concentration (mg kg<sup>-1</sup>) divided by the root Cu concentration (mg kg<sup>-1</sup>) in reference first stage plants and hydroponic experiment (mean value  $\pm$  standard deviation of five replicates). In hydroponic experiment, Cu concentration (Cu) in nutrient solution (1 – 60) is in  $\mu$ M. Mean values with different letters within a column are significantly different ( $P<0.05$ ) as measured by a Tukey HSD test. Asterisk indicates that Cu concentration and shoot/root ratios differed significantly ( $P<0.05$ ) between Fe-deficient (-Fe) and Fe-sufficient (+Fe) plants as measured by a Tukey HSD test.

	Cu concentration mg kg <sup>-1</sup>						shoot/root ratio	
	shoots		roots (total)		roots (symplasmic)		-Fe	+Fe
	-Fe	+Fe	-Fe	+Fe	-Fe	+Fe		
first stage	8 $\pm$ 1*	7 $\pm$ 1	20 $\pm$ 11	13 $\pm$ 3	3 $\pm$ 1	3 $\pm$ 0	0.46 $\pm$ 0.14	0.51 $\pm$ 0.07
1	7 $\pm$ 1 a	6 $\pm$ 1 a	16 $\pm$ 3 a	14 $\pm$ 1 a	4 $\pm$ 1* a	6 $\pm$ 1 a	0.47 $\pm$ 0.09 a	0.43 $\pm$ 0.07 a
5	13 $\pm$ 1* ab	10 $\pm$ 2 ab	55 $\pm$ 3* a	39 $\pm$ 4 ab	12 $\pm$ 2 a	10 $\pm$ 1 a	0.24 $\pm$ 0.02 b	0.26 $\pm$ 0.03 b
10	19 $\pm$ 3* b	15 $\pm$ 2 abc	89 $\pm$ 11* ab	63 $\pm$ 13 b	23 $\pm$ 1* ab	16 $\pm$ 2 ab	0.22 $\pm$ 0.05 bc	0.25 $\pm$ 0.09 b
20	21 $\pm$ 3 bc	19 $\pm$ 7 bc	151 $\pm$ 8 bc	138 $\pm$ 18 c	46 $\pm$ 10* bc	31 $\pm$ 7 bc	0.14 $\pm$ 0.02 cd	0.14 $\pm$ 0.04 c
30	27 $\pm$ 2 c	23 $\pm$ 4 c	232 $\pm$ 25 c	196 $\pm$ 26 d	62 $\pm$ 14 c	51 $\pm$ 15 c	0.12 $\pm$ 0.02 d	0.12 $\pm$ 0.02 c
60	43 $\pm$ 9 d	40 $\pm$ 8 d	489 $\pm$ 110 d	376 $\pm$ 48 e	115 $\pm$ 22* d	91 $\pm$ 20 d	0.09 $\pm$ 0.03 d	0.11 $\pm$ 0.01 c

**Table 3** Fe concentration in shoots and roots expressed as mg kg<sup>-1</sup> in first stage plants, hydroponic experiment and soil experiment (mean value ± standard deviation of five replicates). In hydroponic experiment, Cu concentration (Cu) in nutrient solution (1 – 60) is in μM; in soil experiment, soil Cu concentration (145 and 398) is in mg Cu kg<sup>-1</sup>. For both experiments (hydroponic and soil) separately, mean values with different letters within a column are significantly different ( $P<0.05$ ) as measured by a Tukey HSD test. Asterisk indicates that Fe concentration differed significantly ( $P<0.05$ ) between Fe-deficient (-Fe) and Fe-sufficient (+Fe) plants as measured by a Tukey HSD test.

	Cu	Fe concentration mg kg <sup>-1</sup>			
		shoots		roots	
		-Fe	+Fe	-Fe	+Fe
first stage		83 ± 40	129 ± 90	301 ± 116	541 ± 209
hydroponic	1	126 ± 25 b	125 ± 24 b	294 ± 35* a	354 ± 60 a
	5	97 ± 20 ab	106 ± 26 ab	399 ± 70 a	451 ± 90 ab
	10	113 ± 21 ab	104 ± 18 ab	451 ± 48 a	393 ± 44 ab
	20	81 ± 19 a	94 ± 43 ab	310 ± 141* a	503 ± 40 ab
	30	99 ± 13 ab	88 ± 18 ab	421 ± 121 a	528 ± 141 b
	60	92 ± 26* ab	73 ± 8 a	316 ± 52* a	500 ± 81 ab
soil	145	39 ± 3* a	64 ± 10 a	237 ± 38* a	337 ± 77 a
	398	38 ± 8* a	67 ± 16 a	374 ± 208 a	269 ± 55 a

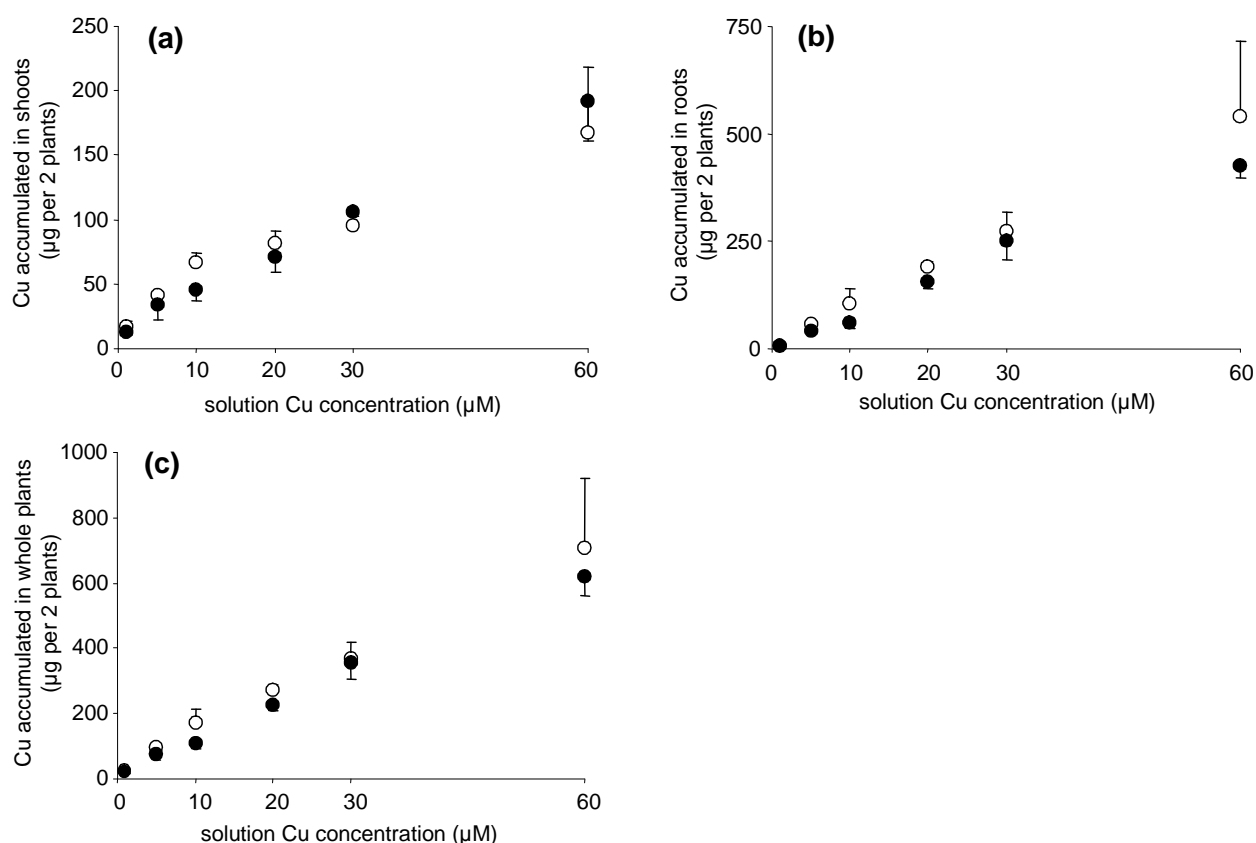


**Figure 1** Copper concentration in shoots (grey) and roots (dark grey) expressed as mg kg<sup>-1</sup> DM in plants grown in contact with two soils differing in Cu concentration (145 and 398 mg Cu kg<sup>-1</sup>) under Fe-deficiency (-Fe) and Fe-sufficiency (+Fe) in soil experiment. Percentages of root symplasmic Cu are indicated in white. Asterisk indicates that Cu concentration for shoots and roots differed significantly ( $P<0.05$ ) between Fe-deficient and Fe-sufficient plants as measured by a Tukey HSD test. The error bars are standard deviations.

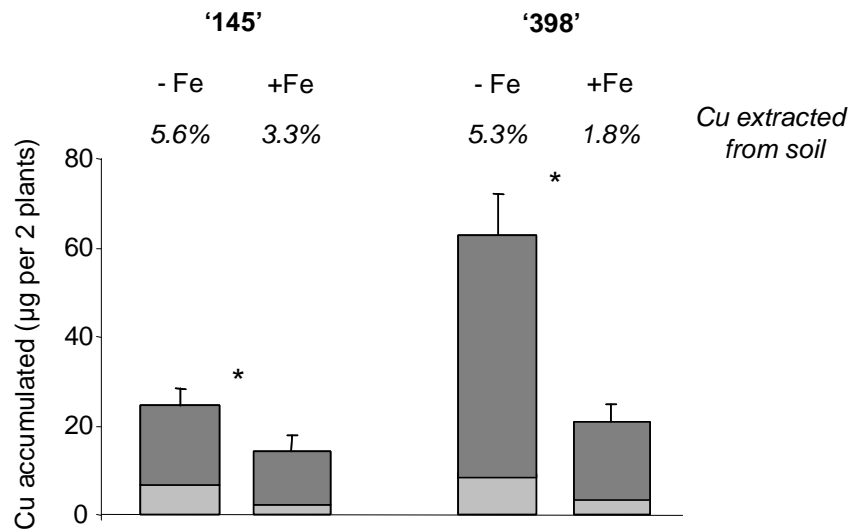
## Amount of Cu accumulated in plants

Amounts of Cu accumulated by plants during the second stage of both experiments were deduced from the amount of plant Cu at the end of the second stage (biomass x Cu concentration) by subtracting the initial amount of Cu in reference plants at the end of the first stage.

In hydroponic experiment, amounts of Cu accumulated in shoots (Fig. 2a), roots (Fig. 2b) and whole plants (Fig. 2c) increased significantly and almost linearly with increasing total Cu concentration in nutrient solution. In spite of the weak increase in amounts of Cu accumulated in roots and whole plants in Fe-deficient plants compared with Fe-sufficient plants, no significant difference was observed between the two Fe treatments. In contrast, in soil experiment, the amount of Cu accumulated in plants increased significantly in Fe-deficient plants compared with Fe-sufficient plants (Fig. 3). As for hydroponic experiment, the amount of accumulated Cu was significantly larger in roots than in shoots (Fig. 2 and Fig. 3). Durum wheat plants extracted 5.3-5.6% and 1.8-3.3 % of total soil Cu for Fe-deficient and Fe-sufficient plants, respectively. Copper uptake from soil was thus up to 3-fold larger in Fe-deficient plants than in Fe-sufficient plants.



**Figure 2** Amount of Cu accumulated in shoots (a), roots (b) and whole plants (c) expressed as μg per 2 plants as a function of Cu concentration in nutrient solution (μM) in hydroponic experiment. Dark circles stand for Fe-sufficient plants and open circles stand for Fe-deficient plants. The error bars are standard deviations.



**Figure 3** Amount of Cu accumulated in shoots (grey) and roots (dark grey) expressed as  $\mu\text{g}$  per 2 plants in plants grown in contact with two soils differing in Cu concentration (145 and 398  $\text{mg Cu kg}^{-1}$ ) under Fe deficiency ( $-\text{Fe}$ ) and Fe-sufficiency ( $+\text{Fe}$ ) in soil experiment. Percentages of Cu extracted from soil by plants are deduced by dividing the amount of Cu accumulated by entire plants by the amount of Cu in soil. Asterisk indicates that amount of Cu accumulated in whole plants differed significantly ( $P < 0.05$ ) between Fe-deficient and Fe-sufficient plants as measured by a Tukey HSD test. The error bars are standard deviations.

### Copper complexing capacity of root exudates

At the end of the first stage, the estimated root-induced release of complexing compounds was weakly but significantly larger in Fe-deficient plants than in Fe-sufficient plants (Table 4). Across all Cu treatments, there was generally no significant difference of release between Fe-deficient and Fe-sufficient plants and no significant effect of Cu concentration. The estimated root release of complexing compounds was much greater in soil-grown plants than in hydroponically-grown plants (and first stage plants). At the end of soil experiment, the root-induced release of complexing compounds was not significantly increased in response to Fe deficiency.

**Table 4** Estimated root release of complexing compounds expressed as  $\mu\text{mol Cu}$  mobilised per gram of root dry matter in first stage plants, hydroponic experiment and soil experiment (mean value  $\pm$  standard deviation of five replicates). In hydroponic experiment, Cu concentration (Cu) in nutrient solution (1 – 60) is in  $\mu\text{M}$ ; in soil experiment, soil Cu concentration (145 and 398) is in  $\text{mg Cu kg}^{-1}$ . For both experiments (hydroponic and soil) separately, mean values with different letters within a column are significantly different ( $P < 0.05$ ) as measured by a Tukey HSD test. Asterisk indicates that estimated root release of complexing compounds differed significantly ( $P < 0.05$ ) between Fe-deficient ( $-\text{Fe}$ ) and Fe-sufficient ( $+\text{Fe}$ ) plants as measured by a Tukey HSD test.

	Cu	complexing compounds release $\mu\text{mol g}^{-1}$ DM	
		$-\text{Fe}$	$+\text{Fe}$
first stage		$0.72 \pm 0.18^*$	$0.47 \pm 0.10$
hydroponic	1	$0.64 \pm 0.35$ a	$0.63 \pm 0.34$ ab
	5	$0.16 \pm 0.06$ a	$0.26 \pm 0.19$ ab
	10	$0.53 \pm 0.31^*$ a	$1.29 \pm 1.06$ b
	20	$0.21 \pm 0.07$ a	$0.66 \pm 0.60$ ab
	30	$0.39 \pm 0.29$ a	$0.22 \pm 0.10$ a
	60	$0.49 \pm 0.28^*$ a	$1.03 \pm 0.39$ ab
soil	145	$1.19 \pm 0.43$ a	$1.48 \pm 0.56$ a
	398	$2.03 \pm 0.69$ b	$1.64 \pm 0.39$ a

## Root elongation

Total root elongation was not significantly altered by increasing Cu concentration in nutrient solution, while root elongation of some root diameter classes (0.4-0.8 mm, 1.2-1.6 mm, larger than 1.6 mm) decreased significantly, particularly for Fe-sufficient plants (Table 5). For instance, for roots with a diameter larger than 1.6 mm, root elongation decreased significantly with increasing Cu concentration from 12-15 to 2-0 cm in Fe-sufficient plants and Fe-deficient. No significant difference of root elongation was observed between the two Fe treatments.

**Table 5** Root elongation of the root system and as a function of the root diameter expressed as cm per 8 days of growth per 2 plants in hydroponic experiment (mean value  $\pm$  standard deviation of five replicates). Copper concentration (Cu) in nutrient solution (1 – 60) is in  $\mu\text{M}$ . Mean values with different letters within a column are significantly different ( $P < 0.05$ ) as measured by a Tukey HSD test. Mean values of Fe-sufficient (+Fe) and Fe-deficient (–Fe) treatments with asterisk are significantly different (at  $P < 0.05$ ) as measured by a Tukey HSD test.

Cu	Root elongation cm		function of root diameter (mm)				
	root system						
		0.0 – 0.4	0.4 – 0.8	0.8 – 1.2	1.2 – 1.6	> 1.6	
–Fe	1	2908 $\pm$ 2772 a	1740 $\pm$ 2002 a	843 $\pm$ 605 a	249 $\pm$ 172 a	53 $\pm$ 34 a	15 $\pm$ 12 b
	5	3492 $\pm$ 1973 a	2346 $\pm$ 1745 a	887 $\pm$ 183 a	226 $\pm$ 98 a	22 $\pm$ 16 a	2 $\pm$ 3 a
	10	2688 $\pm$ 1508 a	1892 $\pm$ 1082 a	595 $\pm$ 324 a	171 $\pm$ 117 a	21 $\pm$ 21 a	4 $\pm$ 5 ab
	20	2857 $\pm$ 391 a	1895 $\pm$ 421 a	727 $\pm$ 215 a	210 $\pm$ 97 a	20 $\pm$ 12 a	4 $\pm$ 3 ab
	30	2591 $\pm$ 1169 a	1857 $\pm$ 948 a	508 $\pm$ 167* a	196 $\pm$ 77 a	22 $\pm$ 7* a	2 $\pm$ 2 a
	60	2111 $\pm$ 1226 a	1532 $\pm$ 957 a	397 $\pm$ 241 a	161 $\pm$ 70 a	17 $\pm$ 14 a	0 $\pm$ 3 a
+Fe	1	2252 $\pm$ 833 a	1179 $\pm$ 698 a	824 $\pm$ 131 b	184 $\pm$ 50 ab	51 $\pm$ 15 b	12 $\pm$ 7 b
	5	2766 $\pm$ 925 a	1660 $\pm$ 683 a	889 $\pm$ 260 b	173 $\pm$ 78 ab	34 $\pm$ 21 ab	8 $\pm$ 6 ab
	10	2104 $\pm$ 962 a	1376 $\pm$ 931 a	581 $\pm$ 88 ab	132 $\pm$ 31 a	12 $\pm$ 11 a	1 $\pm$ 2 a
	20	3170 $\pm$ 521 a	2318 $\pm$ 394 a	681 $\pm$ 136 ab	147 $\pm$ 48 a	15 $\pm$ 11 a	5 $\pm$ 5 ab
	30	2842 $\pm$ 1020 a	1745 $\pm$ 944 a	782 $\pm$ 146 ab	264 $\pm$ 49 b	39 $\pm$ 11 ab	5 $\pm$ 4 ab
	60	1813 $\pm$ 807 a	1204 $\pm$ 586 a	467 $\pm$ 154 a	123 $\pm$ 67 a	14 $\pm$ 15 a	2 $\pm$ 3 a

#### IV.1.4. Discussion

##### Cu uptake and phytotoxicity

Hydroponic experiment was carried out to study how Cu uptake and phytotoxicity were affected by Fe deficiency, while soil experiment was carried out to investigate how soil Cu bioavailability was affected by Fe deficiency in durum wheat.

In hydroponic experiment, Cu concentration in roots varied over a broader range of values with increasing Cu concentration and was always much larger than Cu concentration in shoots (Table 2). In this experiment, the proportion of Cu actually absorbed by roots, i.e. symplasmic Cu, represented about the quarter of the total Cu concentration in roots whatever the Cu concentration in nutrient solution (Table 2). In soil experiment, it represented up to 50% of the total Cu concentration in roots (Fig. 1). This suggests that the major part of Cu concentration in roots was adsorbed onto root cell walls as formerly shown in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) (Chaignon et al. 2002). The amount of Cu accumulated in roots varied also more than in shoots in both hydroponic experiment (Fig. 2) and soil experiment (Fig. 3). In addition, the shoot/root ratios of Cu concentration in plant parts decreased significantly with increasing Cu concentration in hydroponic experiment (Table 2). These results suggest that plants were capable to efficiently restrict Cu translocation towards their shoots, probably as a consequence of adsorption of Cu onto root cell walls as shown by the weak percentage of symplasmic Cu concentration in roots and the decrease in the shoot/root ratios of Cu concentration with increasing Cu concentration. Our results are in agreement with previous studies which reported that Cu was preferentially accumulated in roots and that Cu translocation to shoots was restricted (McBride 2001; Brun et al. 2001; Chaignon et al. 2003), largely because of Cu immobilization onto root cell walls (Marschner 1995; Chaignon et al. 2002). This process seems however less efficient in plants grown in the soil experiment which also exhibited much greater root-induced release of complexing compounds (Table 4). If these were phytosiderophores, we may hypothesize that they resulted in greater uptake of Cu.

Several studies have reported that Cu phytotoxicity induced Fe deficiency and Fe chlorosis symptoms such as interveinal chlorosis (Lexmond and Van der Vorm 1981; Taylor and Foy 1985; Wheeler and Power 1995; Mocquot et al. 1996; McBride 2001) and we have formerly shown this in field-grown durum wheat (Michaud et al. 2007). In hydroponic experiment, the increase in solution Cu concentration delayed the disappearance of Fe chlorosis symptoms in Fe-deficient plants but did not induce Fe chlorosis symptoms, possibly because of the non-limiting availability of Fe in such conditions, which was supplied at 100  $\mu\text{M}$  FeNaEDTA at this stage. While Fe concentration in shoots decreased with increasing solution Cu concentration, particularly in Fe-sufficient plants (Table 3), it did not decrease far below the adequate Fe concentration reported for wheat (100 mg Fe  $\text{kg}^{-1}$  DM) by Reuter and Robinson (1997). In contrast, no such decrease was observed in roots in hydroponic experiment. The decrease in shoot Fe concentration with increasing solution Cu concentration observed in the present study is in agreement with previous results of Lexmond and Van der Vorm (1981), Taylor and Foy (1985) and McBride (2001). Conversely, our results disagreed with those of Ali et al. (2002) who observed an increase in Fe concentration in both roots and shoots. In addition to Fe deficiency symptoms (interveinal chlorosis), Cu phytotoxicity can induce some rhizotoxicity (Ali et al. 2002; Sheldon and Menzies 2005; Koppitke and Menzies 2006). In hydroponic experiment, root dry biomass was not altered by increasing solution Cu concentration (Table 1) suggesting that root dry biomass was not a suitable indicator of Cu phytotoxicity as already stressed for oilseed rape (*Brassica napus* L.) by Chaignon and Hinsinger (2003). In addition, the total root elongation did not significantly decrease with

increasing solution Cu concentration (Table 5). However, the root elongation of some root diameter classes dramatically decreased with increasing solution Cu concentration, particularly for Fe-sufficient plants. This suggests that Cu rhizotoxicity differentially occurred depending on root diameter classes: in Fe-deficient plants, for root diameter between 0.4 and 0.8 mm, root elongation decreased by 50% at 60  $\mu\text{M}$  Cu, while it decreased by 60% at 5  $\mu\text{M}$  for roots between 1.2 and 1.6 mm, and by 85% for coarser roots. In spite of this reduction in root elongation in some root classes in the present work, no marked symptoms of Cu phytotoxicity occurred which was probably due to the short duration (8 days) of exposition of four-week-old wheat plants. While the cropping device employed in the present work is a rapid and simple tool for assessing soil Cu uptake and thereby Cu bioavailability, it suffers several disadvantages which are related to its rather artificial conditions, especially the physical arrangement of the root system. A reduced effect of Cu phytotoxicity on root elongation could have occurred due to this physical arrangement.

### **Cu uptake as affected by Fe deficiency**

To study whether Fe deficiency did alter Cu uptake and Cu bioavailability, durum wheat plants differing in Fe status (deficiency *versus* sufficiency) were exposed to (i) various Cu concentrations in the hydroponic experiment and, (ii) to two Cu-contaminated, calcareous soils in the soil experiment. In the hydroponic experiment, Cu concentration in shoots and roots (Table 2) and amount of Cu accumulated by whole plants, and thus Cu uptake from nutrient solution (Fig. 2) were weakly and not significantly larger in Fe-deficient plants. Conversely, in the soil experiment, Cu concentration in plant parts (Fig. 1) and amount of Cu accumulated in whole plants and thus Cu bioavailability from Cu-contaminated, calcareous soils (Fig. 3) were significantly larger in Fe-deficient plants compared with Fe-sufficient plants. The short duration of the experiments (8 d) may have induced a dilution of Cu taken up during the hydroponic and soil experiments in the already large biomass of four-week-old wheat plants. This may have alleviated the actual effect of Fe deficiency. In addition, it is assumed that the form of Cu which is preferentially taken up is the free ion species (Adriano 2001), although, as for Fe and Zn, Cu complexed with phytosiderophores might be taken up by cereals (Roberts et al. 2004; Schaaf et al. 2004; Xuan et al. 2006). It should be stressed that in hydroponic experiment, whatever the treatment, plants were supplied with 100  $\mu\text{M}$  FeNaEDTA to avoid difference in free ion species concentration which would have occurred if plants had been supplied with 2 and 100  $\mu\text{M}$  FeNaEDTA and could have led to increased Cu uptake under Fe deficiency due to larger free ion species concentration. The supply of 100  $\mu\text{M}$  FeNaEDTA which is usually considered as adequate for hydroponically-grown plants (Römheld and Marschner 1990; Chaignon et al. 2002) may thus have masked the effect of Fe deficiency on Cu uptake, and possibly on Cu phytotoxicity, due to adequate Fe uptake in Fe-deficient plants. Indeed there was no significant effect of Fe supply on Fe concentrations in shoots at the end of the hydroponic experiment (Table 3). In contrast, Table 3 shows that there was a significant effect of Fe supply at first stage on the Fe concentration in shoots of durum wheat grown in the soil experiment. Due to the low availability of soil Fe in such calcareous soils, Fe-deficient plants obviously did not manage to recover enough Fe to meet their demand, as did the plants grown in the hydroponic experiment. This is shown by their shoot Fe concentrations which remained far below those required (100 mg Fe  $\text{kg}^{-1}$  DM) for adequate growth of durum wheat (Reuter and Robinson 1997).

At the end of the first stage, Fe-deficient plants which were chlorotic secreted significantly larger amounts of complexing compounds by roots than Fe-sufficient plants (Table 4). In addition, such initial increased root secretion of complexing compounds under Fe deficiency



was related to enhanced Cu uptake from soil. The indirect method employed in the present work for estimating the complexing capacity of root exudates has been previously used to quantify indirectly phytosiderophore secretion (Treeby et al. 1989; Chaignon et al. 2002). As Gramineous species are known to secrete larger amounts of phytosiderophores in response to Fe deficiency (Römheld 1987), initial increased secretion of complexing compounds in Fe-deficient plants compared to Fe-sufficient plants might be partly due to increased phytosiderophore secretion. Larger soil Cu bioavailability under Fe deficiency may thus possibly occur as a consequence of enhanced phytosiderophore secretion at the end of the first stage in response to Fe deficiency, as suggested for bread wheat by Chaignon et al. (2002). Nevertheless, as stressed recently by Reichman and Parker (2007b), the method employed to estimate the complexing capacity of root exudates has several drawbacks because it is not specific for phytosiderophores which means that other complexing compounds (e.g. organic and phenolic acids, amino acids) may also have contributed to Cu mobilization from the Cu-loaded resin. In soil experiment, the estimated root-induced release of complexing compounds tended to increase, compared with results found at the end of the first stage and hydroponic experiment, without significant difference between the two Fe treatments (Table 4). This might be the results of enhanced phytosiderophore secretion due to the restricted availability of Fe in those two calcareous soils as stressed above according to the low Fe concentrations found in shoots of durum wheat grown in the soil experiment (Table 3). This could however also result from enhanced concentration of complexing compounds such as (i) other root exudates than phytosiderophores and (ii) microbial siderophores. In addition, as mentioned by Reichman and Parker (2007b), the values obtained by this indirect method cannot be viewed as absolute concentrations and phytosiderophore secretion might have been thereby largely underestimated. Further experiments are thus needed to clarify the putative implication of phytosiderophore secretion in increased Cu uptake from soil. Actually, direct estimation of phytosiderophores in root exudates by chromatography would help to clarify whether phytosiderophore secretion was really implied in increased Cu bioavailability under Fe deficiency as observed in the present study.

Chaignon et al. (2002) studied Cu uptake in bread wheat as affected by Fe deficiency with the same cropping device and one of the present Cu-contaminated, calcareous soil used in the present experiment ( $145 \text{ mg Cu kg}^{-1}$ ). They observed that Cu uptake in bread wheat was about 3- to 4-fold larger under Fe deficiency, depending on bread wheat genotypes. In the present study, Cu uptake in durum wheat was only 1.7-fold larger under Fe deficiency with the soil containing  $145 \text{ mg Cu kg}^{-1}$  (Fig. 3). In addition, Chaignon et al. (2002) observed larger Cu extraction from soil by bread wheat than we found for durum wheat. Indeed, bread wheat extracted 4-6% of total soil Cu in Fe-sufficient plants and up to 17-19% in Fe-deficient plants, while durum wheat in the present work, extracted 3.3% of total soil Cu in Fe-sufficient and 5.6% in Fe-deficient plants. This suggests that durum wheat extracted lower amount of Cu from soil in the present study than bread wheat did for the same soil (Chaignon et al. 2002). Previous studies reported that durum wheat was more sensitive to both Fe and Zn deficiency than other cereals including bread wheat (Cakmak et al. 1997; Rengel and Römheld 2000a, b). Rengel and Römheld (2000b) showed that it was related to lesser secretion of phytosiderophores by durum wheat compared with other cereal species. If enhanced phytosiderophore secretion was actually implied in increased Cu uptake under Fe deficiency, fewer amounts of phytosiderophores secreted by durum wheat compared with bread wheat, could explain why durum wheat extracted lower amount of Cu from the soil in the present study, compared with bread wheat (Chaignon et al. 2002). Again, this should be assessed with a more specific and quantitative assay than the one we used in the present work. Cornu et al. (2007) found that Fe deficiency was related to increased Cu bioavailability in

acidic soils for tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) which is a strategy I plant, but not in calcareous soils: in the latter, which were the same as used in the present experiment, tomato extracted only about 1% of total soil Cu, which is much less than durum wheat. Former studies showed that Strategy I plants were more pH-dependent and less efficient in Fe acquisition than Strategy II plants in calcareous soils (Marschner et al. 1986; Römheld 1987). We previously observed in field-grown plants that Cu phytotoxicity as evidenced by interveinal chlorosis occurred when durum wheat was cropped in Cu-contaminated, calcareous soils but not in non calcareous soils (Michaud et al. 2007). In such soils, Braun (personal communication) observed such symptoms mostly in cereals such as durum wheat and maize and not in dicots such as oilseed rape or sunflower (*Helianthus annuus* L.). In calcareous soils which are prone to induce Fe deficiency, larger Fe acquisition efficiency of cereals compared to strategy I plants might thus result in larger Cu bioavailability as observed in the present study for durum wheat under Fe deficiency compared to tomato (Cornu et al. 2007) and thus in larger risks of Cu phytotoxicity.

In conclusion, our results revealed for the two investigated Cu-contaminated, calcareous soils that soil Cu bioavailability was significantly enhanced under Fe deficiency in durum wheat, while in hydroponically-grown plants Cu uptake and Cu phytotoxicity were not significantly increased under Fe deficiency. In addition, significant increase in Cu bioavailability may have resulted from the enhanced root-induced release of complexing compounds in Fe-deficient plants at the end of the first stage of the experiment. This showed that Fe deficiency and resulting increased root-induced release of complexing compounds, presumably phytosiderophores, may lead to increased Cu bioavailability in durum wheat when grown in Cu-contaminated, calcareous soils. This work suggested that Fe deficiency and strategy II mechanisms might be implied in increased Cu bioavailability for durum wheat as we observed *in situ* for field-grown plants in Cu-contaminated, former vineyard calcareous soils (Michaud et al. 2007). Further experiments are needed to study more precisely those mechanisms which are implied in Cu uptake and phytotoxicity in durum wheat, particularly the actual role of phytosiderophores.

#### **IV.1.5. Acknowledgments**

We thank Didier Arnal, Jean-Louis Aznar, Nicole Balsera, Michaël Clairotte and Amandine Tasseli for technical help. We also thank Jean-François Briat, Michel Mench and Erik Smolders for their helpful suggestions to improve this manuscript.

#### **IV.1.6. References**

- Adriano DC 2001 Copper. In Trace elements in terrestrial environment, biogeochemistry, bioavailability, and risks of metal. 2nd Edition, pp 499–546
- Ali N A, Ater M, Sunahara G I and Robidoux PY 2004 Phytotoxicity and bioaccumulation of copper and chromium using barley (*Hordeum vulgare* L.) in spiked artificial and natural forest soils. *Ecotox. Environ. Safety* 57, 363–374
- Ali NA, Bernal MP and Ater M 2002 Tolerance and bioaccumulation of copper in *Phragmites australis* and *Zea mays*. *Plant Soil* 239, 103–111
- Braun P 2006 Diagnostic des accidents du blé dur. ARVALIS - Institut du végétal, Paris
- Brun LA, Maillet J, Hinsinger P and Pépin M 2001 Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils. *Environ. Pollut.* 111, 293–302

- Cakmak I, Ekiz H, Yilmaz A, Torun B, Köleti N, Gültekin I, Alkan A and Eker S 1997 Differential response of rye, triticale, bread and durum wheats to zinc deficiency in calcareous soils. *Plant Soil* 188, 1–10
- Chaignon V, Di Malta D and Hinsinger P 2002 Fe-deficiency increases Cu acquisition by wheat cropped in a Cu-contaminated vineyard soil. *New Phytol.* 154, 121–130
- Chaignon V and Hinsinger P 2003 A biotest for evaluating copper bioavailability to plants in a contaminated soil. *J. Environ. Qual.* 32, 824–833
- Chaignon V, Sanchez-Neira I, Herrmann P, Jaillard B and Hinsinger P 2003 Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. *Environ. Pollut.* 123, 229–238
- Cornu JY, Staunton S and Hinsinger P 2007 Copper concentration in plants and in the rhizosphere as influenced by the iron status of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Plant Soil* 292, 63–77
- Curie C, Panaviene Z, Loulergue C, Dellaporta SL, Briat JF and Walker EL 2001 Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* 409, 346–349
- Davis RD and Beckett PHT 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
- Harmsen J, Rulken W and Eijsackers H 2005 Bioavailability, concept for understanding or tool for predicting? *Land Contam. Reclam.* 13, 161–171
- Kopittke PM and Menzies NW 2006 Effect of Cu toxicity on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant Soil* 279, 287–296
- Lexmond TM and Van der Vorm PDJ 1981 The effect of pH on copper toxicity to hydroponically grown maize. *Neth. J. Agr. Sci.* 29, 217–238
- Lindsay WL 1979 *Chemical equilibria in soils*. John Wiley and Sons, 449 p
- Marschner H, Römheld V and Kissel M 1986 Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *J. Plant Nutr.* 9, 695–713
- Marschner H, Treeby M and Römheld V 1989 Role of root-induced changes in the rhizosphere for iron acquisition in higher plants. *Z. Pflanz. Bodenkunde* 152, 197–204
- Marschner H 1995 *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2nd edn. London, UK, Academic Press
- Michaud AM, Bravin MN, Galleguillos M and Hinsinger P 2007 Copper uptake and phytotoxicity as assessed in situ for durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cultivated in Cu-contaminated, former vineyard soils. *Plant Soil* 298, 99–111
- McBride M B 2001 Cupric ion activity in peat soil as a toxicity indicator for maize. *J. Environ. Qual.* 30, 78–84
- Mocquot B, Vangronsveld J, Clijsters H and Mench M 1996 Copper toxicity in young maize (*Zea mays* L) plants, Effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and enzyme activities. *Plant Soil* 182, 287–300
- Murata Y, Ma JF, Yamaji N, Ueno D, Nomoto K and Iwashita T 2006 A specific transporter for iron(III)-phytosiderophore in barley roots. *Plant J.* 46, 563–572
- Murakami T, Ise K, Hayakawa M, Kamei S and Takagi S 1989 Stabilities of metal complexes of mugineic acids and their specific affinities for iron (III). *Chem. Lett.* 2137–2140
- Parker DR, Chaney R L and Norvell WA 1995 Chemical equilibrium models, applications to plant nutrition research. In *Chemical equilibrium and reaction models*. Soil Science Society of America Special Publication No. 42. Madison, WI. Eds. Loeppert RH, Schwab AP and Goldberg S. pp 163–200
- Reichman SM and Parker DR 2005 Metal complexation by phytosiderophores in the rhizosphere. In *Biogeochemistry of trace elements in the rhizosphere*. Eds. Huang PM and Gobran GR. pp 129–156. Elsevier

- Reichman SM and Parker DR 2007a Probing the effect of light and temperature on diurnal rhythms of phytosiderophore release in wheat. *New Phytol.* 174, 101–108
- Reichman SM and Parker DR 2007b Critical evaluation of three indirect assays for quantifying phytosiderophores released by the roots of *Poaceae*. *Eur. J. Soil Sci.* 58, 844–853
- Rengel Z and Römheld V 2000a Differential tolerance to Fe and Zn deficiencies in wheat germplasm. *Euphytica* 113, 219–225
- Rengel Z and Römheld V 2000b Root exudation and Fe uptake and transport in wheat genotypes differing in tolerance to Zn deficiency. *Plant Soil* 222, 25–34
- Reuter DJ and Robinson JB 1997 *Plant Analysis: an Interpretation Manual*. CSIRO publishing, Australia. 572 p
- Robin A, Vansuyt G, Hinsinger P, Meyer JM, Briat JF and Lemanceau P 2008. Iron dynamics in the rhizosphere: consequences for plant health and nutrition. *Adv. Agron.* (submitted)
- Roberts LA, Pierson AJ, Panaviene Z and Walker EL 2004 Yellow stripe1. Expanded roles for the maize iron-phytosiderophore transporter. *Plant Physiol.* 135, 112–120
- Römheld V and Awad F 2000 Significance of root exudates in acquisition of heavy metals from a contaminated calcareous soil by graminaceous species. *J. Plant Nutr.* 23, 1857–1866
- Römheld V and Marschner H 1990 Genotypical differences among graminaceous species in release of phytosiderophores and uptake of iron phytosiderophores. *Plant Soil* 123, 147–153
- Römheld V 1987 Different strategies for iron acquisition in higher plants. *Physiol. Plantarum* 70, 231–234
- Schaaf G, Erenoglu BE and VonWirén N 2004 Physiological and biochemical characterization of metal-phytosiderophore transport in graminaceous species. *Soil Sci. Plant Nutr.* 50, 989–995
- Sheldon AR and Menzies NW 2005 The effect of copper toxicity on the growth and root morphology of Rhodes grass (*Chloris gayana* Knuth.) in resin buffered solution culture. *Plant Soil* 278, 341–349
- Takagi SI, Nomoto K and Takemoto T (1984) Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plants. *J Plant Nut* 7, 469–477
- Taylor GJ and Foy CD 1985 Differential uptake and toxicity of ionic and chelated copper in *Triticum aestivum*. *Can. J. Botany* 63, 1271–1275
- Treeby M, Marschner H and Römheld V 1989 Mobilization of iron and other micronutrient cations from a calcareous soil by plant-borne, microbial, and synthetic metal chelators. *Plant Soil* 114, 217–226
- Wheeler DM and Power IL 1995 Comparison of plant uptake and plant toxicity of various ions in wheat. *Plant Soil* 172, 167–173
- Xuan Y, Scheuermann EB, Meda AR, Hayen H, von Wirén N and Weber G 2006 Separation and identification of phytosiderophores and their metal complexes in plants by zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatography* 1136, 73–81

**Cu bioavailability in a range of Cu-contaminated, neutral to alkaline soils as related to root-induced chemical changes in the rhizosphere of durum wheat**

A M Michaud and P Hinsinger

INRA – SupAgro, UMR 1222 Biogéochimie du Sol et de la Rhizosphère, Place Viala, 34060 Montpellier cedex 1, France

Corresponding author:

Philippe Hinsinger

Tel: +33 4 99 61 22 49

Fax: +33 4 99 61 30 88

Email: philippe.hinsinger@supagro.inra.fr

*Capsule*

Cu bioavailability and changes of Cu extractability in the rhizosphere

## Abstract

This work assessed Cu bioavailability for durum wheat cropped in 22 Cu-contaminated, neutral to alkaline soils (pH 6.8 – 8.5 and total Cu content 43 – 1030 mg kg<sup>-1</sup>) under contrasting Fe status (deficiency *versus* sufficiency) and the related root-induced chemical changes in the rhizosphere. Copper bioavailability increased significantly with increasing soil Cu content. The flux of Cu acquisition was significantly enhanced as a response to Fe-deficiency. EDTA-extractable Cu and total soil Cu content occurred as reasonable indicators of Cu bioavailability for durum wheat in the range of investigated soils. Copper bioavailability was related to root-induced changes of Cu extractability in the rhizosphere (K-pyrophosphate- and water-extractable Cu), which was not linked to changes in pH and DOC. This work suggests that plant Cu acquisition may occur at the expense of Cu bound to organic matter and dissolved Cu in soil solution with the putative implication of root-induced release of complexing compounds (i.e. phytosiderophores).

## Keywords

Bioavailability, copper, extractability, iron, iron deficiency, rhizosphere

## IV.2.1. Introduction

Harmsen et al. (2005) defined the bioavailability as 'the uptake (resulting in accumulation or an effect) of a component by a specific organism during a fixed period of time from the unit mass of soil involved'. Bioavailability of trace elements such as copper (Cu) depends on soil chemical properties (e.g. pH, organic matter and content in soil) that govern their solid phase speciation and their chemical mobility (Rieuwerts et al., 1998). It is assumed that plants are only sensitive to free cupric ( $\text{Cu}^{2+}$ ) ions in soil solution, so that it is often considered that Cu bioavailability should decrease with increasing pH due to the steep decrease in soil solution concentration of  $\text{Cu}^{2+}$  ions at the expense of organically-bound complex species with increasing pH (Sauvé et al., 1997). Former studies showed that Cu bioavailability for rape and tomato was indeed larger in acidic soils than in calcareous soils (Chaignon et al., 2002a, 2003; Cornu et al., 2007). Conversely, other studies underlined that Cu may be more bioavailable and phytotoxic at higher pH (Lexmond and Van der Vorm, 1981; Zhao et al., 2006). It has been recently observed *in situ* that Cu phytotoxicity occurred in Cu-contaminated, calcareous soils due to an antagonism with iron (Fe) in durum wheat (Michaud et al., 2007). We also showed for this cereal that Cu bioavailability was not larger in acidic (including very acidic) soils than neutral to alkaline soils (Michaud et al., 2007), conversely to the abovementioned species. This raises the question of the actual Cu bioavailability for cereals in Cu-contaminated, neutral to alkaline soils. This issue is especially relevant to former vineyards which had been contaminated by the long term field application of copper fungicides and where vines are being replaced by other crops including cereals, as extensively occurred (>80,000 ha) in the region of Languedoc-Roussillon in Southern France over the last decades.

As stressed by Harmsen et al. (2005), whatever the target organism, a bio-influenced zone can be defined in its immediate environment in which the availability, and ultimately the bioavailability of contaminants can be modified. For plants, this bio-influenced zone corresponds to the rhizosphere which is defined as the soil volume that is influenced by root activities (Hinsinger et al., 2005). Among root-induced physical and chemical processes occurring in the rhizosphere, pH alteration and exudation of complexing compounds are known to modify trace element speciation and their chemical mobility, thus their bioavailability (McLaughlin et al., 1998; Hinsinger et al., 2005; Hinsinger and Courchesne, 2008). In the special case of Gramineous species, increased root secretion of phytosiderophores in response to Fe-deficiency has been related to increased Cu bioavailability for bread wheat in a Cu-contaminated, calcareous soil (Chaignon et al., 2002b). In contrast, for tomato which does not secrete phytosiderophores, Cornu et al. (2007) observed that Cu bioavailability was increased under Fe-deficiency in acidic soils but not in calcareous soils. This raises the question of the root-induced chemical changes occurring in the rhizosphere, notably under Fe-deficiency, which may be related to increased Cu bioavailability for Gramineous species (e.g. durum wheat) cropped in Cu-contaminated, former vineyard calcareous soils.

The aim of the present work was thus to study (i) Cu bioavailability for durum wheat cropped in a range of 22 Cu-contaminated, neutral to alkaline soils and for 3 calcareous soils under contrasting Fe status (deficiency *versus* sufficiency) and (ii) the related root-induced chemical changes in the rhizosphere, as assessed in controlled conditions.

## IV.2.2. Materials and methods

### Soils samples

Twenty-two Cu-contaminated topsoil (0-20 cm) samples were collected in former vineyards cropped with durum wheat between March and May 2006 close to Béziers (Southern France). Soil samples comprised 2 neutral, non calcareous soils (samples 16 and 20) and 20 alkaline, calcareous soils (samples 23-42) and covered a large range of total Cu content (43-1030 mg kg<sup>-1</sup>) (Table 1). We had formerly described these soil samples in greater details in order to identify the properties that were related to Cu content in field grown plants which had been simultaneously sampled (Michaud et al., 2007). These were air-dried and sieved at 2 mm prior to being used and analysed.

### Plant growth conditions

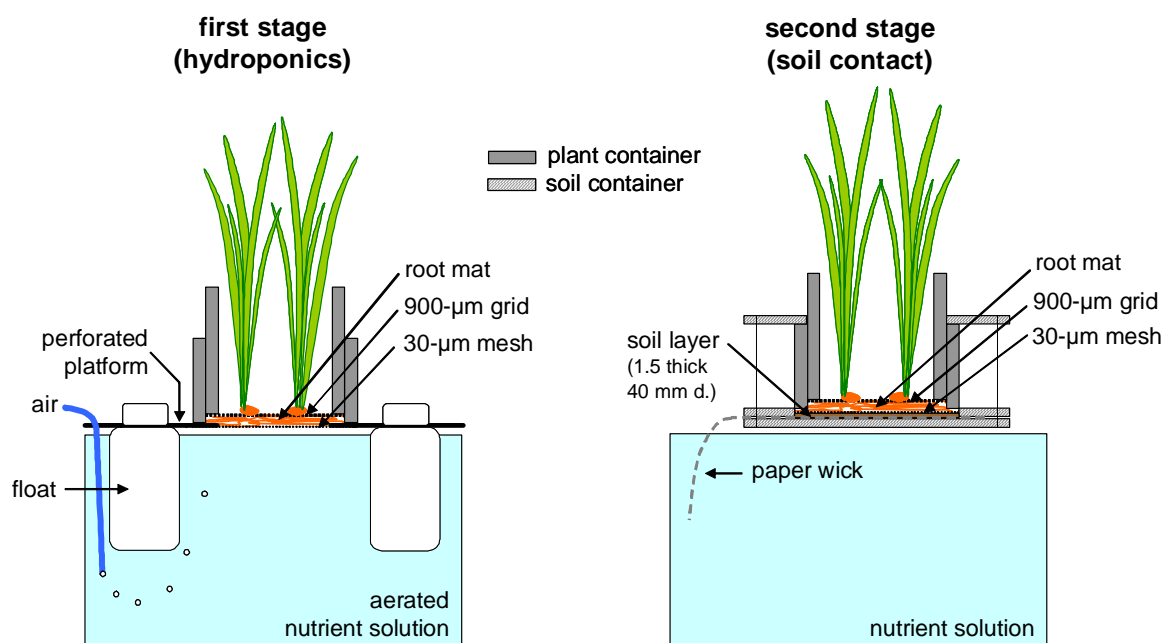
The cropping device used for the present experiment was adapted from the root mat biotest developed by Chaignon and Hinsinger (2003). The major advantage of this technique is that roots are physically separated from the soil (Fig. 1), which enables an easy recovery of shoots, roots, and soil in their vicinity (rhizosphere) after plant growth. In a first stage, durum wheat (*Triticum turgidum durum* L., cv Acalou) plants were cultivated for 3 weeks in hydroponic conditions to obtain a large planar mat of roots. During the first week, plants were supplied with a solution containing 600 µM CaCl<sub>2</sub> and 2 µM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>. During the second week, plants were supplied with a nutrient solution of following composition: 2 mM KNO<sub>3</sub>, 2 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 µM FeNaEDTA, 2 µM MnCl<sub>2</sub>, 10µM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1 µM ZnSO<sub>4</sub>, 0.05 µM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 1 µM CuCl<sub>2</sub>. During the last week, plants were exposed to the same nutrient solution as above but containing either 2 or 100 µM FeNaEDTA, in order to induce contrasting Fe status. At the end of the first stage, five replicates were collected and analysed separately for each Fe treatment. For the second stage, plants were transferred for 8 days onto a small soil disk (1.5 mm thickness, 40 mm diameter, 3 g dry soil) that was connected to nutrient solution by a filter paper wick. Before transfer, soil samples had been incubated for 14 days with the same nutrient solution as above, minus FeNaEDTA and CuCl<sub>2</sub>. Soil Fe and Cu were thus the only sources for the plants. Iron-sufficient plants were cropped in all of the soil samples, while Fe-deficient plants were cropped only in the three most Cu-contaminated soils (26, 28 and 30). For each soil and each Fe treatment, five cropped and five uncropped soil replicates were prepared. The latter were left to incubate in the same conditions as the cropped soils, to serve as controls in order to evaluate root-induced changes occurring in the rhizosphere. At the end of the second stage, all the five replicates were collected and analysed separately. The two stages of the experiment were conducted in a growth chamber with the following day/night conditions: 16 h, 25°C, relative humidity 75% and a photon flux density of about 550 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (in the range 400-700 nm) / 8h, 20°C, relative humidity 100% and darkness.



**Table 1** Selected soil chemical and physical properties. Samples ranked according to total soil Cu content (increasing order).

samples	Extractable Cu mg kg <sup>-1</sup>					pH <sub>water</sub>	CaCO <sub>3</sub> g kg <sup>-1</sup>	organic C g kg <sup>-1</sup>	clay g kg <sup>-1</sup> 0-2 µm	sand 50-2000 µm
	total	EDTA	Kpyr	water	CaCl <sub>2</sub>					
39	43	11	11	0.10	0.02	8.1	6	5.4	292	557
23	55	13	19	0.17	0.08	8.5	113	14.5	266	58
31	59	20	18	0.15	0.08	8.3	25	3.5	205	593
32	70	29	33	0.42	0.18	8.5	278	7.0	133	402
38 <sub>d</sub>	78	34	45	0.70	0.28	8.4	298	8.9	135	415
33	84	37	43	0.61	0.23	8.3	154	13.8	152	475
20	103	60	60	0.73	0.20	7.5	2	12.1	169	682
41	103	37	38	0.35	0.10	8.1	4	7.3	332	475
40	106	33	43	0.38	0.11	8.3	154	8.4	290	356
25 <sub>a</sub>	111	34	39	0.37	0.13	8.3	102	11.3	120	453
37 <sub>d</sub> *	114	49	67	0.58	0.25	8.2	279	8.2	133	454
34	117	51	63	0.61	0.25	8.4	204	11.2	152	421
35	120	62	73	0.67	0.32	8.2	261	14.2	99	429
29 <sub>c</sub>	128	43	47	0.39	0.14	8.4	102	10.4	137	382
16	140	81	75	1.16	0.30	6.8	0	11.9	152	634
24 <sub>+</sub>	146	46	66	0.70	0.27	8.4	47	5.4	94	730
42	147	55	63	0.37	0.17	8.1	75	12.8	207	493
36	150	74	88	0.66	0.36	8.2	207	15.0	118	430
27 <sub>b</sub>	155	57	65	0.48	0.20	8.3	93	11.3	127	426
26 <sub>a</sub> *	163	57	65	0.65	0.23	8.3	94	11.5	108	517
28 <sub>b</sub> *	540	211	262	2.04	0.76	8.3	110	15.9	123	431
30 <sub>c</sub> *	1030	488	621	4.94	1.43	8.2	87	23.6	131	384

Soil Cu (mg kg<sup>-1</sup>) as extracted by HF-HClO<sub>4</sub> (total), Na<sub>2</sub>-EDTA (EDTA), K-pyrophosphate (Kpyr), water (water) and calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>). Samples with identical letter (a-d) were sampled in the same field, while \* indicates those soil samples which yielded Cu phytotoxicity symptoms (interveinal chlorosis) in field-grown durum wheat plants.



**Figure 1** Cropping device used during the first stage of the experiment (hydroponics) and the second stage of the experiment (soil stage) with plants being cropped on the top of a thin soil layer

### Plant analyses

At the end of the first stage of the experiment, intact plants were used before being harvested to collect root exudates. The amount of complexing compounds in root exudates was estimated indirectly by the amount of Cu mobilised from a Cu-loaded resin (Chelite-P, Serva, Heildeberg, Germany) as previously described for indirect quantification of phytosiderophores by several authors (Treeby et al., 1989; Chaignon et al., 2002b). After collection of root exudates, roots and shoots were harvested and weighed. Shoots were oven dried at 105°C and roots were frozen at -20°C. Copper bound to root cell walls was extracted as described by Michaud et al. (2007). After extraction of root apoplasmic Cu, Cu remaining in roots was considered as symplasmic Cu. The remaining portion of untreated roots was also oven dried at 105°C. The dried roots and shoots were digested separately in a microwave oven with hot concentrated HNO<sub>3</sub>. Concentrations of Cu and Fe in the root and shoot digests were determined by Flame Atomic Absorption Spectrometry (Varian SpectrAA-600). Root symplasmic Cu was determined by measuring Cu concentration in digests of roots recovered after extraction of apoplasmic Cu.

### Soil analyses

Five single extractions were performed in parallel for each sample of dry and sieved soil collected from the fields to estimate soil Cu extractability (Table 1). The total soil Cu content was determined by HF-HClO<sub>4</sub> extraction (AFNOR, 1999). The fraction of soil Cu which was potentially available to the plant was determined by using a solution of 0.01 M Na<sub>2</sub>-EDTA (ethylene diaminetetraacetic acid)/ammonium acetate (pH 7) (AFNOR, 1999). In addition, Cu was extracted with 0.1 M K-pyrophosphate (pH 9.5) to estimate Cu bound to organic matter (Planquart et al., 1999), with ultrapure water to assess dissolved Cu in the soil solution (Courchesne et al., 2006) and with 0.01 M CaCl<sub>2</sub> to estimate dissolved and exchangeable Cu (Lebourg et al., 1998). Copper concentration was determined in water and CaCl<sub>2</sub> extracts by

Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (Varian SpectrAA-600) and in other extracts by Flame Atomic Absorption Spectrometry.

The pH, dissolved organic carbon (DOC), water-, CaCl<sub>2</sub>- and K-pyrophosphate-extractable Cu were determined in the cropped and uncropped soil samples from each treatment and replicate which were collected at harvest and oven dried at 35°C. Copper extracted by water, CaCl<sub>2</sub> and K-pyrophosphate were determined as described above. The pH was measured in the CaCl<sub>2</sub> extracts (Michaud et al., 2007) and DOC was determined in water extracts by Total Organic Carbon Analyser (TOC 5000 Shimadzu).

### **Statistical analyses**

Linear regressions and analyses of variance with Tukey HSD test were performed with Statistica® (Statsoft Inc., version 6, Tulsa, OK). In the particular case of pH values, the analysis of variance was achieved on the basis of proton concentrations derived from pH measurements. The data presented in the figures and tables are displayed as average value ± standard deviation (indicated as bars in figures) calculated from the five replicates per treatment.

## **IV.2.3. Results**

### **Plant growth and visual symptoms**

At the end of the first stage, visual symptoms of Fe-deficiency (interveinal chlorosis) were observed in plants supplied with 2 µM Fe (Fe-deficient plants) but not in plants supplied with 100 µM Fe (Fe-sufficient plants). The estimated root-induced release of complexing compounds was weakly but significantly larger ( $P < 0.05$ ) at the end of the first stage in Fe-deficient plants ( $0.93 \mu\text{mol g}^{-1} \text{DM}$ ) compared with Fe-sufficient plants ( $0.66 \mu\text{mol g}^{-1} \text{DM}$ ). At the end of the second stage, Fe-deficient plants still exhibited Fe chlorosis symptoms, while Fe-sufficient plants did not exhibit such symptoms.

At the end of the first stage, shoot dry biomass slightly differed, although significantly ( $P < 0.05$ ) between Fe-deficient and Fe-sufficient plants but not root dry biomass (Table 2). Root and shoot dry biomass increased significantly during the second stage of the experiment. In addition, Fe-deficiency induced a significant decrease (about 1.3- to 1.7-fold) in both root and shoot biomass in plants cropped with each of the three tested soils (26, 28 and 30).

### **Cu and Fe contents**

At the end of the first stage, Fe-deficiency induced a significant increase in shoot and root (total and symplasmic) Cu content (Table 2). In addition, at the end of the second stage, a significant increase in Cu content (about 2-fold larger) of both shoots and roots (total and symplasmic) occurred for Fe-deficient plants (Table 2). At the end of the second stage, plant Cu content, particularly in shoots, slightly decreased relative to the first stage in both Fe-sufficient and Fe-deficient plants, except in plants cropped onto some soil samples, especially the two most Cu-contaminated soil samples (28 and 30). In contrast, root symplasmic Cu content and its percentage rather increased at the end of the experiment, compared with first stage plants. Symplasmic Cu content was largest for the two most contaminated soils (28 and 30) but the proportion of symplasmic Cu was then lower as it had not increased as much as total root Cu.

At the end of the first stage, Fe-deficiency had induced a significant decrease in shoot Fe content but not in root Fe content (Table 2). After the contact with the soil samples, shoot Fe content tended to decrease while root Fe content tended to increase, particularly in Fe-sufficient plants, compared to first stage plants. There was no effect of Fe-deficiency on either root or shoot Fe content, except for soil 28 where Fe content significantly increased in shoots ( $P < 0.05$ ).

### **Cu bioavailability**

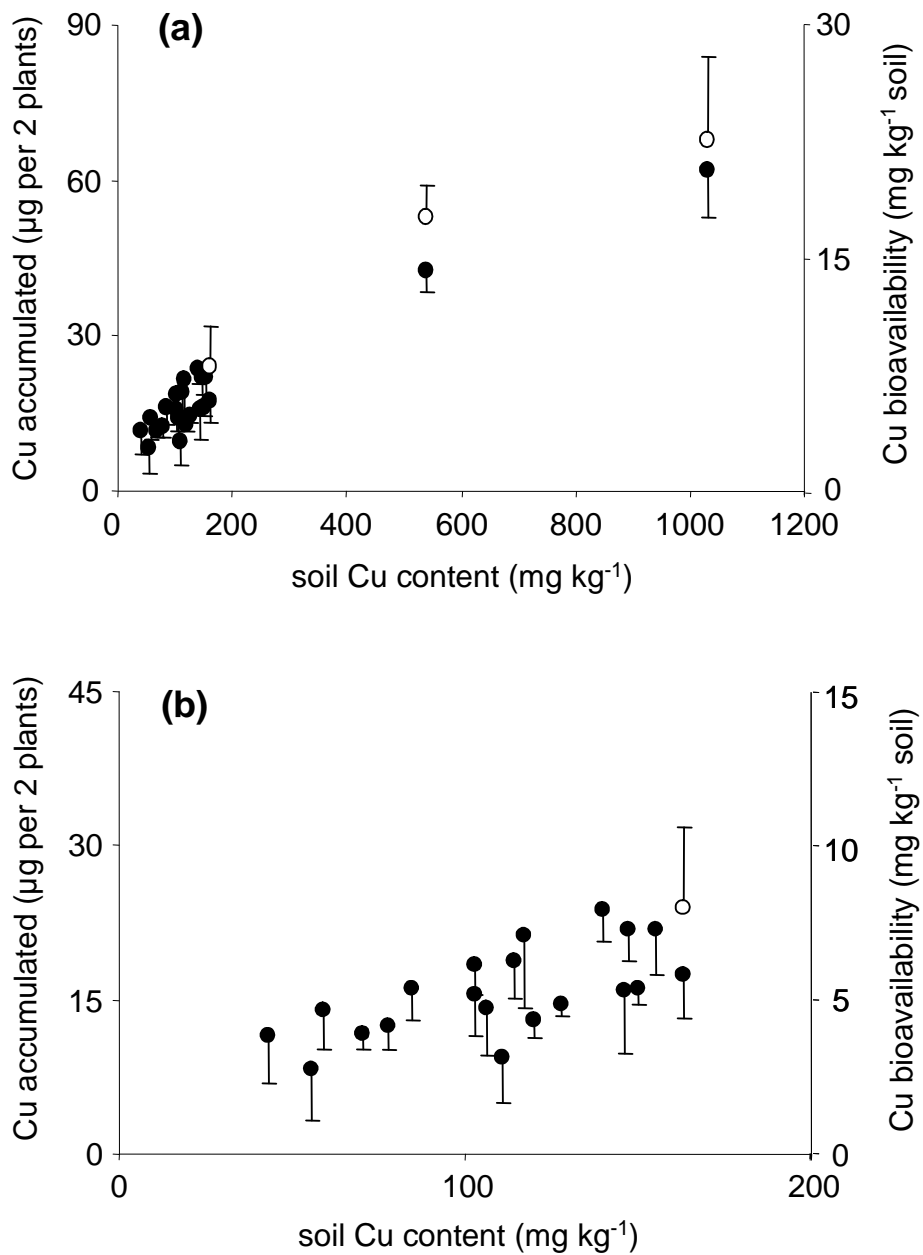
Amounts of Cu accumulated by plants during the second stage of the experiment were calculated by subtracting the initial amount of Cu in plants at the end of the first stage (biomass x Cu content) from the amount of plant Cu at the end of the second stage. Amounts of Cu accumulated in both roots and shoots (Table 2) were positively correlated with soil Cu content ( $r = 0.74$ ,  $P < 0.01$  and,  $r = 0.64$ ,  $P < 0.01$  for roots and shoots, respectively) in Fe-sufficient plants, even when excluding the two most Cu-contaminated soil samples ( $r = 0.65$ ,  $P < 0.01$  and,  $r = 0.52$ ,  $P < 0.05$  for roots and shoots, respectively). Among all soil samples, no significant difference in amount of Cu accumulated in roots and shoots was observed between Fe-deficient and Fe-sufficient plants. Similar results were found when considering the total amount of Cu accumulated in the whole plants by summing up the amounts of Cu in roots and shoots (Fig. 2). This is further shown in Fig. 2 when expressing the amount of Cu in the whole plants relative to the mass of dry soil supplied during the second stage of the experiment, which is an estimate of Cu bioavailability according to the definition provided by Harmsen et al. (2005). Defined as such, Cu bioavailability was positively correlated to total soil Cu content ( $r = 0.75$ ,  $P < 0.01$ ) (Fig. 2a), even when excluding the two most Cu-contaminated soil samples (28 and 30) ( $r = 0.66$ ,  $P < 0.01$ ) in Fe-sufficient plants (Fig. 2b). Copper bioavailability did not significantly increase in Fe-deficient plants ( $P < 0.05$ ) compared with Fe-sufficient plants cropped in the soils 26, 28 and 30.

As Fe-deficiency resulted in a significant decrease in root biomass (Table 2), we also expressed the flux of Cu acquisition based on the amount of Cu accumulated in whole plants during the second stage of the experiment relative to the root dry biomass in order to better assess the actual effect of Fe-deficiency (Fig. 3). This flux of Cu acquisition significantly and largely increased (up to 2.1-fold) in Fe-deficient plants ( $P < 0.01$ ) compared with Fe-sufficient plants cropped in soils 26, 28 and 30. In addition, it was positively correlated to soil Cu content ( $r = 0.74$ ,  $P < 0.01$ ) (Fig. 3a), even when excluding the two most Cu-contaminated soil samples (28 and 30) ( $r = 0.66$ ,  $P < 0.01$ ) in Fe-sufficient plants (Fig. 3b).

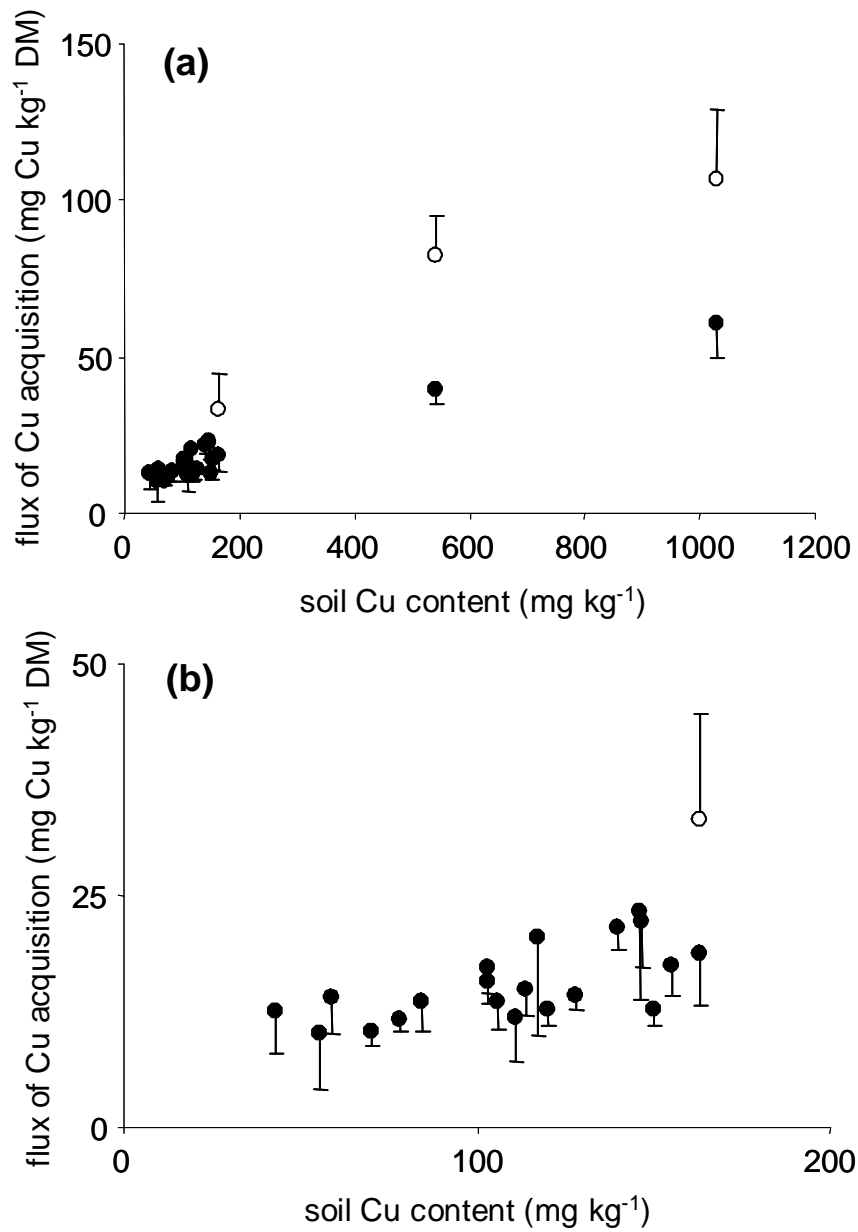
**Table 2** Shoot and root biomass (g), Cu and Fe content ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) and amounts of Cu accumulated ( $\mu\text{g}$ ) in Fe-sufficient (+Fe) and Fe-deficient (-Fe) plants (mean values  $\pm$  standard deviation of five replicates). Percentage of symplasmic Cu content in roots is indicated in brackets. Samples ranked according to total soil Cu content (increasing order).

	samples	dry biomass		Cu content			Fe content		Cu accumulated	
		g	g	$\text{mg kg}^{-1}$	$\text{mg kg}^{-1}$	$\text{mg kg}^{-1}$	$\text{mg kg}^{-1}$	$\text{mg kg}^{-1}$	$\mu\text{g}$	$\mu\text{g}$
		shoots	roots	shoots	roots (total)	roots (symplasmic)	shoots	roots	shoots	roots
+Fe	1 <sup>st</sup> stage	0.6 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	7.6 $\pm$ 1.0	15.3 $\pm$ 3.9	5.8 $\pm$ 1.5 (38)	80 $\pm$ 17	538 $\pm$ 142		
-Fe	1 <sup>st</sup> stage	0.5 $\pm$ 0.0*	0.2 $\pm$ 0.0	12.4 $\pm$ 1.9*	59.0 $\pm$ 31.8*	16.9 $\pm$ 6.6* (29)	51 $\pm$ 8*	396 $\pm$ 104		
+Fe	39	1.4 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	5.5 $\pm$ 1.5	13.1 $\pm$ 2.9	5.6 $\pm$ 1.7 (43)	79 $\pm$ 63	2108 $\pm$ 67	3.1 $\pm$ 1.9	8.4 $\pm$ 3.2
	23	1.3 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.2	5.6 $\pm$ 1.1	11.3 $\pm$ 4.8	5.0 $\pm$ 4.5 (44)	43 $\pm$ 6	1631 $\pm$ 1112	2.7 $\pm$ 1.3	5.5 $\pm$ 3.7
	31	1.4 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.2	6.0 $\pm$ 0.7	13.8 $\pm$ 3.1	5.8 $\pm$ 1.1 (42)	38 $\pm$ 3	1389 $\pm$ 119	3.9 $\pm$ 1.2	10.0 $\pm$ 2.7
	32	1.6 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.1	5.2 $\pm$ 0.9	10.2 $\pm$ 0.8	4.5 $\pm$ 0.6 (44)	35 $\pm$ 8	581 $\pm$ 96	3.7 $\pm$ 0.9	8.0 $\pm$ 0.9
	38	1.5 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.2	5.7 $\pm$ 0.5	11.4 $\pm$ 1.0	5.9 $\pm$ 1.3 (52)	83 $\pm$ 45	662 $\pm$ 105	4.0 $\pm$ 1.5	8.5 $\pm$ 1.0
	33	1.7 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.0	5.7 $\pm$ 0.5	12.4 $\pm$ 2.6	6.1 $\pm$ 1.5 (49)	34 $\pm$ 10	609 $\pm$ 59	5.0 $\pm$ 0.7	11.2 $\pm$ 2.7
	20	1.7 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.2	6.4 $\pm$ 0.8	13.8 $\pm$ 1.4	6.8 $\pm$ 0.6 (49)	46 $\pm$ 11	1142 $\pm$ 110	6.1 $\pm$ 1.9	12.3 $\pm$ 1.3
	41	1.3 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.1	6.0 $\pm$ 0.9	17.9 $\pm$ 3.1	8.3 $\pm$ 2.0 (47)	56 $\pm$ 11	2026 $\pm$ 249	3.1 $\pm$ 1.4	12.4 $\pm$ 3.2
	40	1.3 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1	5.9 $\pm$ 0.9	14.2 $\pm$ 2.6	6.9 $\pm$ 1.1 (48)	71 $\pm$ 33	1272 $\pm$ 193	3.1 $\pm$ 1.1	11.0 $\pm$ 3.7
	25	1.6 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.3	4.9 $\pm$ 0.5	13.0 $\pm$ 4.3	6.3 $\pm$ 2.7 (48)	46 $\pm$ 8	620 $\pm$ 142	3.2 $\pm$ 1.5	6.2 $\pm$ 3.4
	37	1.9 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	5.3 $\pm$ 0.8	13.5 $\pm$ 2.5	7.6 $\pm$ 0.3 (56)	78 $\pm$ 51	691 $\pm$ 151	5.4 $\pm$ 1.3	13.4 $\pm$ 3.0
	34	1.6 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	6.7 $\pm$ 0.7	18.3 $\pm$ 9.9	8.9 $\pm$ 2.5 (49)	59 $\pm$ 21	778 $\pm$ 182	6.0 $\pm$ 0.6	15.3 $\pm$ 6.7
	35	1.5 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.2	5.9 $\pm$ 0.9	12.1 $\pm$ 2.3	6.4 $\pm$ 2.1 (53)	37 $\pm$ 5	556 $\pm$ 71	4.4 $\pm$ 1.2	8.6 $\pm$ 1.0
	29	1.6 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.1	6.1 $\pm$ 0.8	12.6 $\pm$ 2.6	5.3 $\pm$ 2.5 (42)	40 $\pm$ 4	634 $\pm$ 390	5.2 $\pm$ 1.5	9.4 $\pm$ 1.0
	16	1.5 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	6.8 $\pm$ 0.8	19.4 $\pm$ 2.1	9.4 $\pm$ 1.0 (48)	46 $\pm$ 8	1220 $\pm$ 167	6.0 $\pm$ 1.6	17.7 $\pm$ 2.4
	24	1.3 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.1	6.2 $\pm$ 0.4	23.7 $\pm$ 10.1	9.5 $\pm$ 1.9 (40)	48 $\pm$ 3	924 $\pm$ 317	3.5 $\pm$ 1.0	12.3 $\pm$ 5.9
	42	1.5 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.1	7.3 $\pm$ 1.0	18.6 $\pm$ 3.6	9.2 $\pm$ 1.9 (50)	47 $\pm$ 11	1000 $\pm$ 106	6.0 $\pm$ 0.6	15.8 $\pm$ 3.2
	36	1.6 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	6.1 $\pm$ 0.7	11.3 $\pm$ 1.5	6.2 $\pm$ 0.9 (54)	48 $\pm$ 3	591 $\pm$ 92	5.4 $\pm$ 0.9	10.6 $\pm$ 0.7
	27	1.7 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.2	6.3 $\pm$ 0.7	15.6 $\pm$ 2.3	6.0 $\pm$ 1.5 (39)	41 $\pm$ 3	740 $\pm$ 147	6.1 $\pm$ 1.3	15.7 $\pm$ 3.1
	<b>26</b>	<b>1.6 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>1.0 <math>\pm</math> 0.2</b>	<b>5.1 <math>\pm</math> 0.8</b>	<b>18.7 <math>\pm</math> 5.2</b>	<b>6.9 <math>\pm</math> 2.5 (37)</b>	<b>36 <math>\pm</math> 5</b>	<b>617 <math>\pm</math> 138</b>	<b>3.8 <math>\pm</math> 1.3</b>	<b>13.7 <math>\pm</math> 3.5</b>
	<b>28</b>	<b>1.6 <math>\pm</math> 0.2</b>	<b>1.1 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>8.2 <math>\pm</math> 1.0</b>	<b>35.1 <math>\pm</math> 4.6</b>	<b>11.9 <math>\pm</math> 3.0 (34)</b>	<b>38 <math>\pm</math> 8</b>	<b>750 <math>\pm</math> 184</b>	<b>8.2 <math>\pm</math> 1.1</b>	<b>34.1 <math>\pm</math> 3.6</b>
	<b>30</b>	<b>1.6 <math>\pm</math> 0.2</b>	<b>1.1 <math>\pm</math> 0.2</b>	<b>9.7 <math>\pm</math> 1.5</b>	<b>53.3 <math>\pm</math> 11.0</b>	<b>16.5 <math>\pm</math> 5.5 (31)</b>	<b>39 <math>\pm</math> 4</b>	<b>585 <math>\pm</math> 160</b>	<b>11.3 <math>\pm</math> 2.8</b>	<b>50.8 <math>\pm</math> 8.0</b>
-Fe	26	1.1 $\pm$ 0.2*	0.7 $\pm$ 0.1*	12.9 $\pm$ 2.5*	38.8 $\pm$ 11.1*	16.1 $\pm$ 2.5* (41)	40 $\pm$ 2	669 $\pm$ 68	7.9 $\pm$ 2.1*	16.0 $\pm$ 6.8
	28	0.9 $\pm$ 0.1*	0.6 $\pm$ 0.1*	17.3 $\pm$ 2.1*	86.3 $\pm$ 12.6*	25.6 $\pm$ 6.6* (28)	63 $\pm$ 24*	933 $\pm$ 488	9.5 $\pm$ 2.0	43.3 $\pm$ 5.9
	30	0.9 $\pm$ 0.2*	0.6 $\pm$ 0.1*	16.4 $\pm$ 2.7*	112.1 $\pm$ 22.1*	30.4 $\pm$ 7.2* (27)	48 $\pm$ 9	863 $\pm$ 303	8.6 $\pm$ 1.4	59.1 $\pm$ 15.2

\* indicates that Fe-sufficient and Fe-deficient plants differed significantly ( $P < 0.05$ ) according to a Tukey HSD test.



**Figure 2** Amounts of Cu accumulated in entire plants ( $\mu\text{g}$  per 2 plants) and Cu bioavailability ( $\text{mg kg}^{-1}$  soil) as a function of soil Cu content ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) for the 22 soil samples (a) and for 20 samples (without the two most Cu-contaminated samples 28 and 30) (b). Dark circles stand for Fe-sufficient plants and open circles stand for Fe-deficient plants. The error bars are standard deviations.



**Figure 3** Flux of Cu acquisition ( $\text{mg kg}^{-1}$  DM) as a function of soil Cu content ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) for the 22 soil samples (a) and for 20 samples (without the two most Cu-contaminated samples 28 and 30) (b). Dark circles stand for Fe-sufficient plants and open circles stand for Fe-deficient plants. The error bars are standard deviations.

## Relationships between Cu bioavailability and soil extractable Cu

Linear correlations were calculated to assess the relationships between Cu bioavailability (Fig. 2) and Cu extractability as assessed via several extractants (Tables 1 and 3). As the two most Cu-contaminated soil samples (28 and 30) were assumed to strongly influence the correlation coefficient (see Fig. 2 for total Cu), these were also calculated without these two soil samples. Total soil Cu content and amounts of Cu extracted by EDTA, K-pyrophosphate, water and CaCl<sub>2</sub> were all positively correlated to Cu bioavailability. This was still the case when excluding the two most Cu-contaminated soil samples (28 and 30) except for CaCl<sub>2</sub>-extractable Cu. The largest correlations were found between Cu bioavailability and EDTA-extractable Cu, followed by total Cu and K-pyrophosphate-extractable Cu.

**Table 3** Linear correlation coefficients (r) between Cu bioavailability (mg kg<sup>-1</sup> soil) and soil Cu extractability (mg kg<sup>-1</sup>) as assessed by different extractants in Fe-sufficient plants for the 22 soil samples (and without the 2 most Cu-contaminated soil samples 28 and 30 in brackets): soil Cu extractions are HF-HClO<sub>4</sub> (total), Na<sub>2</sub>-EDTA (EDTA), K-pyrophosphate (Kpyr), water (water) and calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>).

	Extractable Cu mg kg <sup>-1</sup>				
	total	EDTA	Kpyr	eau	CaCl <sub>2</sub>
Cu bioavailability	0.75** (0.66**)	0.81** (0.75**)	0.75** (0.67**)	0.60** (0.47*)	0.58** (0.44)

\* and \*\* indicate significant correlation at the probability level of  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

## Chemical changes in the rhizosphere

Dissolved organic carbon concentration in soil solution did not vary significantly between the cropped soils (rhizosphere) and the uncropped soils whatever the total soil Cu content and the Fe treatment (ranging from 55 to 148 mg dm<sup>3</sup>)(data not shown). No significant change in rhizosphere pH was found for half of the calcareous soils relative to the bulk soil pH (Table 4). Whenever significant pH change (increase or decrease) occurred, it was always fairly small (<0.1 unit) in the calcareous soils, while a pH decrease reaching about 0.2 pH unit was found in the rhizosphere for the two non calcareous soil samples (16 and 20).

Amounts of soil Cu extracted by K-pyrophosphate systematically decreased in the rhizosphere although not significantly (Table 4). Amounts of Cu extracted by CaCl<sub>2</sub> and water decreased significantly in the rhizosphere of both Fe-sufficient and Fe-deficient plants for the two most Cu-contaminated soils (28 and 30). In contrast, amounts of Cu extracted by CaCl<sub>2</sub> and water increased significantly in cropped soils for two of the least Cu-contaminated soil samples (31 and 39). In addition, Fe-deficiency did not induce any significant difference in the amounts of Cu extracted by K-pyrophosphate, water and CaCl<sub>2</sub>.

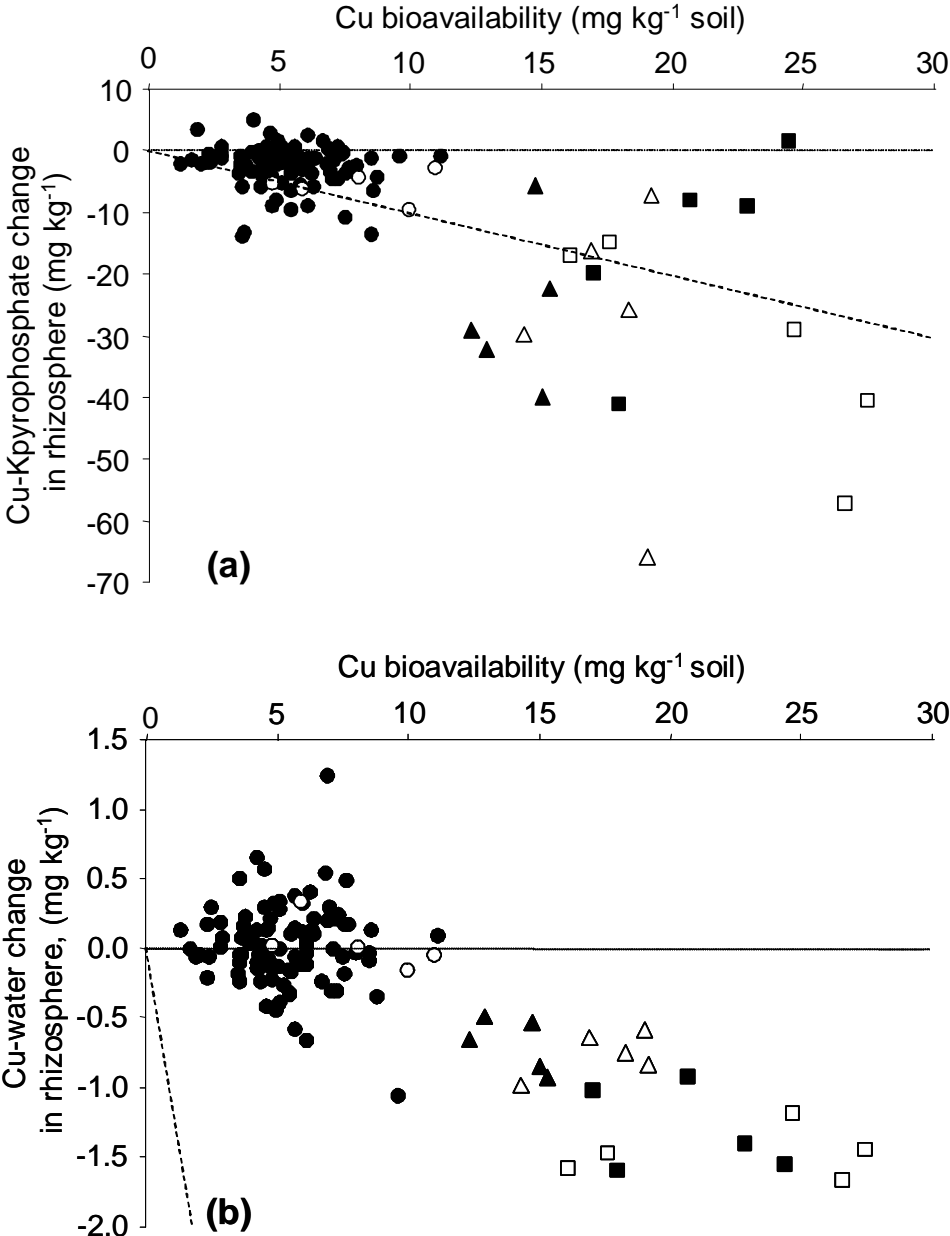


**Table 4** pH, Cu extracted by K-pyrophosphate (Kpyr), calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>) and water (mg kg<sup>-1</sup>) in the rhizosphere of Fe-sufficient (+Fe) and Fe-deficient (-Fe) plants and in the bulk soil (mean values ± standard deviation of five replicates). Samples ranked according to total soil Cu content (increasing order).

	samples	pH		Extractable Cu mg kg <sup>-1</sup>					
				Kpyr		CaCl <sub>2</sub>		water	
		rhizosphere	bulk soil	rhizosphere	bulk soil	rhizosphere	bulk soil	rhizosphere	bulk soil
+Fe	39	7.46 ± 0,02	7.48 ± 0,01	11 ± 0	11 ± 0	0.27 ± 0,10‡	0.03 ± 0,00	0.36 ± 0.13‡	0.07 ± 0.01
	23	7.45 ± 0,05	7.43 ± 0,03	18 ± 2	20 ± 1	0.10 ± 0,02	0.19 ± 0,18	0.20 ± 0.09	0.35 ± 0.22
	31	7.42 ± 0,01‡	7.39 ± 0,02	18 ± 1	20 ± 1	0.33 ± 0,18‡	0.05 ± 0,01	0.47 ± 0.24‡	0.12 ± 0.02
	32	7.42 ± 0,02	7.40 ± 0,03	32 ± 1	33 ± 0	0.22 ± 0,07	0.23 ± 0,05	0.54 ± 0.09	0.63 ± 0.14
	38	7.51 ± 0,02‡	7.58 ± 0,02	40 ± 1	41 ± 0	0.20 ± 0,02	0.18 ± 0,02	0.56 ± 0.06	0.63 ± 0.02
	33	7.42 ± 0,01‡	7.49 ± 0,02	40 ± 1	45 ± 1	0.15 ± 0,02	0.22 ± 0,07	0.41 ± 0.02‡	0.69 ± 0.10
	20	7.06 ± 0,03‡	7.24 ± 0,01	49 ± 3	56 ± 3	0.18 ± 0,05	0.15 ± 0,02	0.50 ± 0.07	0.42 ± 0.04
	41	7.43 ± 0,03‡	7.57 ± 0,01	34 ± 2	36 ± 1	0.19 ± 0,03	0.13 ± 0,01	0.41 ± 0.10	0.29 ± 0.04
	40	7.59 ± 0,01‡	7.55 ± 0,01	38 ± 1	40 ± 1	0.24 ± 0,08	0.17 ± 0,06	0.49 ± 0.08	0.39 ± 0.08
	25	7.32 ± 0,02‡	7.28 ± 0,03	39 ± 1	40 ± 2	0.19 ± 0,07	0.16 ± 0,03	0.58 ± 0.14	0.50 ± 0.10
	37	7.51 ± 0,02‡	7.58 ± 0,02	58 ± 3	59 ± 7	0.30 ± 0,12	0.25 ± 0,03	0.98 ± 0.51‡	0.71 ± 0.08
	34	7.49 ± 0,02‡	7.56 ± 0,03	55 ± 2	63 ± 1	0.36 ± 0,09	0.33 ± 0,13	0.80 ± 0.10‡	1.04 ± 0.29
	35	7.42 ± 0,03‡	7.53 ± 0,02	66 ± 2	68 ± 4	0.29 ± 0,05	0.31 ± 0,07	0.86 ± 0.12	1.05 ± 0.24
	29	7.37 ± 0,01	7.34 ± 0,02	46 ± 2	49 ± 2	0.19 ± 0,12	0.14 ± 0,02	0.43 ± 0.16	0.34 ± 0.04
	16	6.94 ± 0,05‡	7.14 ± 0,02	73 ± 2	74 ± 2	0.26 ± 0,06	0.30 ± 0,08	0.75 ± 0.12‡	0.99 ± 0.41
	24	7.36 ± 0,01‡	7.30 ± 0,04	47 ± 4	59 ± 4	0.24 ± 0,09	0.20 ± 0,06	0.50 ± 0.17	0.64 ± 0.07
	42	7.54 ± 0,01	7.53 ± 0,01	57 ± 2	60 ± 3	0.35 ± 0,08‡	0.23 ± 0,08	0.74 ± 0.14	0.58 ± 0.17
	36	7.49 ± 0,03	7.47 ± 0,02	85 ± 3	86 ± 4	0.44 ± 0,09	0.37 ± 0,06	0.97 ± 0.19	1.08 ± 0.18
	27	7.34 ± 0,02	7.35 ± 0,02	63 ± 2	67 ± 1	0.24 ± 0,14	0.22 ± 0,12	0.53 ± 0.17	0.57 ± 0.11
	<b>26</b>	<b>7.31 ± 0,04‡</b>	<b>7.27 ± 0,03</b>	<b>60 ± 1</b>	<b>62 ± 1</b>	<b>0.34 ± 0,14</b>	<b>0.26 ± 0,13</b>	<b>0.87 ± 0.18</b>	<b>0.72 ± 0.16</b>
<b>28</b>	<b>7.32 ± 0,01</b>	<b>7.34 ± 0,03</b>	<b>277 ± 13</b>	<b>303 ± 55</b>	<b>0.45 ± 0,09‡</b>	<b>0.63 ± 0,06</b>	<b>1.34 ± 0.13‡</b>	<b>2.03 ± 0.07</b>	
<b>30</b>	<b>7.25 ± 0,01</b>	<b>7.28 ± 0,03</b>	<b>617 ± 16</b>	<b>633 ± 36</b>	<b>0.68 ± 0,12‡</b>	<b>1.15 ± 0,12</b>	<b>2.63 ± 0.23‡</b>	<b>3.93 ± 0.18</b>	
-Fe	<b>26</b>	<b>7.36 ± 0,03‡*</b>	<b>7.27 ± 0,03</b>	<b>56 ± 2</b>	<b>62 ± 1</b>	<b>0.31 ± 0,14</b>	<b>0.26 ± 0,13</b>	<b>0.74 ± 0.21</b>	<b>0.72 ± 0.16</b>
	<b>28</b>	<b>7.32 ± 0,02</b>	<b>7.34 ± 0,03</b>	<b>274 ± 22</b>	<b>303 ± 55</b>	<b>0.43 ± 0,03‡</b>	<b>0.63 ± 0,06</b>	<b>1.28 ± 0.15‡</b>	<b>2.03 ± 0.07</b>
	<b>30</b>	<b>7.24 ± 0,01‡</b>	<b>7.28 ± 0,03</b>	<b>601 ± 18</b>	<b>633 ± 36</b>	<b>0.76 ± 0,04‡</b>	<b>1.15 ± 0,12</b>	<b>2.47 ± 0.13‡</b>	<b>3.93 ± 0.18</b>

\* indicates that Fe-sufficient and Fe-deficient plants differed significantly ( $P<0.05$ ) according to a Tukey HSD test. ‡ indicates that rhizosphere and bulk soil differed significantly ( $P<0.05$ ) according to a Tukey HSD test.

Changes in Cu extractability in the rhizosphere (rhizosphere minus uncropped soil) were represented as a function of Cu bioavailability in Figure 4. Both Fe-deficient and Fe-sufficient plants cropped with soil samples 28 and 30 presented the largest Cu bioavailability and the most important changes in amounts of Cu extracted by K-pyrophosphate (Fig. 4a) and water (Fig. 4b) in the rhizosphere. Changes in amounts of Cu extracted by K-pyrophosphate and by water in the rhizosphere were correlated with Cu bioavailability for Fe-sufficient plants ( $r = -0.67$   $P < 0.01$  and  $-0.44$   $P < 0.05$ , respectively) and for both Fe treatments ( $r = -0.76$  and  $-0.55$   $P < 0.01$ , respectively), but not when excluding soil samples 28 and 30. The slope of the regression line was close to  $-1$  for Cu extracted by K-pyrophosphate, indicating that depletion of this pool in the rhizosphere was close to the amount of Cu actually taken up by the plant.



**Figure 4** Changes in the amounts of Cu extracted by K-pyrophosphate (a) and water (b) in the rhizosphere (rhizosphere minus bulk soil, expressed as mg kg<sup>-1</sup>) as a function of Cu bioavailability (mg kg<sup>-1</sup> soil). Triangles and squares stand for soil samples 28 and 30, respectively and, circles stand for the other soil samples. Dark symbols stand for Fe-sufficient plants and open symbols stand for Fe-deficient plants.

#### IV.2.4. Discussion

##### Plant Cu content and Cu bioavailability

As expected, both Cu content and amounts of Cu accumulated were larger in roots than in shoots (Chaignon et al., 2002b, 2003; Michaud et al., 2007)(Table 2). The proportion of Cu actually absorbed by roots, i.e. symplasmic Cu, rather increased during the contact period with soil samples, except for plants cropped with the two most contaminated soil samples (28 and 30) compared with hydroponically grown plants (Table 2). This increase occurred at the expense of the proportion of Cu adsorbed onto root cell walls (i.e. apoplasmic Cu) as already reported to occur for root apoplasmic Fe which can be remobilized under Fe-deficient conditions to satisfy plant requirements (Von Wirén et al., 1995). Except for the most contaminated soil samples, plant Cu content tended to decrease particularly in shoots during the second stage of the experiment relative to the first stage. Such a dilution of Cu in plant parts had not been found when applying a similar biotest to other plant species such as rape and tomato grown in acidic and calcareous, vineyard soils (Chaignon et al., 2002a, 2003; Cornu et al., 2007). However, compared with these species durum wheat exhibited a much larger root mat by the end of the soil contact stage, thus resulting in a dilution of acquired Cu in the produced biomass. In addition, we used larger Cu concentrations in the first stage of the experiment, compared with the previous authors. Although the cropping device employed in the present work is a rapid and simple tool for assessing Cu bioavailability compared with pot experiments (Chaignon and Hinsinger, 2003), it has several drawbacks such as: (i) its rather artificial conditions and (ii) the short duration (8 days) of the contact period between the three-week-old plants and the soil samples. This may have led to the dilution effect observed in the present study. Longer contact period with younger plants may have helped overcoming such disadvantage.

Amounts of Cu accumulated in plant parts (Table 2), and thus Cu bioavailability (Fig. 2) as well as the corresponding flux of Cu acquisition (Fig. 3) were positively correlated to total soil Cu content suggesting that Cu bioavailability for durum wheat increased almost proportionally to total soil Cu content. In the present work, EDTA-extractable Cu, which is an estimate of the potentially available fraction of Cu, was better correlated to Cu bioavailability than the other fractions of soil extractable Cu, but only slightly compared with total soil Cu content (Table 3). Conversely, water-extractable Cu which is supposed to represent soluble Cu, thus the immediately available fraction of Cu, was less correlated to Cu bioavailability. This suggests that EDTA-extractable Cu and total soil Cu content may be reasonable predictors of Cu bioavailability for durum wheat in neutral to alkaline soils. This result contradicts common knowledge that total metal content in soils is a poor indicator of metal bioavailability as already found for tomato by Chaignon et al. (2003) who also pointed that this was the case when considering only calcareous soils, but no longer if including very different soil types, e.g. much more acidic soils. In contrast with the results of Chaignon et al. (2003), in the present work we found that both shoot and root Cu contents increased significantly with increasing total soil Cu content (Table 2). In tomato, whatever the total soil Cu content over a range of values up to  $400 \text{ mg kg}^{-1}$ , shoot Cu content remained unchanged, while root Cu steeply increased (Chaignon et al., 2003). Conversely, in the present work, the shoot Cu content of durum wheat steadily increased with increasing soil Cu content (Table 2). This suggests that Cu homeostasis may perform better in tomato than durum wheat.

Copper content in plant parts (Table 2) and the flux of Cu acquisition (Fig. 3) increased significantly under Fe-deficiency, while amounts of Cu accumulated by whole plants and Cu

bioavailability (Fig. 2) did not differ significantly between the two Fe treatments. This may result from the significant decrease in shoot and root dry biomass in Fe-deficient plants compared with Fe-sufficient plants. These results suggest that estimating Cu bioavailability as the amount of Cu accumulated in whole plants during the second stage of the experiment relative to the dry mass of soil supplied, in agreement with the definition provided by Harmsen et al. (2005), may have led to underestimate the impact of Fe-deficiency on actual Cu acquisition from soil, thus on Cu bioavailability for durum wheat. More generally speaking, this indicates that calculation of Cu bioavailability should account for the plant dry biomass which can substantially vary according to the plant physiological status (e.g. deficiency, toxicity). The biotest we used was designed for minimising such effects (Chaignon and Hinsinger, 2003), but it should be stressed that Fe-deficiency occurred as a consequence of the differential treatment of Fe supply we imposed at the first stage of the experiment. In that respect, the flux of Cu acquisition, which is expressed relative to the root biomass (as displayed in Fig. 3), might be considered as a more relevant estimate of Cu bioavailability. Harmsen et al. (2005) stressed indeed that the bioavailability could be advantageously defined as a flux (usually expressed relative to the surface of roots for plants) rather than a content.

Graminaceous species, such as durum wheat, are known for their specific Fe acquisition strategy which is characterised by the increased secretion of ferric chelating compounds (phytosiderophores) under Fe-deficiency and the uptake of the entire Fe-phytosiderophore complex by a specific transporter (Schaaf et al., 2004). In the present study, Fe-deficiency resulted in a weak but significant increase in root-induced release of complexing compounds at the end of the first stage. The method employed to estimate the complexing capacity of the root exudates has been previously used to quantify phytosiderophore secretion (Treeby et al., 1989; Chaignon et al., 2002b). As phytosiderophore secretion is known to be enhanced in response to Fe-deficiency (Römheld, 1987), the observed increase in root-induced release of complexing compounds may thus partly result from larger secretion of phytosiderophores in Fe-deficient plants compared to Fe-sufficient plants. In the present case, the increase in the flux of Cu acquisition which took place under Fe-deficiency possibly occurred as a consequence of the enhanced root-induced release of complexing compounds, presumably phytosiderophores, as suggested for bread wheat by Chaignon et al. (2002b). It has indeed been shown that some phytosiderophore-Fe transporters can also transport Cu bound to phytosiderophores (Schaaf et al. 2004). One may thus question whether such root-induced release of complexing compounds may also alter Cu extractability in the rhizosphere.

### **Root-induced changes in chemical properties in the rhizosphere**

To study whether increase in Cu bioavailability was related to alteration in Cu solid phase speciation and availability, extractability of Cu has been studied in cropped (rhizosphere) and uncropped soils (bulk). As observed by Michaud et al. (2007), water-extractable Cu was significantly larger than  $\text{CaCl}_2$ -extractable Cu (Tables 1 and 4), presumably due to Ca-induced coagulation of organic matter in  $\text{CaCl}_2$  extracts (Sauvé et al., 1997). Among all soil samples, amounts of Cu extracted by K-pyrophosphate tended to decrease in the rhizosphere while no significant change in the amounts of Cu extracted by  $\text{CaCl}_2$  and water was observed in most soils (Table 4). However, the amounts of Cu extracted by  $\text{CaCl}_2$  and water significantly decreased in the rhizosphere of both Fe-deficient and Fe-sufficient plants cropped in the two most contaminated soil samples (28 and 30) (Table 4 and Fig. 4). This may be due to larger Cu acquisition by plants and thus Cu bioavailability in these soil samples. Conversely, amounts of Cu extracted by  $\text{CaCl}_2$  and water increased significantly in the

rhizosphere for two of the least Cu-contaminated soil samples (31 and 39) while plant Cu acquisition from these soil samples were among the lowest. This suggests that Cu availability might decrease only at larger soil Cu content and plant Cu acquisition (soils 28 and 30). Globally, changes in K-pyrophosphate and water extractability were significantly correlated with Cu bioavailability suggesting that plant Cu acquisition occurred at the expense of soil solution Cu and Cu bound to soil organic matter (Fig. 4). It should be noted that the amount of Cu accumulated in the whole plants was in the same order of magnitude as the depletion of K-pyrophosphate extractable Cu (Cu presumably bound to soil organic matter), which would suggest that plants took up Cu at the expense of this soil Cu fraction (Fig 4a). In contrast, the depletion of water-extractable Cu accounted for only a small fraction of Cu accumulated in the whole plants (Fig. 4b). This is in agreement with results of Tao et al. (2003, 2004) showing that fractions of Cu bound to soil organic matter and carbonates were depleted in the rhizosphere. Nevertheless, this contradicts with what we found for field grown durum wheat which showed a significant increase in water-extractable Cu in the rhizosphere, particularly for soil samples 28 and 30. In the present study, the physical arrangement of the root system and the large root biomass relative to the soil mass may have led to increased Cu depletion in soil solution at larger soil Cu content and plant Cu acquisition.

Soil properties can differ between the bulk soil and the rhizosphere, thus altering the speciation and availability of trace elements via a range of root-induced processes (McLaughlin et al., 1998; Hinsinger et al., 2005; Hinsinger and Courchesne, 2008). Former studies showed that rape and tomato plants were able to slightly acidify their rhizosphere in calcareous soils and to alkalize it in acidic soils (Chaignon et al., 2002a; Cornu et al., 2007). In the present work, little or no significant acidification occurred in the rhizosphere of durum wheat cropped in the calcareous soils (samples 23-42)(Table 4). This is in agreement with the results found for bread wheat (Chaignon et al., 2002b) and field-grown durum wheat (Michaud et al., 2007). The little pH changes which were observed were unlikely to cause a substantial change in Cu extractability in the rhizosphere. Cattani et al. (2006) and Courchesne et al. (2006) observed that dissolved organic carbon increased in the rhizosphere. Nevertheless, in the present work, no significant increase in DOC occurred in the rhizosphere. In spite of this, secretion of complexing compounds by root and rhizosphere microorganisms (e.g. organic anions, siderophores) in amounts which may not induce any significant increase in DOC in the rhizosphere might have contributed to altering soil Cu extractability. Organic anions may be rapidly adsorbed onto solid phase and degraded by microorganisms, so that their concentration in soil solution was shown to be low (Jones et al., 2003). In addition, they may not complex metal ions strongly enough to extract them from soils (Callahan et al., 2006). In contrast, phytosiderophores which are strong Fe chelators secreted in larger amounts by plants in response to Fe-deficiency as often induced in calcareous soils due to low Fe availability, display larger association constants for transition metals such as Cu than organics anions (Murakami et al., 1989). Speciation calculations by Reichman and Parker (2005) also showed that phytosiderophores would rather complex Cu than Fe in the neutral to alkaline pH range. Previous studies showed that enhanced secretion of phytosiderophores occurring under Fe-deficiency mobilized Cu in calcareous soils (Treeby et al., 1989; Chaignon et al., 2002b) at the expense of Fe mobilization (Zhang et al., 1991). In the present study, Fe-deficiency significantly increased the root-induced release of complexing compounds (presumably phytosiderophores) and Cu acquisition flux (Fig. 3). In contrast, Fe-deficient plants did not significantly alter Cu extractability in the rhizosphere relative to Fe-sufficient plants (Table 4). However, given that an equivalent depletion of the various Cu fractions was achieved in spite of a root biomass which was about 30-45% less, this suggests that Fe-deficient plants actually resulted in a greater effect on Cu extractability than Fe-sufficient plants. Both Fe-sufficient

and Fe-deficient plants secreted complexing compounds, so that depletion of K-pyrophosphate Cu, particularly in soil samples 28 and 30, may have resulted from the mobilization of Cu from the corresponding solid phase by such compounds. In addition to Cu mobilization from the solid phase, complexing compounds secreted by roots, e.g. phytosiderophores, may complex Cu in soil solution which may increase Cu uptake as Cu-phytosiderophore complexes might be taken up (Schaaf et al., 2004) and decrease Cu concentration in soil solution. This might contribute to the concomitant decrease in water Cu extractability and increase in Cu bioavailability which occurred particularly for samples 28 and 30.

In conclusion, our results showed that EDTA-, K-pyrophosphate-extractable Cu and total soil Cu content may be reasonable indicators of Cu bioavailability for durum wheat in neutral to alkaline soils. Copper acquisition by plants occurred at the expense of the dissolved Cu in soil solution and more so at the expense of the K-pyrophosphate-extractable Cu: this pool which presumably corresponds to Cu bound to soil organic matter was systematically depleted in the rhizosphere. Such root-induced alterations of Cu extractability in the rhizosphere were not linked to changes in pH and DOC. When expressing the Cu bioavailability as the amount of Cu accumulated in the plants relative to the amount of soil supplied to the plants, it was not significantly affected by the Fe-status of the plant, in spite of the increase in root-induced release of complexing compounds (presumably phytosiderophores) which occurred as a response to Fe-deficiency. However, when the bioavailability of Cu was expressed as a flux of Cu acquisition (relative to root biomass), it increased substantially in Fe-deficient plants which had a much lower root biomass than Fe-sufficient plants. This suggests that expressing Cu bioavailability relative to root dry biomass might thus be more relevant to estimate the actual Cu bioavailability of soil-grown plants. The present work suggests that complexing compounds released by roots may be implied in increased Cu acquisition and mobilization of Cu from the solid phase in Cu-contaminated, calcareous soils. Nevertheless, the present experimental device employed in this study has several drawbacks which are related to its rather artificial conditions and to the peculiar arrangement of soil and roots in the cropping device. Further experiments are thus needed to validate the present results in a conventional pot experiment in order to clarify the implication of root secreted complexing compounds in Cu bioavailability for Gramineous species, particularly their putative implication in Cu mobilization from the solid phase.

#### **IV.2.5. Acknowledgements**

We thank Didier Arnal, Jean-Louis Aznar, Nicole Balsera, Carole Chappelaz and Michaël Clairotte for technical help. We also thank Jean-François Briat, Michel Mench and Erik Smolders for their helpful suggestions to improve this manuscript. Financial support for this work was provided by the French Ministry of Research through its ECCO-ECODYN programme.

#### **IV.2.6. References**

**Afnor. 1999.** Recueil de Normes Françaises. Qualité des sols. Afnor, Paris  
**Callahan DL, Baker AJM, Kolev SD, Wedd AG. 2006.** Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 11: 2–12

- Cattani I, Fragoulis G, Boccelli R, Capri E. 2006.** Copper bioavailability in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) grown in two Italian soils. *Chemosphere* 64: 1972–1979
- Chaignon V, Bedin F, Hinsinger P. 2002a.** Copper bioavailability and rhizosphere pH changes as affected by nitrogen supply for tomato and oilseed rape cropped on an acidic and a calcareous soil. *Plant and Soil* 243: 219–228
- Chaignon V, Di Malta D, Hinsinger P. 2002b.** Fe-deficiency increases Cu acquisition by wheat cropped in a Cu-contaminated vineyard soil. *New Phytologist* 154: 121–130
- Chaignon V, Hinsinger P. 2003.** A biotest for evaluating copper bioavailability to plants in a contaminated soil. *Journal of Environmental Quality* 32: 824–833
- Chaignon V, Sanchez-Neira I, Herrmann P, Jaillard B, Hinsinger P. 2003.** Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. *Environmental Pollution* 123: 229–238
- Cornu JY, Staunton S, Hinsinger P. 2007.** Copper concentration in plants and in the rhizosphere as influenced by the iron status of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Plant and Soil* 292: 63–77
- Courchesne F, Kruyts N, Legrand P. 2006.** Labile zinc concentration and free copper ion activity in the rhizosphere of forest soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 635–642
- Harmsen J, Rulkens W, Eijsackers H. 2005.** Bioavailability, concept for understanding or tool for predicting? *Land Contamination and Reclamation* 13: 161–171
- Hinsinger P, Courchesne F. 2008.** Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids at soil-root interface. In *Biophysico-Chemical Processes of Heavy Metals and Metalloids in Soil Environments*. Eds. A Violante, PM Huang and GM Gadd. John Wiley and Sons (in press)
- Hinsinger P, Gobran GR, Gregory PJ, Wenzel WW. 2005.** Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytologist* 168: 293–303
- Jones DL, Dennis PG, Owen AG, van Hees PAW. 2003.** Organic acid behaviour in soils - misconceptions and knowledge gaps. *Plant and Soil* 248: 31–41
- Lebourg A, Sterckeman T, Ciesielshi H, Proix N. 1998.** Trace metal speciation in three unbuffered salt solutions used to assess their bioavailability in soil. *Journal of Environmental Quality* 27: 584–590
- Lexmond TM, Van der Vorm PDJ. 1981.** The effect of pH on copper toxicity to hydroponically grown maize. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 29: 217–238
- McLaughlin MJ, Smolders E, Merckx R. 1998.** Soil-root interface: Physicochemical processes. In: *Soil chemistry and ecosystem health*. Special Publications no 52 pp. 233–277. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA
- Michaud AM, Bravin MN, Galleguillos M, Hinsinger P. 2007.** Copper uptake and phytotoxicity as assessed in situ for durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cultivated in Cu-contaminated, former vineyard soils. *Plant and Soil* 298: 99–111
- Murakami T, Ise K, Hayakawa M, Kamei S, Takagi S. 1989.** Stabilities of metal complexes of mugineic acids and their specific affinities for iron (III). *Chemistry Letters* 2137–2140
- Planquart P, Bonin G, Prone A, Massiani C. 1999.** Distribution, movement and plant availability of trace metals in soils amended with sewage sludge composts: application to low metal loadings. *Science of the Total Environment* 241: 161–179
- Reichman SM, Parker DR. 2005.** Metal complexation by phytosiderophores in the rhizosphere. In *Biogeochemistry of trace elements in the rhizosphere*. Eds. Huang PM and Gobran GR. Elsevier pp 129–156

- Rieuwerts JS, Thornton I, Farago ME, Ashmore MR. 1998.** Factors influencing metal bioavailability in soils: preliminary investigations for the development of a critical loads approach for metals. *Chemical Speciation and Bioavailability* 10: 61–75
- Sauvé S, McBride MB, Norvell WA, Hendershot WH. 1997.** Copper solubility and speciation of in situ contaminated soils, Effects of copper level, pH and organic matter. *Water Air and Soil Pollution* 100: 133–149
- Schaaf G, Erenoglu BE, VonWirén N. 2004.** Physiological and biochemical characterization of metal-phytosiderophore transport in graminaceous species. *Soil Science and Plant Nutrition* 50: 989–995
- Tao S, Chen YJ, Xu FL, Cao J, Li BG. 2003.** Changes of copper speciation in maize rhizosphere soil. *Environmental Pollution* 122: 447–454
- Tao S, Liu WX, Chen YJ, Xu FL, Dawson RW, Li BG, Cao J, Wang XJ, Hu JY, Fang JY. 2004.** Evaluation of factors influencing root-induced changes of copper fractionation in rhizosphere of a calcareous soil. *Environmental Pollution* 129: 5–12
- Treeby M, Marschner H, Römheld V. 1989.** Mobilization of iron and other micronutrient cations from a calcareous soil by plant-borne, microbial, and synthetic metal chelators. *Plant and Soil* 114: 217–226
- von Wirén N, Romheld V, Shioiri T, Marschner H. 1995.** Competition between micro-organisms and roots of barley and sorghum for iron accumulated in the root apoplasm. *New Phytologist* 130: 511–521
- Zhang FS, Treeby M, Römheld V, Marschner H. 1991.** Mobilization of iron by phytosiderophores as affected by other micronutrients. *Plant and Soil* 130: 173–178
- Zhao FJ, Rooney CP, Zhang H, McGrath SP. 2006.** Comparison of soil solution speciation and diffusive gradients in thin-films measurement as an indicator of copper bioavailability to plants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 733–742



## Conclusions et perspectives

---

L'action préservatrice des sels de cuivre (Cu) contre le mildiou de la vigne a été découverte à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle. Depuis, leur utilisation répétée et massive comme fongicides sur les vignes a engendré une pollution diffuse en Cu des sols viticoles, particulièrement en Europe du fait de l'âge des vignobles. La crise viticole qui a débuté dans les années 1970 a engendré une restructuration profonde du vignoble français, particulièrement en Languedoc-Roussillon, où plus du tiers de la surface viticole a été arraché et remplacé par d'autres cultures, principalement du blé dur. La question de la pollution en Cu des sols viticoles et des risques de phytotoxicité de Cu pour la vigne et d'autres cultures (interculture et/ou reconversion agricole) a été soulevée par la communauté scientifique dès le début de l'utilisation massive de sels de Cu en viticulture. Des travaux antérieurs épars ont mis en évidence qu'une telle contamination pouvait engendrer des problèmes de phytotoxicité en sols acides pour la vigne (Delas 1963 ; Garcia 2004). Plus étonnamment, des problèmes de phytotoxicité ont été observés en sols calcaires chez des espèces végétales spontanées (adventices de la vigne, Brun 1998) et cultivées comme les céréales (Coullery 1997), particulièrement le blé dur (Braun 2006).

Il est généralement admis que la biodisponibilité et les risques de phytotoxicité des éléments en traces métalliques augmentent lorsque le pH diminue. Cependant, les travaux de Brun (1998) et Brun et al. (2001) ont montré que la biodisponibilité de Cu pouvait être aussi élevée en sols calcaires qu'en sols acides chez le maïs. Les travaux de Lexmond et van der Vorm (1981) et plus récemment de Zhao et al. (2006) ont par ailleurs montré que l'augmentation du pH pourrait intensifier les effets toxiques de Cu du fait vraisemblablement de la diminution de la compétition entre les protons et Cu pour l'adsorption sur les parois cellulaires avec l'augmentation du pH. La paradoxale augmentation de la toxicité de Cu avec l'augmentation du pH est d'ailleurs en partie expliquée par le modèle TBLM (Terrestrial Biotic Ligand Model) qui prend en compte l'effet des cations compétiteurs (proton, calcium et magnésium) pour les sites biologiques de liaison (Thakali et al. 2006). Chaignon (2001) a étudié l'effet des mécanismes racinaires (modification de pH et exsudation de ligands organiques) de différentes espèces (tomate, colza, blé tendre) sur la biodisponibilité de Cu. Chaignon et al. (2002b) ont mis en évidence que la sécrétion accrue de complexants du fer ferrique (les phytosidérophores) sous déficience en fer (Fe) pouvait être responsable de l'augmentation de la biodisponibilité de Cu en sol calcaire contaminé chez le blé tendre. En revanche, chez la tomate qui ne sécrète pas de phytosidérophores, Cornu et al. (2007) n'ont pas observé d'augmentation de la biodisponibilité de Cu en sols calcaires sous déficience en Fe. Ces travaux antérieurs ont montré que la biodisponibilité de Cu pouvait être équivalente en sols calcaires et non calcaires pour le maïs (Brun et al., 2001) et qu'elle pourrait être augmentée en sols calcaires pour des céréales par rapport à d'autres espèces comme la tomate, via l'interaction avec la stratégie d'acquisition de Fe (Chaignon, 2001). Cependant, ces travaux n'ont pas mis en évidence de phytotoxicité de Cu chez des céréales cultivées *in situ* en sols calcaires, ni précisé le déterminisme de la biodisponibilité et de la phytotoxicité de Cu dans ces sols. D'autre part, les études relatives à la phytotoxicité de Cu ont montré parfois la mise en place d'une déficience induite en Fe avec l'apparition de symptômes de chlorose ferrique sans étudier toutefois l'interaction avec les mécanismes d'acquisition de Fe propres aux céréales liée à la sécrétion de complexants (les phytosidérophores). Ces études ont également permis d'établir des valeurs seuils de phytotoxicité de Cu principalement fondées sur l'analyse des parties aériennes alors que Cu est majoritairement accumulé dans les racines et que Cu est en premier lieu rhizotoxique.

L'originalité de cette étude était donc d'évaluer les risques écotoxicologiques provoqués par la contamination en Cu de sols calcaires à antécédent viticole pour des céréales, (i) en mettant en évidence *in situ* la phytotoxicité de Cu chez le blé dur et des différences génotypiques de sensibilité à la mise en place d'une déficience en Fe chez les céréales en sols calcaires à antécédent viticole, (ii) en caractérisant la phytotoxicité de Cu, plus particulièrement en vue d'établir des indicateurs pertinents, simples et sensibles de la phytotoxicité de Cu chez les céréales et (iii) en étudiant l'interaction entre la biodisponibilité, la phytotoxicité de Cu et la nutrition en Fe du blé dur pouvant conduire à l'apparition d'une phytotoxicité de Cu en sols calcaires à antécédent viticole. La démarche suivie pour répondre à ces objectifs a consisté à conduire des investigations *in situ* et des expérimentations en conditions contrôlées au laboratoire. Ces dernières ont été conduites dans les conditions les plus standardisées possible en jouant sur le statut en Fe de plantes cultivées en hydroponie à différentes concentrations de Cu et, à l'aide d'un biotest adapté de celui de Chaignon et Hinsinger (2003), appliqué à une gamme de sols présentant des teneurs en Cu contrastées.

## Options méthodologiques

### Complémentarité des approches terrain – laboratoire

Une approche de terrain a été utilisée dans cette étude pour mettre en évidence en sols calcaires à antécédent viticole (i) la phytotoxicité de Cu en sols calcaires chez le blé dur et (ii) les différences inter- et intraspécifiques de sensibilité à la mise en place d'une déficience en Fe. Les expérimentations réalisées au laboratoire ont été conduites (i) en hydroponie pour caractériser la phytotoxicité de Cu en fonction du niveau de Fe disponible pour la plante et établir des valeurs seuils et des indicateurs pertinents de phytotoxicité de Cu chez le blé dur et, (ii) avec le biotest adapté de Chaignon et Hinsinger (2003) pour étudier la biodisponibilité de Cu pour le blé dur en sols calcaires et les modifications chimiques induites dans la rhizosphère en fonction du statut en Fe des plantes.

Les investigations et les essais de terrain prennent en compte les différents facteurs biotiques (e.g. architecture et croissance racinaire, interactions avec les microorganismes et la faune, ainsi qu'avec les adventices) et abiotiques (e.g. propriétés physico-chimiques du sol, climat) pouvant agir sur le prélèvement d'un élément (nutritif ou contaminant) par une espèce végétale donnée et donc sur sa biodisponibilité. Cette approche plus réaliste que sous conditions contrôlées au laboratoire souffre néanmoins de quelques limites : (i) les sources de variation à l'intérieur et entre les sites étudiés (e.g. propriétés physico-chimiques du sol, climat, itinéraire technique) compliquent l'interprétation des résultats ; (ii) la procédure de récolte et de lavage des racines est difficile, souvent imprécise et source d'erreurs en raison de la difficulté de collecter l'ensemble du système racinaire et d'éviter la contamination des racines avec des particules de sol susceptibles de fausser les mesures (il en irait de même pour des expérimentations en pots conventionnelles) ; enfin (iii) la mise en place et la conduite des expérimentations ainsi que l'échantillonnage sont souvent lourds et fastidieux, ce qui ne permet pas de réaliser des expérimentations *in situ* de l'ampleur de celles pouvant être réalisées sous conditions contrôlées au laboratoire.

D'ailleurs, les teneurs en Fe des plantes échantillonnées *in situ* étaient parfois supérieures à celles obtenues au laboratoire. Malgré l'effort apporté lors de l'échantillonnage au champ pour éviter les risques de souillure des parties aériennes avec du sol et au cours du lavage des

plantes, des particules de sols ont pu contaminer les échantillons. Une telle contamination pourrait expliquer les fortes teneurs en Fe parfois observées (notamment dans les racines) dans les plantes échantillonnées *in situ* par rapport à celles des plantes cultivées au laboratoire en hydroponie par exemple dans le Chapitre III avec 1  $\mu\text{M}$  Cu et 100  $\mu\text{M}$  Fe dont les teneurs en Fe étaient de 1358  $\text{mg kg}^{-1}$  dans les racines et de 74  $\text{mg kg}^{-1}$  dans les parties aériennes. D'ailleurs, les teneurs en Fe des parties aériennes étaient différentes dans les deux travaux réalisés sur le terrain. Une contamination des parties aériennes avec des particules de sol lors de l'échantillonnage et/ou de la récupération de la rhizosphère lors du premier travail de terrain pourrait expliquer les valeurs plus élevées de Fe des parties aériennes dans ce travail par rapport à celles obtenues dans le second travail de terrain réalisé avec ARVALIS. D'autre part, une contamination des racines avec des particules de sol (e.g. oxydes de Fe) pourrait également avoir biaisé les résultats obtenus. Toutefois, aucune corrélation significative n'a été obtenue entre les teneurs en Fe des racines et du sol ( $r = 0,14$  pour tous les sols,  $r = 0,25$  pour les sols calcaires et  $r = -0,07$  pour les sols non calcaires), y compris en sols calcaires où l'antagonisme était principalement observé (Annexes 1). Pour les échantillons 39 et 23 (avec 24 et 40  $\text{g Fe kg}^{-1}$  dans le sol et 4649 et 6040  $\text{mg Fe kg}^{-1}$  dans les racines) en considérant une teneur de 1300  $\text{mg Fe kg}^{-1}$  dans les racines comme théorique (teneur en Fe des racines constatée en hydroponie, Chapitre III), il faudrait respectivement 0,14 et 0,12 g de sol par gramme de racine sèche pour polluer les racines en Fe, ce qui semble élevé pour qu'une contamination avec des particules de sol soit l'unique raison de la forte teneur en Fe constatée dans les racines. Si le même calcul est appliqué pour la contamination en Cu des plantes les plus fortement contaminées en Cu (705  $\text{mg kg}^{-1}$ ) et en considérant une teneur en Cu de 200  $\text{mg kg}^{-1}$ , comme observée dans les autres plantes avec des symptômes de chlorose ferrique (excepté l'échantillon 26), il faudrait une masse de sol de 0,5 de sol par gramme de racine sèche pour expliquer une telle augmentation des teneurs en Cu, ce qui semble impossible. Par ailleurs, le rapport des teneurs en Fe et Cu des racines qui est positivement corrélé à celui obtenu dans le sol ( $r = 0,94$   $P < 0,01$  pour les sols calcaires et  $r = 0,69$   $P < 0,01$  pour les sols non calcaires) se trouve en dessous de la droite  $y = x$ , ce qui suggère qu'une contamination avec des particules de sol pourrait toutefois augmenter les teneurs en Cu et Fe des racines mais pas expliquer totalement les teneurs constatées (Annexes 2). Ainsi, l'hypothèse d'une contamination par des particules de sol qui pourrait être à l'origine des fortes teneurs en Fe parfois constatées dans les racines par rapport à des expérimentations en hydroponie ne peut être écartée.

Le travail de terrain réalisé dans cette étude, davantage exploratoire, a été complété par une approche plus conventionnelle de travail au laboratoire pour caractériser la phytotoxicité de Cu et préciser les mécanismes pouvant expliquer l'apparition d'une phytotoxicité de Cu en sols calcaires chez le blé dur. Les expérimentations en conditions contrôlées au laboratoire, souvent artificielles et sources d'artéfacts, permettent néanmoins de simplifier, standardiser et d'assurer la reproductibilité des conditions expérimentales afin de faciliter l'interprétation des résultats. Les expérimentations en hydroponie sont faciles à mettre en œuvre, standardisées et reproductibles mais elles souffrent néanmoins de limites inhérentes à l'aspect très artificiel de la culture en solutions nutritives, telles que la modification de l'architecture racinaire et du prélèvement des éléments. Il s'avère par conséquent nécessaire de confronter les résultats acquis en hydroponie avec des mesures obtenues en expérimentations en pots ou sur le terrain.

Le dispositif de culture utilisé dans le biotest de Chaignon et Hinsinger (2003) a été légèrement modifié en début de thèse afin d'améliorer le contact sol-racines (Annexes 3). Le principal avantage de ce dispositif de culture est que les racines et le sol sont séparés physiquement, de sorte qu'il permet d'accéder facilement à la rhizosphère et aux racines sans

contamination par des particules de sol. D'autre part, comparativement aux cultures en pot, ce dispositif est peu coûteux en temps, de petite taille et plus standardisé. Il assure ainsi une meilleure reproductibilité et permet également d'élaborer des protocoles expérimentaux lourds et de multiplier ainsi les modalités et les répétitions sur une surface réduite en raison du faible encombrement du dispositif de culture. De la sorte il est adapté à des mesures en chambre de culture permettant de mieux contraindre le climat et la standardisation du biotest, comparativement aux cultures en pot conventionnelles qui sont conduites le plus souvent sous serre. Il souffre néanmoins de certaines limites :

(i) le grossissement artificiel de l'interface sol-racines : la masse racinaire étant très importante par rapport à la quantité de sol mise à disposition, ceci peut provoquer un effet-puits racinaire supérieur à l'offre du sol et à la capacité de mobilisation racinaire, particulièrement pour des éléments les plus mobiles, ce qui nécessite un apport de solution nutritive qui peut modifier les équilibres chimiques et donc la disponibilité des éléments.

(ii) la séparation physique des racines et du sol : les racines sont potentiellement moins exposées à la contamination du sol et pas forcément en contact suffisamment étroit avec le sol. En particulier, le problème résulte de la forte biomasse racinaire développée par certaines espèces telles que le blé dur, qui amène au développement d'un tapis racinaire épais de plusieurs millimètres et au sein duquel il doit exister une forte hétérogénéité dans la qualité du contact avec le sol et, par suite, dans le niveau de contamination ou de nutrition hydrique et minérale qui en découle.

(iii) les modifications chimiques induites dans la rhizosphère (pH, DOC) sont produites par les activités racinaires et microbiennes sans possibilité de les distinguer.

(iv) la durée de contact sol-plante est relativement courte, ce qui peut induire une dilution des quantités prélevées à partir du sol dans la biomasse des plantes préalablement âgées de quelques semaines avec le contact avec le sol.

Les résultats de ce travail ainsi que ceux de Chaignon (2001), Chaignon et Hinsinger (2003) et de Cornu et al. (2007) suggèrent que le biotest pourrait être un outil simple et relativement rapide pour étudier la biodisponibilité de Cu. D'autre part, l'utilisation du biotest a permis d'étudier les facteurs pouvant modifier la biodisponibilité de Cu en sols calcaires (déficience en Fe) et des changements induits dans la rhizosphère par l'activité racinaire (modification de l'extractibilité de Cu majoritairement en sols fortement contaminés) sous conditions contrôlées. Toutefois, les résultats obtenus avec le biotest au niveau de l'extractibilité de Cu dans la rhizosphère diffèrent de ceux observés *in situ*. Ceci suggère que les activités racinaires et/ou plus encore les activités microbiennes pourraient diverger entre le biotest et les conditions du champ, ce qui modifierait probablement la biodisponibilité de Cu. Une confrontation plus approfondie avec des mesures en cultures en pots ou au champ permettrait de déterminer si les résultats obtenus avec le biotest, en terme de biodisponibilité et de modification de la spéciation et de la disponibilité de Cu dans la rhizosphère, peuvent être extrapolés à des systèmes moins standardisés et plus proches de la réalité.

### **Le blé dur, plante modèle**

En région Languedoc-Roussillon, les symptômes de phytotoxicité (chlorose ferrique induite) observés en sols calcaires par les conseillers agricoles et les agriculteurs concernent essentiellement des céréales et principalement le blé dur qui est la céréale la plus cultivée dans

cette région, représentant 2/3 de la surface céréalière (Braun 2006). Ce travail s'inscrivant dans le contexte agricole de la région Languedoc-Roussillon, le blé dur fut choisi comme plante modèle. D'autre part, des travaux antérieurs avaient montré que le blé dur était plus sensible à la déficience en Fe et en Zn (susceptible d'être induite en sols calcaires) que le blé tendre et surtout l'orge et le seigle (Cakmak et al. 1997, 1998 ; Kalayci et al. 1999 ; Rengel et Römheld 2000a, b). D'ailleurs, Rengel et Römheld (2000b) ont montré que ceci pourrait être en partie relié à une sécrétion plus faible de phytosidérophores par rapport à des espèces moins sensibles. Si les mécanismes d'acquisition de Fe sont impliqués dans l'augmentation de la biodisponibilité de Cu et dans l'apparition d'une phytotoxicité de Cu visible au travers de chloroses ferriques, conformément à notre hypothèse, le blé dur pourrait présenter une sensibilité supérieure à la contamination de Cu en sols calcaires que des espèces moins sensibles à la déficience en Fe comme le blé tendre ou l'orge. Le choix du blé dur comme plante modèle semble donc être adapté pour étudier la phytotoxicité de Cu en sols calcaires chez les céréales.

Le génotype utilisé dans les expérimentations au laboratoire (Acalou), qui était couramment utilisé en Languedoc-Roussillon, a été choisi lors d'une expérimentation préliminaire réalisée en début de thèse (avant le travail effectué sur le terrain) pour sa plus grande sécrétion racinaire de complexants (vraisemblablement des phytosidérophores) par rapport à d'autres cultivars dont Nefer. Les espèces (blé tendre, blé dur et triticale) et les génotypes étudiés dans l'essai conduit conjointement avec ARVALIS ont été choisis par P Grilheres et P Braun d'ARVALIS en fonction de l'importance de leur utilisation dans la région Languedoc-Roussillon.

### **La quantification de la capacité de complexation des exsudats racinaires (phytosidérophores)**

La méthode utilisée dans ce travail pour estimer la capacité de complexation des exsudats racinaires (essai de mobilisation de Cu) avait été employée par de nombreux auteurs pour étudier la sécrétion de phytosidérophores (Treeby et al. 1989 ; Cakmak et al. 1996 ; Rengel et Römheld 2000 ; Tolay et al. 2001 ; Chaignon et al. 2002b) ; mais elle présente des limites comme les autres méthodes indirectes. Elle ne permet pas de distinguer les phytosidérophores des autres composés complexants (sidérophores, acides organiques) ni de quantifier avec justesse les phytosidérophores. Néanmoins, selon l'étude récente de Reichman et Parker (2007), cette méthode qui sous-estime fortement les quantités de complexants (phytosidérophores) sécrétées donne néanmoins des valeurs sensiblement proportionnelles aux valeurs théoriques. Cette étude n'a pas eu pour objectif de quantifier réellement la sécrétion de complexants mais plutôt d'étudier (i) l'impact de la sécrétion de complexants (i.e. phytosidérophores) sur la biodisponibilité de Cu et (ii) la modification des quantités de complexants sécrétés par les racines en lien avec la mise en place d'une déficience en Fe sous phytotoxicité de Cu. L'utilisation de cette méthode indirecte, bien qu'imparfaite, ne devrait ainsi pas avoir faussé les résultats obtenus. Néanmoins, la sous-estimation des quantités réellement sécrétées (moins de 5% de recouvrement estimé avec EDDA et HEDTA, ligands présentant des constantes d'affinité similaires à celles de l'acide 2-déoxymuginéique (DMA) avec Fe, selon Reichman et Parker, 2007) a pu conduire à amoindrir la différence de sécrétion qui a été observée entre les plantes déficientes et non déficientes en Fe par rapport à la différence qui pourrait réellement exister, notamment au plan statistique. D'autre part, cette méthode qui n'estime pas réellement la sécrétion de phytosidérophores ne permet pas d'étudier les complexes formés. Pour compléter cette approche, l'utilisation d'une méthode directe chromatographique permettrait de quantifier précisément les phytosidérophores

sécrétés, voire de déterminer l'importance relative des complexes formés avec différents cations métalliques, particulièrement Cu et Fe (HPLC couplée avec un spectromètre de masse). La quantification directe des phytosidérophores par HPLC était prévue dans ce travail, mais elle n'a pas été réalisée en raison des difficultés rencontrées pour la mise au point (e.g. purification des phytosidérophores) et de l'indisponibilité d'étalons appropriés. Une perspective de ce travail de thèse serait de quantifier directement les phytosidérophores et de déterminer les complexes formés avec Fe et Cu pour pouvoir mettre en évidence l'implication de ces composés dans l'augmentation de la biodisponibilité de Cu et l'augmentation de leur sécrétion sous l'effet de la phytotoxicité de Cu.

### **La déficience en Fe**

Les indicateurs utilisés dans ce travail pour étudier la déficience en Fe, c'est-à-dire les teneurs et les quantités de Fe accumulées dans les plantes ainsi que les symptômes visuels de chloroses internervaires, la notation d'ARVALIS (prenant en compte l'importance des symptômes de chlorose ferrique et la croissance globale des plantes) et l'indice chlorophyllien (mesuré par un chlorophylle-mètre) ne sont pas suffisamment fins pour déterminer précisément l'induction d'une déficience en Fe sous phytotoxicité de Cu, particulièrement *in situ*. Des analyses moléculaires visant à étudier l'induction de gènes spécifiquement induits sous déficience en Fe, comme les gènes de biosynthèse des phytosidérophores, e.g. nicotianamine synthase (NAS), nicotianamine aminotransférase (NAAT) et deoxymugineic acid synthase (DMAS), ou du transporteur yellow stripe 1 (YS1), devraient permettre de mettre en évidence l'implication (ou non) de la phytotoxicité de Cu dans l'induction d'une déficience en Fe. De telles analyses auraient du être conduites au cours de cette étude mais la mise au point des sondes (amorces des gènes NAAT, DMAS et YS1) n'a pas pu être réalisée à temps. Néanmoins, poursuivre dans cette voie permettrait de conclure sur le rôle joué par Cu dans l'induction d'une déficience en Fe et l'augmentation de la sécrétion de phytosidérophores, comme suggéré par la corrélation positive entre le flux de sécrétion de complexants et le prélèvement de Cu en hydroponie (Chapitre III).

### **Phytotoxicité de Cu chez les céréales**

La phytotoxicité de Cu est connue pour induire une rhizotoxicité et parfois une déficience en Fe avec l'apparition de chlorose ferrique (Marschner 1995). Dans ce travail, la phytotoxicité de Cu a été évaluée au travers de l'apparition de symptômes de chlorose ferrique et de la réduction significative de l'élongation racinaire en lien avec les teneurs en Cu et Fe des parties aériennes et des racines.

#### **Phytotoxicité de Cu en sols calcaires**

Il est généralement admis que l'augmentation du pH dans le sol induit la diminution de la biodisponibilité et de la phytotoxicité des éléments en traces métalliques. Néanmoins, ce travail a montré que, à niveau équivalent de Cu total du sol, le prélèvement de Cu n'était pas supérieur en sols neutres jusqu'à très acides par rapport à des sols calcaires, suggérant que la biodisponibilité de Cu chez le blé dur ne serait pas supérieure à pH acide par rapport à pH alcalin (Chapitre II). Ceci est en accord avec les travaux de Brun et al. (2001) qui n'a pas observé de différence de prélèvement de Cu chez le maïs à partir de sols calcaires et non calcaires. En revanche, il est en désaccord avec les travaux de Chaignon et al. (2002a, 2003) et Cornu et al. (2007) sur tomate et colza : chez ces espèces dicotylédones, à même niveau de

Cu total dans le sol, une plus forte contamination des plantes était observée dans les sols les plus acides, comparativement aux sols calcaires. D'autre part, ce travail a mis en évidence que la phytotoxicité de Cu, visible au travers de symptômes de chlorose ferrique, pourrait apparaître chez le blé dur en sols calcaires, y compris à des niveaux modérés de contamination de Cu (supérieurs à environ  $100 \text{ mg Cu kg}^{-1}$ ). Les plantes présentant ces symptômes de phytotoxicité avaient de plus fortes teneurs en Cu (surtout dans les racines) et de plus faibles teneurs en Fe dans les racines par rapport à des plantes sans symptômes de phytotoxicité. De plus, ces plantes avaient également de plus fortes teneurs en Cu symplasmique et de plus faibles teneurs en Fe dans les racines après extraction par HCl (0,01 M) de Cu apoplasmique par rapport à des plantes sans symptôme (Annexes 5). D'autre part, comme pour les teneurs totales en Fe et Cu des racines (Chap. II.1), un antagonisme est observé entre Fe et Cu en considérant les teneurs en Fe des racines après extraction par HCl et les teneurs en Cu symplasmique (Annexes 5). Cet antagonisme entre Cu et Fe pourrait être en partie à l'origine du lien entre phytotoxicité de Cu et déficience induite en Fe chez le blé dur en sols calcaires (point discuté plus loin). En sols non calcaires, aucun symptôme de phytotoxicité sur les parties aériennes n'a été observé. Cependant, la récolte du système racinaire n'ayant pas été réalisée de façon quantitative (seule une partie du système racinaire a été échantillonnée), il n'a pas été possible d'étudier la rhizotoxicité de Cu qui aurait pu se produire en sols acides (pH inférieur à 5,5) en raison de la plus forte concentration en espèces ioniques libres dans ces sols par rapport à des sols calcaires. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Coullery (1997) qui avait observé en Suisse une sensibilité à la contamination en Cu des céréales cultivées en sols calcaires à antécédent viticole. La présente étude suggère que la contamination en Cu des sols calcaires à antécédent viticole pourrait avoir un effet préjudiciable sur des céréales comme le blé dur.

Dans ce travail, nous avons observé que le blé dur cultivé en sols calcaires contaminés en Cu présentait des symptômes de chlorose ferrique généralement plus marqués et une notation significativement inférieure par rapport au blé tendre et au triticale (Chapitre II). Le blé dur serait ainsi plus sensible à l'apparition des symptômes de déficience en Fe en sols calcaires contaminés en Cu que le blé tendre et le triticale. Ces observations sont en accord avec les travaux de Cakmak et al. (1997, 1998), Kalayci et al. (1999) et Rengel et Römheld (2000) qui avaient montré que le blé dur était plus sensible que le blé tendre et le triticale à la déficience en Fe et Zn en sols calcaires. Des différences de sensibilité entre génotypes ont également été observées chez le blé dur. Les symptômes de chlorose ferrique observés étaient particulièrement marqués chez le génotype Orлу (blé dur) qui présentait parmi les plus basses notes et indices chlorophylliens. D'ailleurs, les teneurs en Cu observées chez ce génotype à Bayssan dépassaient les seuils de phytotoxicité déterminés dans ce travail pour les parties aériennes et les racines, avec la réserve toutefois que ces déterminations avaient été faites chez un génotype moins sensible, Acalou (Chapitre III). Cependant, ceci n'a pas été observé pour Provenzal, l'autre génotype de blé dur présentant également des symptômes de chlorose ferrique particulièrement marqués. Les travaux de Erenoglu et al. (1996, 1999), Cakmak et al. (1997, 1998, 2001), Kalayci et al. (1999), Rengel et Römheld (2000) et Crowley et al. (2002) ont montré qu'il était difficile d'expliquer les différences de sensibilité à la déficience en Fe et Zn entre espèces et génotypes et qu'une variation de sécrétion de phytosidérophores ne pourrait vraisemblablement pas en être la seule raison. Dans ce travail, les différences de sensibilité observées au travers de la notation et de l'indice chlorophyllien, qui étaient corrélées positivement entre elles, n'ont pas été reliées significativement avec des différences de biomasse des parties aériennes, de teneurs en Cu et Fe ou de quantités accumulées de Cu et Fe dans les parties aériennes. Toutefois, nous avons constaté une diminution significative de la biomasse des parties aériennes et des grains avec l'augmentation de la teneur en Cu des

parties aériennes sur un des deux sites étudiés (à Bayssan mais pas à Vias), ce qui suggère l'implication potentielle de la phytotoxicité de Cu. Nous avons observé un antagonisme entre Fe et Cu et l'implication présumée de la phytotoxicité de Cu dans la mise en place des symptômes de chlorose ferrique (i.e. déficience induite en Fe) dans le premier travail de terrain. Dans le second, nous n'avons pas constaté d'antagonisme entre Fe et Cu, mais la gamme de variation de la teneur en Cu était considérablement plus étroite, cette expérimentation ayant été limitée à deux parcelles. D'autre part, les difficultés rencontrées pour mettre en évidence des relations entre les indicateurs de déficience en Fe et le statut physiologique des plantes (e.g. biomasse des parties aériennes, teneurs en Fe et Cu) pourraient résulter de l'hétérogénéité des résultats obtenus à l'intérieur et entre les deux parcelles. *Une perspective à ce travail serait de tester davantage de géotypes sur des parcelles présentant des propriétés physico-chimiques similaires (e.g. teneur en CaCO<sub>3</sub>, texture, teneur en matières organiques) et des teneurs en Cu proches du fond pédogéochimique et largement plus élevées (supérieures à 200 mg kg<sup>-1</sup>) pour (i) voir si les différences observées entre espèces (blé dur, blé tendre et triticale) et géotypes se vérifient, (ii) essayer de mettre en évidence des relations entre des indicateurs de déficience en Fe et le statut physiologique de la plante et (iii) déterminer si la contamination du sol en Cu est responsable de l'aggravation des risques de déficience en Fe en sols calcaires. Les résultats de ma thèse ouvrent des perspectives intéressantes en matière de sélection variétale et de conseil aux agriculteurs pour faire face aux problèmes de déficience en Fe induite par un excès de Cu dans le sol.*

### **Déficience induite en Fe**

Les symptômes de chloroses internervaires observés *in situ* et au laboratoire aux plus fortes concentrations en Cu dans le sol et en solution étaient typiques de la chlorose ferrique (Mengel et Kirkby 2001). D'ailleurs, les plantes présentant ces symptômes avaient généralement de plus fortes teneurs en Cu et de plus faibles teneurs en Fe que les plantes ne présentant pas ces symptômes. Toutefois, les plantes présentant de tels symptômes *in situ* (Chap. II.1), présentaient des teneurs en Fe dans les parties aériennes largement supérieures à celles généralement rencontrées chez des plantes déficientes en Fe (inférieures à 100 mg kg<sup>-1</sup>). Ceci suggère que les plantes chlorotiques *in situ* pourraient ne pas être déficientes en Fe et/ou que les fortes teneurs en Fe des parties aériennes pourraient provenir de souillures par des particules de sol. Quelques travaux antérieurs avaient également mis en évidence la mise en place d'une déficience induite en Fe avec l'apparition de chloroses ferriques sous phytotoxicité de Cu (Lexmond et van der Vorm 1981 ; Taylor et Foy 1985 ; McBride 2001). Un antagonisme entre Fe et Cu a été observé (Figure 1) (i) au niveau des racines pour les plantes cultivées au champ, suggérant un prélèvement supérieur de Cu au détriment de celui de Fe (Chapitre II) et (ii) au niveau des parties aériennes pour les plantes cultivées en hydroponie suggérant une diminution de la translocation de Fe avec l'augmentation des concentrations en Cu dans les parties aériennes (chapitre III et IV). D'ailleurs, en hydroponie, l'augmentation des concentrations en Cu en solution a entraîné la diminution des concentrations en Fe des parties aériennes, particulièrement pour les plantes cultivées avec une faible concentration en Fe en solution (2 µM), jusqu'à atteindre des valeurs bien inférieures aux teneurs en Fe généralement rencontrées dans des parties aériennes exemptes de symptômes de chlorose ferrique (100 mg kg<sup>-1</sup>)(Chapitre III). L'augmentation de la concentration de Cu en solution et du prélèvement de Cu semblent donc pouvoir induire une déficience en Fe. Parallèlement à la diminution de la teneur en Fe des parties aériennes et à l'augmentation du prélèvement de Cu, la sécrétion racinaire de complexants a significativement augmenté avec la concentration en Cu, sans différence significative entre les plantes cultivées en présence d'une faible (2 µM) et d'une forte concentration de Fe (100



$\mu\text{M}$ )(Chapitre III). L'accroissement de la libération racinaire de complexants pourrait provenir de l'augmentation de la sécrétion de phytosidérophores en réponse à l'induction d'une déficience en Fe sous phytotoxicité de Cu. D'ailleurs, de tels résultats ont été observés pour le cadmium (Cd) par Meda et al. (2007) qui ont trouvé pour du blé cultivé en présence de  $0,2 \mu\text{M}$  Cu sans Fe qu'un ajout de  $25 \mu\text{M}$  Cd en solution entraînait des réponses induites sous déficience en Fe, c'est à dire l'augmentation de l'expression du gène ZmYS1 et de la sécrétion de phytosidérophores. Néanmoins, la rhizotoxicité de Cu pourrait avoir altéré l'intégrité des membranes des cellules racinaires aux plus fortes concentrations en Cu en solution (supérieures à  $1 \mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ ), contribuant ainsi à la libération de complexants par les racines. Le dosage direct des phytosidérophores par chromatographie et le suivi de l'expression de gènes induits sous déficience en Fe permettraient d'affirmer l'implication ou non de la phytotoxicité de Cu dans la mise en place des mécanismes d'acquisition de Fe des graminées sous déficience en Fe, notamment la sécrétion accrue de phytosidérophores.

L'antagonisme observé entre Fe et Cu pourrait résulter d'une compétition entre ces deux métaux à différents niveaux (Figure 2) :

(i) pour la complexation avec les phytosidérophores (dans la rhizosphère): la complexation de Cu pourrait se produire au détriment de celle de Fe, particulièrement en sols calcaires contaminés présentant une plus forte disponibilité de Cu par rapport à celle de Fe (Annexes 4), et entraîner la diminution de l'acquisition de Fe et *in fine* l'augmentation de la biodisponibilité de Cu. Ceci pourrait expliquer l'antagonisme observé au niveau des racines *in situ*.

(ii) pour l'adsorption sur les parois cellulaires (dans l'apoplasme) : l'augmentation de l'adsorption de Cu dans l'apoplasme pourrait diminuer la fraction apoplasmique de Fe qui peut être mobilisée sous déficience en Fe pour couvrir les besoins de la plante, ce qui pourrait accroître les risques de déficience en Fe particulièrement en sols calcaires.

(iii) pour l'absorption dans la plante dans l'hypothèse encore controversée où Cu et Fe, sous forme de chélats avec les phytosidérophores, emprunteraient des transporteurs communs (e.g. YS1)

(iv) dans la plante : la complexation de Cu par des ligands organiques impliqués dans le transport longue distance de Fe (e.g. citrate, nicotianamine) pourrait diminuer la translocation de Fe vers les parties aériennes. Ceci pourrait expliquer en partie l'antagonisme observé au niveau des parties aériennes en cultures hydroponiques.

*Une perspective à ce travail serait de mieux comprendre l'implication de la phytotoxicité de Cu dans la mise en place d'une déficience en Fe (augmentation de la sécrétion de phytosidérophores). L'utilisation d'indicateurs plus sensibles de déficience en Fe que ceux utilisés dans ce travail, comme ceux déterminés à l'aide de la biologie moléculaire pour étudier l'induction de gènes impliqués dans la synthèse des phytosidérophores ou du transporteur du complexe Fe-phytosidérophore, permettrait de préciser l'implication de la phytotoxicité de Cu dans la mise en place d'une déficience en Fe (Figure 2). D'autre part, une autre perspective serait de préciser les mécanismes de l'interaction de Cu avec la stratégie d'acquisition de Fe et de déterminer les sites de compétition potentiels pouvant expliquer l'antagonisme existant entre Cu et Fe. Reichman et Parker (2005) ont montré avec le code de calcul GEOCHEM-PC (Parker et al. 2005) que Cu inhiberait la complexation de Fe avec DMA à des valeurs de pH neutre à alcalin. A l'instar de leurs travaux, l'utilisation de*

la modélisation permettrait d'estimer la compétition entre Cu et Fe (i) pour la complexation avec des ligands organiques (e.g. anions organiques, acides aminés, phytosidérophores) dans la rhizosphère (dans la solution du sol, voire leur implication dans la mobilisation à partir de la phase solide) et dans la plante et (ii) pour l'adsorption dans l'apoplasme (Figure 2). Une telle approche permettrait ainsi d'étudier les sites probables de compétition entre Cu et Fe, ainsi que l'effet potentiellement inhibiteur de Cu envers Fe pouvant conduire à l'induction d'une déficience en Fe.

### Détermination d'indicateurs de phytotoxicité de Cu pertinents

Dans ce travail, les teneurs et les quantités accumulées de Cu dans les racines étaient supérieures à celles obtenues dans les parties aériennes *in situ* et au laboratoire, particulièrement aux plus fortes concentrations en Cu dans le sol et en solution. Par ailleurs, les teneurs et les quantités accumulées de Cu dans les racines variaient avec une plus grande amplitude et davantage en corrélation avec les concentrations de Cu dans le sol que les teneurs et les quantités accumulées dans les parties aériennes. Ces résultats sont en accord avec les observations faites par Brun (1998), Brun et al. (2001), Chaignon (2001), Chaignon et al. (2003) ainsi que Lexmond et van der Vorm (1981), McBride (2001) et Kopittke et Menzies (2006). Ils confirment que les racines sont de meilleurs indicateurs de contamination et de phytotoxicité de Cu que les parties aériennes, y compris pour des plantes cultivées au champ. Ils suggèrent que les plantes sont capables de restreindre de façon assez efficace la translocation de Cu des racines vers les parties aériennes.

L'accumulation racinaire de Cu, *via* l'immobilisation dans l'apoplasme, est un processus d'homéostasie de Cu connu pour augmenter la tolérance des plantes à la toxicité de Cu. Cependant, le principal effet de la phytotoxicité de Cu est la rhizotoxicité. L'accumulation racinaire de Cu peut par conséquent également être à l'origine d'une rhizotoxicité : inhibition globale de l'élongation racinaire, diminution de la ramification et du nombre de poils racinaires (Sheldon et Menzies 2005 ; Kopittke et Menzies 2006). En hydroponie, l'augmentation des concentrations en Cu en solution et dans les racines était reliée avec la diminution significative de l'élongation racinaire et avec l'altération globale de la morphologie du système racinaire. D'ailleurs, une diminution significative de l'élongation racinaire (10-25%) a été observée à un niveau modéré de contamination en Cu des racines s'élevant à 100-150 mg kg<sup>-1</sup> (Chapitre III). La réduction de l'élongation racinaire pourrait être un indicateur pertinent pour étudier la phytotoxicité de Cu, et ce seuil considéré comme une valeur indicative d'une phytotoxicité modérée. Toutefois, la récolte des racines est souvent délicate dans des expérimentations en pots ou *in situ* pour pouvoir utiliser un tel indicateur en vue d'étudier les risques de contamination en Cu. En revanche, la récolte des racines peut permettre d'analyser les teneurs en Cu des racines et ainsi déterminer le niveau de contamination en Cu de la plante si les teneurs admissibles dans les racines sont connues. Ces données étant quasiment inexistantes, ou alors éparses et variables dans la littérature (Chaignon 2001 ; Kopittke et Menzies 2005), nous avons essayé de déterminer *in situ* et surtout au laboratoire, les teneurs en Cu dans les racines qui étaient reliées avec l'apparition de symptômes de phytotoxicité de Cu en vue d'établir des valeurs seuils chez le blé dur. Nous avons obtenu des valeurs seuils concordantes au laboratoire et *in situ* s'élevant à 250-300 mg kg<sup>-1</sup> de matière sèche dans les racines et à 15-20 mg kg<sup>-1</sup> de matière sèche dans les parties aériennes pour l'apparition de symptômes sévères tels que la chlorose ferrique au niveau des parties aériennes (*in situ* et au laboratoire) et l'inhibition au taux de 50% de l'élongation racinaire (au laboratoire) (Figure 1). Mon travail de thèse a permis d'établir des valeurs seuils de phytotoxicité de Cu dans les parties aériennes et surtout dans les racines pouvant être

utilisées pour estimer le niveau de contamination en Cu chez le blé dur. Toutefois, il serait souhaitable de vérifier la validité de ces valeurs seuils ou leur variabilité pour plusieurs géotypes de blé dur et dans des expérimentations en pot plus proches de la réalité.

Les teneurs en Cu qui ont été obtenues dans l'autre expérimentation en hydroponie (chapitre IV) ont atteint jusqu'à  $43 \text{ mg kg}^{-1}$  dans les parties aériennes et  $376 \text{ mg kg}^{-1}$  dans les racines sans apparition de symptôme de chlorose ferrique. Par ailleurs, l'élongation racinaire globale n'a pas significativement diminué avec l'augmentation des concentrations en Cu dans la solution, alors que l'élongation racinaire de certaines classes de racines avait significativement diminué (jusqu'à 60 %). Cette absence de symptôme marqué de phytotoxicité malgré les teneurs atteintes dans les plantes est en désaccord avec les seuils de phytotoxicité déterminés par ailleurs (Chapitre II et III). Toutefois, les conditions expérimentales ont changé entre les expérimentations des chapitres III et IV : les plantes du chapitre IV qui étaient plus âgées d'une semaine par rapport aux plantes du chapitre III étaient cultivées avec le dispositif de culture adapté de Chaignon et Hinsinger (2003), donc avec les racines enfermées dans le dispositif par la toile à bluter. Après la première phase de la culture, la biomasse des racines et des parties aériennes était 4 fois supérieure pour les plantes du chapitre IV par rapport à celles du chapitre III et à la fin de la deuxième phase, la biomasse des plantes du chapitre IV était toujours supérieure à celle du chapitre III, avec une différence amoindrie mais demeurant importante (1,5 fois pour les parties aériennes et 2,8 fois pour les racines). Les plantes du chapitre IV ont donc eu une croissance inférieure pendant le contact avec les différentes concentrations de Cu par rapport à celles du chapitre III (1,4 fois pour les parties aériennes et 2,6 fois pour les racines). Une croissance plus forte des plantes du chapitre III par rapport à celles du chapitre IV pendant le contact avec les différentes concentrations de Cu pourrait expliquer les teneurs des parties aériennes inférieures et donc la mise en place d'une déficience induite en Fe pour les plantes du chapitre III, contrairement à celles du chapitre IV. Néanmoins, la teneur en Fe des racines était largement supérieure pour les plantes du chapitre III par rapport à celles du chapitre IV, ce qui pourrait provenir d'un meilleur prélèvement à partir de la solution puisque les racines croissaient librement dans la solution nutritive contrairement aux plantes du chapitre IV (racines formant un tapis racinaire dense et compact dans le dispositif de culture avec toile à bluter). D'autre part, la croissance des racines a pu être altérée par la contrainte imposée par la toile à bluter, ce qui pourrait expliquer l'absence de diminution globale de l'élongation racinaire avec l'augmentation des concentrations en Cu en solution pour les plantes du chapitre IV par rapport aux plantes du chapitre III qui avaient leurs racines exposées directement à la solution nutritive. Les différences expérimentales entre ces deux cultures hydroponiques pourraient ainsi contribuer à expliquer les différences de teneurs en Fe observées et de réduction de l'élongation racinaire ainsi que l'absence de symptôme de phytotoxicité pour les plantes du chapitre IV.

**Figure 1** Schéma récapitulatif des principales conclusions (PA = parties aériennes, R = racines).

(a) Phytotoxicité de Cu observée chez du blé dur en sols calcaires en lien avec la nutrition en Fe : chlorose ferrique, antagonisme Cu/Fe au niveau des racines (Chapitre II).

Augmentation de Cu soluble dans la rhizosphère (disponibilité), particulièrement dans celle des plantes avec des symptômes de phytotoxicité.

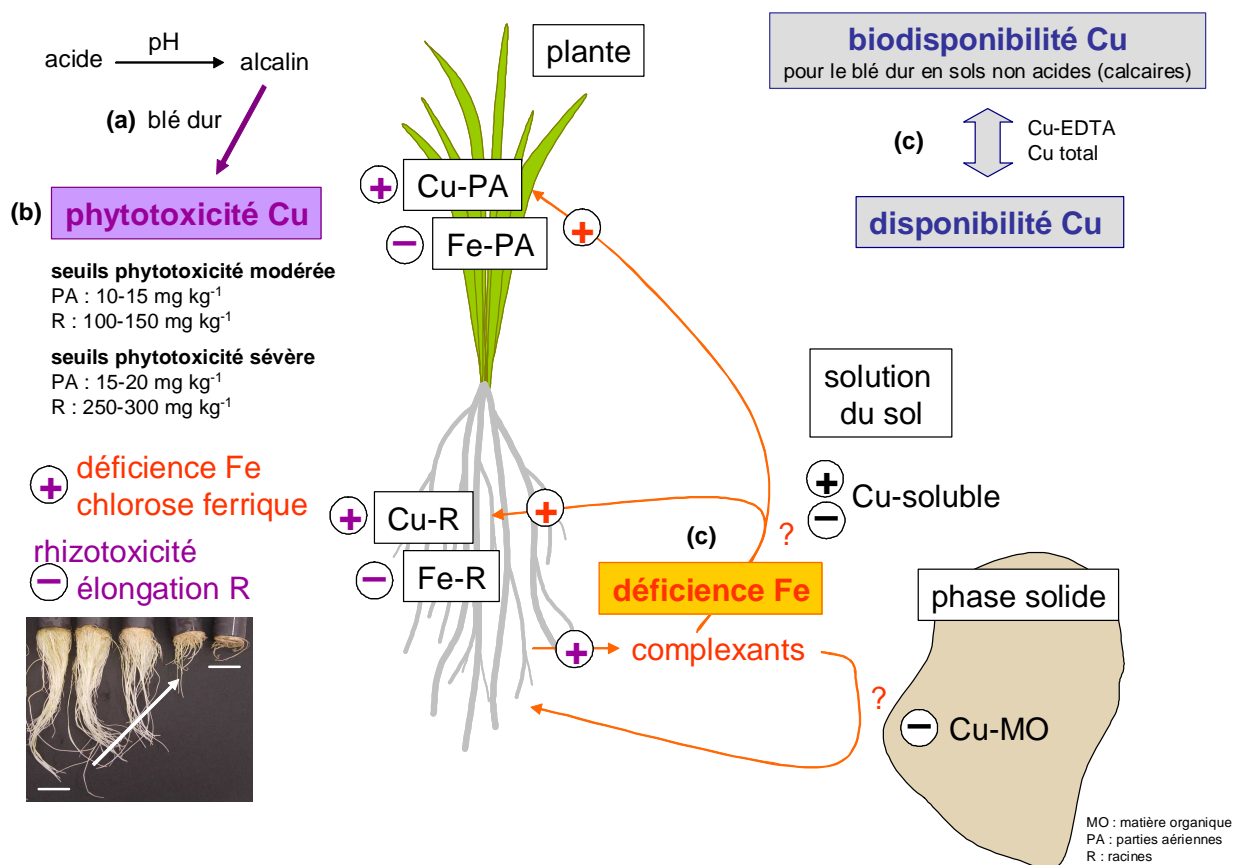
(b) Phytotoxicité de Cu : rhizotoxicité et induction d'une déficience en Fe (antagonisme Cu/Fe avec diminution de Fe des parties aériennes) en lien avec l'augmentation de la libération de complexants (vraisemblablement des phytosidérophores) (Chapitre III).

Détermination de valeurs seuils de phytotoxicité modérée et sévère.

(c) Augmentation de la biodisponibilité de Cu (Chapitre IV) sous déficience en Fe

dans la rhizosphère : diminution de Cu soluble et Cu lié à la matière organique (= MO) (implication des complexants (vraisemblablement des phytosidérophores) ?)

Cu total et Cu-EDTA : bons indicateurs de la biodisponibilité de Cu pour le blé dur en sols non acides (calcaires)



**Figure 2** Schéma montrant l'interaction chez les céréales entre la biodisponibilité, la phytotoxicité de Cu et la nutrition en Fe (mécanismes d'acquisition de Fe), les sites potentiels de compétition entre Cu et Fe et des perspectives envisageables.

(a) Induction d'une déficience en Fe sous phytotoxicité de Cu (augmentation de la sécrétion de phytosidérophores = PS)

*Perspectives : utilisation d'outils de biologie moléculaire pour caractériser l'implication de la phytotoxicité de Cu dans l'induction d'une déficience en Fe (synthèse de phytosidérophores, transporteur YS1)*

(b) Rôle potentiel de la stratégie d'acquisition de Fe dans l'augmentation de la biodisponibilité de Cu : rôle des phytosidérophores dans la mobilisation Cu à partir de la phase solide, complexation de Cu dans la solution du sol ?

augmentation du prélèvement de Cu sous déficience en Fe : Cu prélevé sous forme libre et/ou complexée à des phytosidérophores ?

*Perspectives : utilisation des mutants de maïs YS3 et YS1*

(c) Compétition entre Cu et Fe :

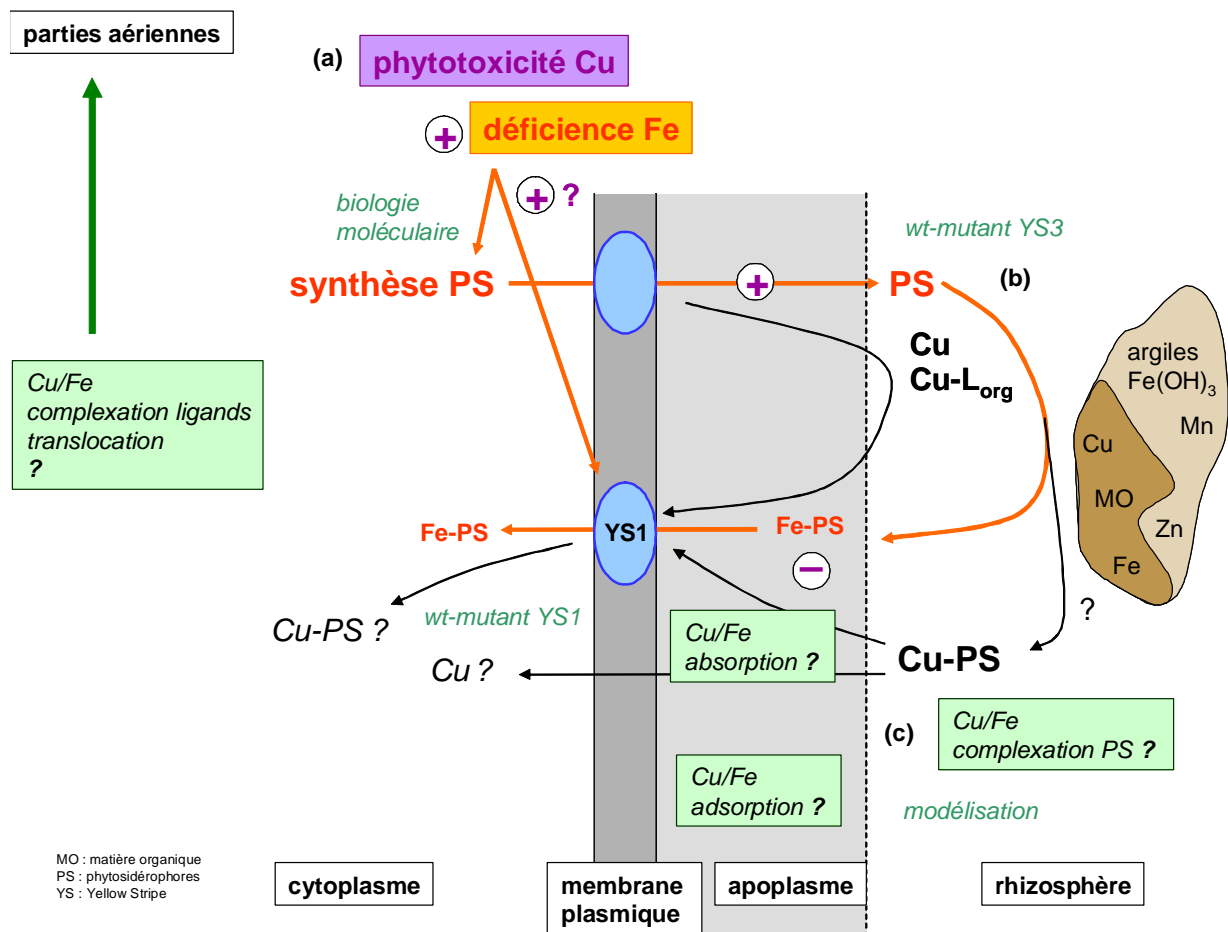
complexation avec les phytosidérophores dans la rhizosphère ?

adsorption dans l'apoplasme ?

absorption dans la plante ?

complexation avec des ligands organiques impliqués dans le transport longue distance de Fe

*Perspectives : modélisation*



## Biodisponibilité de Cu et acquisition de Fe chez les céréales

Dans ce travail, la biodisponibilité de Cu est définie comme le prélèvement (aboutissant à une accumulation ou à un effet) d'un composé par un organisme cible considéré pendant une période de temps fixée à partir d'une unité de masse de sol donnée (Harmsen et al. 2005). La biodisponibilité de Cu a été évaluée à l'aide d'un biotest adapté de celui développé par Chaignon et Hinsinger (2003) au travers du prélèvement de Cu (quantités bioaccumulées) pendant un temps de 8 jours à partir d'une masse de sol de 3 grammes.

### Biodisponibilité *versus* disponibilité

Pour vérifier la validité des mesures chimiques qui renseignent sur la disponibilité environnementale d'un composé en vue d'estimer la biodisponibilité, il est nécessaire de les corréliser avec des mesures biologiques de biodisponibilité (Harmsen et al. 2005 ; ISO 2006). Pour les 22 sols étudiés (dont 20 sols calcaires), la biodisponibilité de Cu estimée avec le biotest a augmenté significativement avec l'augmentation des teneurs en Cu du sol et était corrélée significativement avec plusieurs mesures de disponibilité environnementale de Cu (Chapitre IV) : Cu extrait par l'EDTA (Cu potentiellement disponible) et, dans une moindre mesure, Cu extrait à l'eau (Cu soluble) ou par le  $\text{CaCl}_2$  (Cu soluble et échangeable). La teneur totale dans le sol apporte généralement peu d'information sur la disponibilité des éléments en traces. Cependant, dans ce travail la teneur totale de Cu du sol s'est avérée *a posteriori* être un aussi bon, voire un meilleur indicateur de la biodisponibilité environnementale de Cu que d'autres mesures reflétant davantage la fraction immédiatement et potentiellement disponible (eau,  $\text{CaCl}_2$ , EDTA) (Figure 1). Ces résultats concordent avec les observations déjà faites par Brun et al. (2001) sur maïs, Chaignon et al. (2003) sur tomate et Nolan et al. (2005) sur blé. En revanche, d'autres travaux tels que ceux réalisés par Sauvé et al. (1996) ont montré que Cu total serait un moins bon indicateur de la biodisponibilité de Cu que la concentration en  $\text{Cu}^{2+}$  en solution mesurée à l'électrode spécifique pour la salade, le ray-grass et les radis et ceux effectués par Zhang et al. (2001) ont montré que Cu extractible à l'EDTA était un moins bon indicateur pour *Lepidium heterophyllum* que la concentration en Cu total et  $\text{Cu}^{2+}$  en solution et plus encore que Cu-DGT (Diffuse Gradient in Thin Films). Toutefois, ces diverses études diffèrent tant par les niveaux de contamination, la gamme de types de sol étudiés et l'espèce végétale considérée. Il serait intéressant de tester une plus large gamme de types de sols et de mettre en œuvre ces autres approches physico-chimiques de la disponibilité environnementale pour évaluer lesquelles sont les plus robustes dans le cas de céréales telles que le blé dur.

Les mesures chimiques employées (extractions par EDTA, eau et  $\text{CaCl}_2$ ) présentent toutefois des inconvénients inhérents à leur manque de sélectivité et à la possible surestimation (Cu-eau) ou sous-estimation (Cu- $\text{CaCl}_2$ ) de la fraction visée. Là encore, l'utilisation de la DGT (Diffusive Gradient in Thin Films) qui prend en compte la diffusion du composé et mime l'effet-puits des racines pourrait être une mesure chimique plus appropriée pour estimer la biodisponibilité de Cu (Zhang et al. 2001 ; Song et al. 2004). Toutefois, cette technique présente également des inconvénients puisqu'elle ne prend pas en compte les activités racinaires pouvant modifier la disponibilité environnementale d'un contaminant comme Cu ce qui peut conduire à (i) sous-estimer la biodisponibilité de Cu si les activités racinaires augmentent la disponibilité environnementale via une mobilisation à partir de la phase solide (e.g. sécrétion de phytosidérophores en sols calcaires, Chaignon et al. (2002b) et chapitre IV.I.1) ou (ii) surestimer la biodisponibilité de Cu si des mécanismes de tolérance diminuant la disponibilité environnementale sont mis en place par la plante (e.g. alcalinisation en sols

acides, tel que montré par Cornu et al. (2007) ou, dans le présent travail (Michaud et al. 2007)). D'ailleurs, les travaux de Nowack et al. (2004) avec le ray-grass ont montré que l'approche DGT pourrait sous-estimer le prélèvement de Cu et Zn par la plante. La modélisation de l'acquisition de Cu par la plante en prenant en compte les caractéristiques physico-chimiques du sol déterminant la disponibilité environnementale et les activités racinaires majeures susceptibles de la modifier pourrait être une méthode plus pertinente pour estimer la biodisponibilité de Cu, en intégrant ces modifications de disponibilité, que ne peuvent faire de simples extractions chimiques. Il faut noter que Le Merrer (2007) a mis en défaut le modèle de Barber-Cushman pour rendre compte de l'acquisition de Cu par le blé dur dans des sols contaminés par Cu échantillonnés dans nos parcelles d'étude. Ce modèle réduisant l'action de la plante au niveau de la rhizosphère au seul effet-puits découlant de l'absorption de Cu a conduit à surestimer le prélèvement effectif (de 3 fois en sol calcaire). Cela signifie avant tout que la recherche de l'indicateur chimique universel (y compris les mesures de type DGT) est vaine : il importe davantage de définir le domaine de validité de chacune des approches dont nous disposons, ce qui manque cruellement dans la littérature ; dans quels types de sols, pour quelles espèces végétales tel indicateur est plus performant que tel autre demeure aujourd'hui une question essentielle non résolue.

### **Mécanismes d'acquisition de Fe chez les céréales et biodisponibilité de Cu**

La biodisponibilité de Cu a augmenté significativement sous déficience en Fe dans les deux expérimentations réalisées sur sol sous conditions contrôlées avec le biotest, au même titre que la libération par les racines de complexants (vraisemblablement des phytosidérophores)(Chapitre IV). De tels résultats concordent avec les observations faites par Chaignon et al. (2002b). Le blé dur semble toutefois prélever moins de Cu à partir du sol testé que le blé tendre, qui pourrait résulter d'une plus faible sécrétion de phytosidérophores par rapport au blé tendre (Römheld et Rengel 2000b). La biodisponibilité de Cu serait ainsi supérieure sous déficience en Fe en sols calcaires chez les plantes de stratégie II (e.g. blé dur et blé tendre) mais pas chez des plantes de stratégie I (e.g. la tomate) qui ne sécrètent pas de phytosidérophores (Cornu et al. 2007). Ceci suggère que les mécanismes d'acquisition de Fe des plantes de stratégie II (e.g. sécrétion de phytosidérophores) pourraient être impliqués dans le déterminisme de la biodisponibilité de Cu en sols calcaires pour les céréales et ainsi contribuer à l'expression d'une phytotoxicité de Cu, constatée chez le blé dur en sols calcaires contaminés en Cu.

Des différences de teneurs en Cu et Fe, de biomasses et de quantités bioaccumulées ont été observées entre les deux expérimentations réalisées avec le biotest y compris pour des niveaux similaires de teneurs en Cu dans le sol. La différence d'âge des plantes et des variations des conditions expérimentales (e.g. composition des solutions nutritives, niveau d'éclaircissement) entre les deux expérimentations pourraient être à l'origine de ces différences. Römheld et Rengel (2000b) ont ainsi montré un effet important de l'âge des plantes sur les flux de sécrétion de phytosidérophores. Les teneurs en Cu des plantes déficientes en Fe cultivées avec les sols les plus contaminés (sols 28 et 30 avec 540 et 1030 mg kg<sup>-1</sup>) ont généralement doublé par rapport aux plantes non déficientes en Fe et ont atteint 86 et 112 mg kg<sup>-1</sup> dans les racines et 17 et 16 mg kg<sup>-1</sup> dans les parties aériennes, soit des teneurs proches des seuils de phytotoxicité modérée déterminés dans ce travail (Chapitre III). L'augmentation de la biodisponibilité de Cu sous déficience en Fe pourrait ainsi accroître les risques de phytotoxicité de Cu en sols fortement contaminés (sols 28 et 30). Avec les sols moyennement contaminés (teneur en Cu du sol inférieure à 200 mg kg<sup>-1</sup>), les teneurs en Cu des racines et des parties aériennes n'ont pas atteint les valeurs seuils de phytotoxicité

modérée telles que déterminées en hydroponie (Chapitre III). Le temps de contact avec le sol qui est relativement court (8 jours) pourrait ne pas être suffisant pour induire l'augmentation des teneurs en Cu jusqu'à la manifestation d'une phytotoxicité en sols moyennement contaminés. Une expérimentation pourrait être réalisée avec un temps de contact plus long avec le sol pour déterminer si l'augmentation de la biodisponibilité de Cu sous déficience en Fe peut augmenter les risques de phytotoxicité de Cu en sols calcaires moyennement contaminés. D'ailleurs, Pégon (2007) a constaté que les teneurs en Cu des plantes cultivées 3 semaines en contact avec le sol le plus contaminé de cette étude (échantillon 30 avec 1030 mg Cu kg<sup>-1</sup> dans le sol) étaient largement supérieures à celles des plantes cultivées pendant 8 jours en contact avec ce sol, c'est-à-dire dans les mêmes conditions que dans cette étude. Des symptômes de chlorose ferrique, suggérant la mise en place d'une déficience induite sous phytotoxicité de Cu, ont également été observés par Pégon (2007) pour les plantes cultivées pendant 3 semaines en contact avec le sol mais pas pour les plantes cultivées pendant 8 jours en contact avec le sol. D'autre part, l'utilisation d'espèces de graminées sécrétant davantage de phytosidérophores, comme le blé tendre, l'orge ou le seigle, permettrait également d'étudier plus facilement l'implication de la stratégie d'acquisition de Fe dans la mobilisation de Cu à partir de la phase solide.

### **Changements induits dans la rhizosphère et biodisponibilité de Cu**

La récolte de la rhizosphère *in situ* et l'utilisation du dispositif de culture (biotest) qui offre un accès facile aux parties aériennes, aux racines et à la rhizosphère a permis d'étudier les modifications chimiques de pH, DOC et extractibilité de Cu induites par les racines dans l'environnement immédiat des racines, ou zone bio-influencée par ces dernières. Les résultats obtenus *in situ* ont montré que le blé dur était capable d'alcaliniser la rhizosphère dans les sols non calcaires, particulièrement dans les sols les plus acides (pH inférieur à 5,5) alors qu'il n'induisait aucune modification significative de pH en sols calcaires, vraisemblablement du fait du fort pouvoir tampon de ces sols (Chapitre II). Cette alcalinisation était liée à une diminution de l'extractibilité de Cu par CaCl<sub>2</sub> comme l'avaient observé Cornu et al. (2007) dans le cas de la tomate. Cet effet rhizosphérique pourrait induire une diminution de la fraction potentiellement disponible. Une augmentation significative de Cu soluble (Cu extractible à l'eau) dans la rhizosphère a par ailleurs été observée *in situ*, particulièrement dans la rhizosphère de plantes présentant des symptômes de chlorose ferrique. *In situ*, l'activité racinaire augmenterait la disponibilité environnementale de Cu vraisemblablement par mobilisation à partir de la phase solide. En revanche, avec le biotest, Cu soluble (Cu extractible à l'eau) et Cu lié à la matière organique (Cu extractible par K-pyrophosphate) ont eu tendance à diminuer dans la rhizosphère, en lien avec l'augmentation du prélèvement de Cu par la plante (Chapitre IV). Les modifications d'extractibilité de Cu induites par les racines semblent différer *in situ* et avec le biotest, probablement du fait des conditions expérimentales du biotest. Comme mentionné précédemment, le grossissement artificiel de l'interface sol-racines a pu induire un prélèvement de Cu supérieur à la capacité de réapprovisionnement de la solution du sol à partir de la phase solide dans les sols les plus contaminés (28 et 30) où le prélèvement de Cu par les plantes était significativement supérieur par rapport aux plantes cultivées sur les sols moins contaminés. Par ailleurs, la durée de contact sol-plante qui est relativement courte et le contact sol-racines qui n'est probablement pas suffisamment étroit (séparation physique des racines et du sol) pourraient avoir induit une mobilisation de Cu à partir de la phase solide insuffisante pour augmenter significativement Cu soluble.



Aucune modification significative du pH n'a été observée dans la rhizosphère en sols calcaires. Le changement du pH dans la rhizosphère ne semble pas donc pas pouvoir altérer la spéciation et la disponibilité de Cu chez les céréales en sols calcaires (Chaignon et al. 2002b ; Tao et al. 2004). En revanche, nous nous attendions à trouver une concentration en carbone organique dissous (COD) supérieure dans la rhizosphère en raison de l'activité d'exsudation racinaire de composés organiques (Dakora et Phillips 2001), ainsi que l'avaient montré Cattani et al. (2006) sur maïs en sol calcaire et Courchesne et al. (2006) dans le cas d'arbres forestiers en sols acides. Les valeurs de COD trouvées ici n'ont pas varié significativement entre le sol non planté et dans la rhizosphère (valeurs variant de 55 à 148 mg l<sup>-1</sup> dans le sol non planté et dans la rhizosphère). Avec le biotest, les sols plantés et non plantés avaient été séchés à 35 °C avant de réaliser les mesures, ce qui a pu favoriser la minéralisation des composés organiques et diminuer le COD. Il est possible qu'en sols calcaires, les exsudats soient adsorbés comme ce qui a été observé pour DMA par Reichards et al. (2005), ou précipités comme dans le cas du citrate (Dinkelaker et al. 1989) et plus encore de l'oxalate (Casarin et al. 2004). Les modifications d'extractibilité de Cu observées dans la rhizosphère de blé dur *in situ* et avec le biotest, bien que différentes, peuvent résulter de l'activité racinaire d'exsudation de ligands organiques (acides organiques et aminés). Le rôle joué par les anions organiques sur la mobilisation d'éléments en traces dans le sol semble mineur comparé à celui joué par des complexants plus puissants comme les phytosidérophores sécrétés sous déficience en Fe par les graminées (Callahan et al. 2006). Les sols calcaires, du fait de la faible disponibilité de Fe, peuvent induire une déficience en Fe chez les plantes et les microorganismes y vivant et donc une sécrétion accrue de phytosidérophores et de sidérophores. L'augmentation de la disponibilité de Cu (Cu soluble) dans la rhizosphère *in situ* pourrait résulter de la sécrétion accrue de phytosidérophores en sols calcaires qui pourrait favoriser la mobilisation de Cu à partir de la phase solide (Treeby et al. 1989 ; Zhang et al. 1991 ; Chaignon et al. 2002b). D'ailleurs, Reichman et Parker (2005) ont montré qu'à pH alcalin, la majorité du DMA (phytosidérophore sécrété par le blé) était complexé avec Cu. Dans le biotest, les phytosidérophores ont pu complexer Cu dans la solution du sol et mobiliser Cu à partir de la phase solide diminuant ainsi la fraction de Cu lié à la matière organique (Cu extractible par K-pyrophosphate). Dans les sols calcaires étudiés, la disponibilité environnementale de Cu (Cu-EDTA) était supérieure à celle de Fe (Fe-EDTA) (sauf dans les sols les moins contaminés, i.e. sols 23, 31 et 39) qui était d'ailleurs plus limitée que dans les sols non calcaires (Annexes 4). En sols calcaires contaminés en Cu, les phytosidérophores pourraient complexer majoritairement Cu et le mobiliser à partir de la phase solide augmentant ainsi sa disponibilité au détriment de l'acquisition de Fe. Ceci pourrait aggraver les risques de déficience en Fe et d'apparition de chloroses ferriques, particulièrement dans les sols les plus contaminés présentant une forte disponibilité environnementale en Cu, et expliquer les symptômes observés *in situ* en sols calcaires. D'autre part, la complexation de Cu par des phytosidérophores pourrait augmenter sa biodisponibilité. Ceci pourrait expliquer les plus fortes concentrations de Cu trouvées dans des racines de plantes cultivées en sols calcaires pour un même niveau de Cu total par rapport à des plantes cultivées en sols non calcaires, voire acides (e.g. échantillons 1 et 37). *Une perspective à ce travail serait de préciser le rôle des phytosidérophores, voire l'implication d'autres exsudats (acides organiques et aminés), dans l'augmentation de la biodisponibilité de Cu sous déficience en Fe chez les céréales et de déterminer la forme de Cu prélevée (complexée et/ou libre). D'ailleurs, l'utilisation des mutants de maïs YS3 ne sécrétant pas de phytosidérophores et YS1 qui ne prélève pas le complexe Fe-phytosidérophore permettrait de déterminer l'implication de la stratégie d'acquisition de Fe et le rôle joué par les phytosidérophores dans la mobilisation de Cu à partir de la phase solide et/ou la*

*complexation de Cu en solution ainsi que dans le prélèvement de Cu par le transporteur YSI (Figure 2).*

En sols calcaires à antécédent viticole, l'existence d'une phytotoxicité de Cu reliée à l'apparition de chloroses ferriques pourrait s'expliquer par la conjonction de : (i) la faible disponibilité de Fe et la contamination en Cu de ces sols, (ii) l'implication de la stratégie d'acquisition de Fe propre aux graminées dans l'augmentation de la biodisponibilité de Cu avec la complexation de Cu par les phytosidérophores qui pourrait inhiber l'acquisition de Fe et (iii) l'implication de la phytotoxicité de Cu dans la mise en place d'une déficience induite en Fe. Mes résultats de thèse ont mis en évidence *in situ* qu'il existait une phytotoxicité de Cu chez le blé dur cultivé en sols calcaires contaminés en Cu reliée à une chlorose ferrique qui pourrait résulter de l'antagonisme entre Fe et Cu constaté dans les racines. Ce travail a également permis de déterminer des indicateurs simples et sensibles de phytotoxicité de Cu pouvant être utilisés pour estimer le niveau de contamination de Cu chez le blé dur avec des seuils de Cu dans les racines de 100-150 et 250-300 mg kg<sup>-1</sup> correspondant respectivement à une phytotoxicité de Cu modérée et sévère. D'autre part, mon travail de thèse a montré qu'il existait une interaction complexe entre la nutrition en Fe et la biodisponibilité, ainsi que la phytotoxicité de Cu : la déficience en Fe est responsable d'une augmentation de la biodisponibilité de Cu qui semble liée à la stratégie d'acquisition de Fe des céréales, notamment la sécrétion accrue de phytosidérophores susceptibles de complexer Cu, voire de favoriser son absorption. Dans des sols présentant une faible disponibilité de Fe comme c'est particulièrement le cas des sols calcaires, l'excès de Cu pourrait ainsi aboutir à la mise en place d'une déficience induite en Fe. Toutefois, les processus impliqués dans l'interaction entre la biodisponibilité, la phytotoxicité de Cu et la nutrition en Fe, notamment au niveau de la compétition entre Fe et Cu restent à préciser dans de futurs travaux de recherche.

## Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements aux membres de mon jury de thèse :

Jean-François Briat, Directeur de Recherche au CNRS de Montpellier et Président du jury, pour ses remarques constructives et ses encouragements, quelques soient les circonstances, sa disponibilité et la réorientation du sujet en début de troisième année.

Michel Mench, Directeur de recherche à l'INRA de Bordeaux et rapporteur, pour ses remarques constructives, sa disponibilité et ses encouragements.

Erik Smolders, Professeur à Katholieke Universiteit Leuven et rapporteur, pour ses critiques, la pertinence de ses questions que ce soit en congrès, dans le rapport ou au cours de la soutenance.

Marc Benedetti, Professeur à l'Université Paris 7 et examinateur, pour ses remarques et ses questions parfois gênantes, mais qui m'ont permis d'avancer dans mon travail de recherche de thèse, et sa disponibilité.

Pierre Czernic, Maître de Conférence à l'Université de Montpellier 2 et examinateur, pour ses questions de physiologiste au cours de la soutenance.

Philippe Hinsinger, Directeur de recherche à l'INRA de Montpellier et Directeur de thèse. Philippe, je t'adresse un grand merci pour la justesse de tes remarques, ta disponibilité et ta non disponibilité, qui fut formatrice, pour ton amour de la recherche, ta rigueur et ton perfectionnisme (qui ne me sont pas étrangers). Quand je suis arrivée à R&S, en octobre 2004, certaines personnes m'ont dit : tu as de la chance, tu es entre de « bonnes mains ». Après trois ans, je peux confirmer leurs propos et te remercier d'avoir eu la chance d'apprendre ce qu'était le métier de chercheur à tes côtés. Je te remercie également pour la personne que tu es et pour ta grande simplicité.

Benoît Jaillard, Directeur de l'UMR BSR. En fin de DEA, vous m'avez dit que j'avais l'esprit Montpelliérain. Je ne savais pas vraiment si cela était vrai, mais j'ai compris en travaillant dans l'UMR que j'avais bel et bien l'esprit Montpelliérain et surtout R&Sien puis BSRien... Je vous remercie de m'avoir permis de faire ma thèse dans votre laboratoire avec Philippe. Je vous remercie également pour vos critiques et votre pédagogie.

Je tiens à remercier toutes les personnes m'ayant aidé dans ce projet et plus particulièrement : Alain Allies, Jean-Pierre Barthes, Philippe Braun, Pierre Castillon et Patrice Grilheres d'avoir rendu possible le travail de terrain de par votre expertise et vos conseils.

Laurence Denaix et André Schneider pour les échanges et vos remarques constructives pendant mes comités de pilotages et les réunions de travail.

Cathy Curie, Cécile Fizames et Stéphane Mari pour vos conseils et votre aide.

Françoise Persin et Lionel Ranjard pour votre disponibilité et vos remarques pendant mes comités de pilotage, Alberto Cenci et Jacques David pour votre aide.

Je remercie également Henri de la Boisse, Brigitte Brunel et Edith Lecadre de m'avoir donné la chance de « m'essayer » aux enseignements.

Didier, je t'adresse un énorme merci pour ta belle philosophie de la vie, les discussions que nous avons eues devant le spectro, dans la halle technique, sur des choses essentielles et parfois moins. Je te remercie pour ton écoute et tes « amicales pensées » qui me touchent et que je te rends.

Lucien, tu es d'une simplicité et d'une sensibilité admirables, tu as toujours su écouter et aider les étudiants qui sont passés par cette belle mais dure étape de vie. Merci...

Gérard, je te remercie pour tes remarques, tes conseils et les échanges que nous avons eus pendant ces trois années. Je te remercie également d'avoir partagé certaines de tes passions, la chasse, les bécasses et la peinture. Un jour, tu auras l'occasion de voir ce que moi, l'ancienne thésarde fait à ses temps perdus.

Nicole, je te remercie pour ta bonne humeur, ton soutien et ton aide précieuse. Merci pour les échanges divertissants pendant les arrêts de manip.

Michael, l'expert du labo en chimie, que ferions nous sans toi. Je te remercie pour ta bonne humeur, ta disponibilité et ton esprit brillant.

Claude, simple et brillante. Je te remercie pour ton aide, tes remarques et pour la personne que tu es.

Chère Milène, je te dis merci d'être toi et pour tes « tu es la... ».

Je te remercie également Edith pour tes conseils et ta vision pertinente des choses, Corinne pour ta gaieté et ta disponibilité, Farid pour ta disponibilité et ta gentillesse, Hélène pour ton aide et ta disponibilité, et tous ceux qui contribuent à cette ambiance si particulière de BSR et à sa reconnaissance scientifique.

Je n'oublie pas mes collègues et stagiaires.

Claire-Sophie, tu m'as vu arriver encore toute jeune. Tu as parfois été surprise par mes questions. Je te remercie pour tes conseils, les moments passés à « philosopher » devant des émissions hautement culturelles et ton amitié.

Matthieu, mon collègue, comme je disais, que te dire, juste merci pour ces trois ans, sans toi cette étape de vie m'aurait paru plus dure.

Nora, merci pour ta simplicité et ta bonne humeur. J'espère visiter prochainement l'Algérie.

Je remercie également mes collègues de thèse, Arif, Julien, Nordine, Nicolas et Rami.

Amandine, ma première stagiaire et pas des moindres... Tu as signé pour cette belle expérience qu'est la thèse à mon plus grand étonnement. Je ne me fais aucun souci, tu sais où mettre les priorités. Je te remercie pour ton aide, les venues matinales et les dimanches passés à faire la vaisselle et bien sûr pour ton amitié.

Carole, tu as partagé 15 mois avec moi, ce n'est pas rien. Merci pour ton aide précieuse pendant tous ces mois, ta gaieté et pour le reste que tu sais déjà.

Mauricio, tu as fait la partie la plus laborieuse, mais également la plus divertissante, je te remercie pour ton aide et ta bonne humeur. Je me rappellerai la photo prise à Béziers...

Je remercie aussi toutes les personnes rencontrées en thèse pour leurs conseils, leur écoute et les liens d'amitié.

Pour finir, je remercie grandement mes proches, ma famille et ma belle famille, pour leur soutien et leur présence à tous les instants importants de ma vie. Les derniers mots iront pour toi, qui m'a connu avant tout ceci et qui a accepté tous les sacrifices sans broncher, et même en m'encourageant, en me changeant les idées et en endossant le dur rôle de soupape de sécurité. Tout ceci est aussi grâce à toi...

## Références bibliographiques

---

- Adriano DC (2001) Copper. In: Trace elements in terrestrial environment, biogeochemistry, bioavailability, and risks of metal, 2nd Edition, pp. 499–546
- Afnor (1999) Recueil de Normes Françaises. Qualité des sols. Afnor, Paris
- Agbenin JO and Felix-Henningsen P (2004) Dynamics of copper fractions and solubility in a savanna soil under continuous cultivation. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 68, 117–125
- Aldrich AP, Kistler D and Sigg L (2002) Speciation of Cu and Zn in drainage water from agricultural soils. *Environmental Science & Technology* 36, 4824–4830
- Ali N A, Ater M, Sunahara G I and Robidoux PY (2004) Phytotoxicity and bioaccumulation of copper and chromium using barley (*Hordeum vulgare* L.) in spiked artificial and natural forest soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57, 363–374
- Ali NA, Bernal MP and Ater M (2002) Tolerance and bioaccumulation of copper in *Phragmites australis* and *Zea mays*. *Plant and Soil* 239, 103–111
- Allan DL and Jarrell WM (1989) Proton and copper adsorption to maize and soybean root cell walls. *Plant Physiology* 89, 823–832
- Alloway BJ (1995) Heavy metals in soils. 2nd Edition, Blackie Academic and Professional, London, 368 pp.
- Alva AK, Huang B and Paramasivam S (2000) Soil pH affects copper fractionation and phytotoxicity. *Soil Science Society of America Journal* 64, 955–962
- Arias M, Lopez E and Soto B (2005) Copper distribution and fractionation in aggregate fractions from vineyard soils: Comparison with zinc. *Agrochimica* 49, 60–69
- Arias M, Lopez E, Fernandez D and Soto B (2004) Copper distribution and dynamics in acid vineyard soils treated with copper-based fungicides *Soil Science* 169, 796–805
- Awad F and Römheld V (2000) Mobilization of heavy metals from contaminated calcareous soils by plant borne, microbial and synthetic chelators and their uptake by wheat plants. *Journal of Plant Nutrition* 23, 1847–1855
- Baize D (2000) Guide des analyses en pédologie, 2ème édition revue et augmentée. INRA, Paris, 257 p.
- Baize D and Tercé M (2002) Les éléments traces métalliques dans les sols. Approches fonctionnelles et spatiales. INRA Editions, Paris, 565 p.
- Baker DE and Senft JP (1995) Copper. In: Heavy metals in soils (Alloway Ed), 2nd Edition, Blackie academic & professional, 368 pp.
- Bakkaus E, Collins RN, Morel JL and Gouget B (2006) Anion exchange liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry detection of the  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  complexes of mugineic and deoxymugineic acid. *Journal of Chromatography A* 1129, 208–215
- Bar-Ness E, Hadar Y, Chen Y, Römheld V and Marschner H (1992) Short-term effects of rhizosphere microorganisms on Fe uptake from microbial siderophores by maize and oat. *Plant Physiology* 100, 451–456
- Bashir K, Inoue H, Nagasaka S, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S and Nishizawa NK (2006) Cloning and characterization of deoxymugineic acid synthase genes from Gramineous plants. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 32395–32402
- Bermond A, Varrault G, Sappin-Didier V and Mench M (2005) A kinetic approach to predict soil trace metal bioavailability: preliminary results. *Plant and Soil* 275, 21–29
- Bertrand I and Hinsinger P (2000) Dissolution of iron oxyhydroxide in the rhizosphere of various crop species. *Journal of Plant Nutrition* 23, 1559–1577
- Blamey FP (2001) The role of the root cell wall in aluminium toxicity. *Plant nutrition acquisition: new perspectives, workshop on new concepts of plant nutrient acquisition, Tsukuba, 1998.* pp. 201–226
- Bolan NS, Khan MA, Donaldson J, Adriano DC and Matthew C (2003) Distribution and bioavailability of copper in farm effluent. *Science of the Total Environment* 309 225–236
- Borkert CM, Cox FR and Tucker MR (1998) Zinc and copper toxicity in peanut, soybean, rice, and corn in soil mixtures. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 29, 2991–3005

- Bourelleier PH and Berthelin J (1998) Contamination des sols par les éléments en traces : les risques et leur gestion. Académie des Sciences, Rapport n°42 Août 1998, Lavoisier Tec & Doc, 440 pp.
- Braun P (2006) Diagnostic des accidents du blé dur. ARVALIS - Institut du végétal, Paris
- Briat JF, Fobis-Loisy I, Grignon N, Lobréaux S, Pascal N, Savino G, Thoiron S, von Wirén N and Van Wuytswinkel O (1995) Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. *Biology of the Cell* 84, 69–81
- Brun L (1998) Etude de l'accumulation, de la biodisponibilité et de la phytotoxicité du cuivre dans des sols viticoles de l'Hérault. Thèse Doctorat ENSA.M, Biologie de l'Evolution et Ecologie, 140 p.
- Brun L A, Maillet J, Hinsinger P and Pépin M (2001) Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils. *Environmental Pollution* 111, 293–302
- Bussler W (1981) Physiological functions and utilization of copper. In: *Copper in soils and plants* (Loneragan JF, Robson AD & Graham RD Eds), Academic Press, pp. 213–234
- Cakmak I, Ekiz H, Yilmaz A, Torun B, Köleti N, Gültekin I, Alkan A and Eker S (1997) Differential response of rye, triticale, bread and durum wheats to zinc deficiency in calcareous soils. *Plant and Soil* 188, 1–10
- Cakmak I, Sari N, Marschner H, Ekiz H, Kalayci M, Yilmaz A and Braun HJ (1996) Phytosiderophore release in bread and durum wheat genotypes differing in zinc efficiency. *Plant and Soil* 180, 183–189
- Cakmak I, Torun B, Erenoglu B, Öztürk L, Marschner H, Kalayci M, Ekiz H and Yilmaz A (1998) Morphological and physiological differences in the response of cereals to zinc deficiency. *Euphytica* 100, 349–357
- Cakmak O, Ozturk L, Karanlik S, Ozkan H, Kaya Z and Cakmak I (2001) Tolerance of 65 durum wheat genotypes to zinc deficiency in a calcareous soil. *Journal of Plant Nutrition* 24, 1831–1847
- Cakmak S, Gulut KY, Marschner H and Graham RD (1994) Effect of zinc and iron deficiency on phytosiderophore release in wheat genotypes differing in zinc efficiency. *Journal of Plant Nutrition* 17, 1–17
- Callahan DL, Baker AJM, Kolev SD and Wedd AG (2006) Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 11, 2–12
- Carrillo-Gonzalez R, Simunek J, Sauvé S and Adriano D (2006) Mechanisms and pathways of trace element mobility in soils. *Advances in Agronomy* 91, 113–180
- Casarin V, Plassard C, Hinsinger P and Arvieu JC (2004) Quantification of ectomycorrhizal fungal effects on the bioavailability and mobilization of soil P in the rhizosphere of *Pinus pinaster*. *New Phytologist* 163, 177–185
- Cattani I, Fragoulis G, Boccelli R and Capri E (2006) Copper bioavailability in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) grown in two Italian soils. *Chemosphere* 64, 1972–1979
- Cesco S, Nikolic M, Römheld V, Varanini Z and Pinton R (2002) Uptake of <sup>59</sup>Fe from soluble <sup>59</sup>Fe-humate complexes by cucumber and barley plants. *Plant and Soil* 241, 121–128
- Cesco S, Römheld V, Varanini Z and Pinton R (2000) Solubilization of iron by water-extractable humic substances. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 163, 285–290
- Cetois A, Quesnoit M and Hinsinger P (2003) Soil copper mobility and bioavailability – A review, 110 p.
- Chaignon V (2001) Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées – Cas de sols viticoles contaminés par des fongicides. Thèse Doctorat Aix Marseille III, Discipline Géosciences de l'environnement, 173 p.
- Chaignon V and Hinsinger P (2003) A biotest for evaluating copper bioavailability to plants in a contaminated soil. *Journal of Environmental Quality* 32, 824–833
- Chaignon V, Bedin F and Hinsinger P (2002a) Copper bioavailability and rhizosphere pH changes as affected by nitrogen supply for tomato and oilseed rape cropped on an acidic and a calcareous soil. *Plant and Soil* 243, 219–228
- Chaignon V, Di Malta D and Hinsinger P (2002b) Fe-deficiency increases Cu acquisition by wheat cropped in a Cu-contaminated vineyard soil. *New Phytologist* 154, 121–130
- Chaignon V, Sanchez-Neira I, Herrmann P, Jaillard B and Hinsinger P (2003) Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. *Environmental Pollution* 123, 229–238

- Chaney RL (1980) Health risks associated with toxic metals in municipal sludge. In: Bitton G, Damro DL, Davidson GT, Davidsson JM (Eds), *Sludge: Health risks of land application*. Ann Arbor Science, Ann Arbor, Michigan, pp. 59–83
- Ciscato M, Valcke R, VanLoven K, Clijsters H and Navari-Izzo F (1997) Effects of in vivo copper treatment on the photosynthetic apparatus of two *Triticum durum* cultivars with different stress sensitivity. *Physiologia Plantarum* 100, 901–908
- Clemens S (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212, 475–486
- Cornu JY, Staunton S and Hinsinger P (2007) Copper concentration in plants and in the rhizosphere as influenced by the iron status of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Plant and Soil* 292, 63–77
- Coullery P (1997) Gestion des sols faiblement pollués par des métaux lourds. *Revue Suisse d'Agriculture* 29, 299–305
- Courchesne F, Kruijts N and Legrand P (2006) Labile zinc concentration and free copper ion activity in the rhizosphere of forest soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 635–642
- Crowley D (2001) Function of siderophores in the plant rhizosphere. In: *The rhizosphere, biochemistry and organic substances at the soil-root interface*. Eds Pinto R, Varanini Z and Nannipieri P. Marcel Dekker Inc., pp. 223–261
- Crowley DE, Römheld V, Marschner H and Szaniszlo PJ (1992) Root-microbial effects on plant iron uptake from siderophores and phytosiderophores. *Plant and Soil* 142, 1–7
- Crowley DE, Wu CL, Gries D, Brünn S and Parker DR (2002) Quantitative traits associated with adaptation of three barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars to suboptimal iron supply. 10th International Symposium on iron nutrition and interactions in plants, Houston, Texas, USA, May 2000. *Plant and Soil* 241, 57–65
- Curie C and Briat JF (2003) Iron transport and signaling in plants. *Annual Reviews in Plant Biology* 54, 183–206
- Curie C, Panaviene Z, Loulergue C, Dellaporta SL, Briat JF and Walker EL (2001) Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* 409, 346–349
- Dakora FD and Phillips DA (2002) Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil* 245, 35–47
- Darrah PR (1993) The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. *Plant and Soil* 155/156, 1–20
- Davis RD and Beckett PHT. (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 Phytologist* 80, 23–32
- Degryse F, Smolders E and Parker DR (2006) Metal complexes increase uptake of Zn and Cu by plants: implications for uptake and deficiency studies in chelator-buffered solutions. *Plant and Soil* 289, 171–185
- Delas J (1963) La toxicité du cuivre accumulé dans les sols. *Agrochimica* 7, 258–288
- Delhaize E, Ryan PR, Hebb DM, Yamamoto Y, Sasaki T and Matsumoto H (2004) Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 15249–15254
- Dinkelaker B, Romheld V and Marschner H (1989) Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Cell & Environment* 12, 285–292
- Dučić T and Polle A (2005) Transport and detoxification of manganese and copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 103–112
- Dufey JE, Amory DE and Braun R (1985) Propriétés électriques et sélectivité d'échange ionique des racines. *Pédologie* 35, 231–249
- Erenoglu B, Cakmak I, Marschner H, Römheld V, Eker S, Daghan H, Kalayci M and Ekiz H (1996) Phytosiderophore release does not relate well with zinc efficiency in different bread wheat genotypes. *Journal of Plant Nutrition* 19, 1569–1580
- Erenoglu B, Cakmak I, Romheld V, Derici R and Rengel Z (1999) Uptake of zinc by rye, bread wheat and durum wheat cultivars differing in zinc efficiency. *Plant and Soil* 209, 245–252

- Erenoglu B, Eker S, Cakmak I, Derici R and Römheld V (2000) Effect of iron and zinc deficiency on release of phytosiderophores in barley cultivars differing in zinc efficiency. *Journal of Plant Nutrition* 23, 1645–1656
- Fernandez V, Del Rio V, Abadia J and Abadia A (2006) Foliar iron fertilization of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch): effects of iron compounds, surfactants and other adjuvants. *Plant and Soil* 289, 239–252
- Fett JP, LeVier K and Guerinot ML (1998) Soil microorganisms and iron uptake by higher plants. In: *Iron transport and storage in microbes, plants, and animals*. Eds Winkelmann G, Van der Helm D and Neilands JB, pp. 187–214
- Flores-Velez LM, Ducaroir J, Jaunet AM and Robert M (1996) Study of the distribution of copper in an acid sandy vineyard soil by three different methods. *European Journal of Soil Science* 47, 523–532
- Garcia O (2004) Accumulation du cuivre dans quelques sols viticoles du Languedoc-Roussillon et seuil de toxicité sur vigne. Mémoire de fin d'études Diplôme d'Agronomie Approfondi Spécialisation Viticulture-Œnologie. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier. 31 p.
- Gerke J (2000) Mathematical modelling of iron uptake by graminaceous species as affected by iron forms in soil and phytosiderophore efflux. *Journal of Plant Nutrition* 23, 1579–1587
- Graham RD (1981) Absorption of copper by plant roots. In: *Copper in soils and plants* (Loneragan JF, Robson AD & Graham RD Eds), Academic Press, pp. 141–163
- Gratani (1992) A non-destructive method to determine chlorophyll content of leaves. *Photosynthetica* 26, 469–473
- Gries D, Brunn S, Crowley DE and Parker DR (1995) Phytosiderophore release in relation to micronutrient metal deficiencies in barley. *Plant and Soil* 172, 299–308
- Hammer D and Keller C (2002) Changes in the rhizosphere of metal-accumulating plants evidenced by chemical extractants. *Journal of Environmental Quality* 31, 1561–1569
- Harmsen J, Rulkens W and Eijssackers H (2005) Bioavailability, concept for understanding or tool for predicting? *Land Contamination and Reclamation* 13, 161–171
- Hiltner L (1904) Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und der Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft* 98, 59–78
- Hinsinger P (1998) How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Advances in Agronomy* 64, 225–265
- Hinsinger P (2001) Bioavailability of trace elements as related to root-induced chemical changes in the rhizosphere. In: *Trace elements in the rhizosphere* (Gobran GR, Wenzel WW & Lombi E Eds), CRC Press, pp. 25–41
- Hinsinger P and Courchesne F (2007) Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids at soil-root interface. In *Biophysico-Chemical Processes of Heavy Metals and Metalloids in Soil Environments*. Eds. A Violante, PM Huang and GM Gadd. John Wiley and Sons (in press)
- Hinsinger P, Gobran GR, Gregory PJ and Wenzel WW (2005) Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytologist* 168, 293–303
- Hinsinger P, Plassard C and Jaillard B (2006) Rhizosphere: A new frontier for soil biogeochemistry. *Journal of Geochemical Exploration* 88, 210–213
- Hinsinger P, Plassard C, Tang C and Jaillard B (2003) Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. *Plant and Soil* 248, 43–59
- Hinsinger P, Schneider A and Dufey JE (2004) Le sol, ressource en nutriments. In : *Structure, diversité et fonctions des sols*, Eds Girard JJ, Berthelin J and Rémy JC. pp. 285–305
- Hiradate S and Inoue K (1998) Interaction of mugineic acid with iron (hydr) oxides: sulfate and phosphate influences. *Soil Science Society of America Journal* 62, 159–165
- Imtiaz M, Alloway BJ, Khan P, Memon MY, Siddiqui SUH, Aslam M and Shah SKH (2006) Zinc deficiency in selected cultivars of wheat and barley as tested in solution culture. *Communications in soil science and plant analysis* 37, 1703–1721



- Inoue K, Hiradate S and Takagi S (1993) Interaction of mugineic acid with synthetically produced iron oxides. *Soil Science Society of America Journal* 57, 1254–1260
- ISO (1999) Soil Quality. Guidance on the ecotoxicological characterisation of soils and soil materials. Guidelines no ISO TC 190/SC 7 ISO/DIS 15799. ISO, Geneva, Switzerland
- ISO/DIS 11074-1 (2004) Soil Quality – Vocabulary. Part 1: Terms and definitions relating to the protection and pollution of the soil
- ISO/DIS 17402 (2006) Soil Quality – Guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability in soil and soil materials
- Jones DL (1998) Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant and Soil* 205, 25–44
- Jones DL, Dennis PG, Owen AG and van Hees PAW (2003) Organic acid behavior in soils - misconceptions and knowledge gaps. *Plant and Soil* 248, 31–41
- Juste C (1988) Appréciation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments en traces du sol. *Science du sol* 26, 103–112
- Kabata-Pendias A and Pendias H (1992) Copper. In: Trace elements in soils and plants, 2nd Edition, CRC Press, pp. 95–108
- Kalayci M, Torun B, Eker S, Aydin M, Ozturk L and Cakmak I (1999) Grain yield, zinc efficiency and zinc concentration of wheat cultivars grown in a zinc-deficient calcareous soil in field and greenhouse. *Field Crops Research* 63, 87–98
- Kawai S, Takagi S and Sato Y (1988) Mugineic acid-family phytosiderophores in root-secretions of barley, corn and sorghum varieties. *Journal of Plant Nutrition* 11, 633–642
- Khan MAR, Bolan NS and Mackay AD (2005) Soil test to predict the copper availability in pasture soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 36, 2601–2624
- Kinraide TB, Pedler JF and Parker DR (2004) Relative effectiveness of calcium and magnesium in the alleviation of rhizotoxicity in wheat induced by copper, zinc, aluminum, sodium, and low pH. *Plant and Soil* 259, 201–208
- Kinraide TB, Ryan PR and Kochian LV (1992) Interactive effects of  $Al^{3+}$ ,  $H^+$ , and other cations on root elongation considered in terms of cell-surface electrical potential. *Plant Physiology* 99, 1461–1468
- Kochian LV, Hoekenga OA and Piner MA (2004) How do crop plants tolerate acid soils? - Mechanisms of aluminium tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Reviews in Plant Biology* 55, 459–493
- Kopittke P M and Menzies N W (2006) Effect of Cu toxicity on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant and Soil* 279, 287–296
- Kopittke PM, Asher CJ and Menzies NW (2007) Toxic effects of  $Ni^{2+}$  on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant and Soil* 292, 283–289
- Kraemer SM, Crowley DE and Kretschmar R (2006) Geochemical aspects of phytosiderophore-promoted iron acquisition by plants. *Advances in Agronomy* 91, 1–46
- Lanfranchi S, Basso B and Soave C (2002) The *Yellow stripe* 3 mutant of maize is defective in phytosiderophore secretion. *Maydica* 47, 181–184
- Lang HJ and Reed DW (1987) Comparison of HCl extraction versus total iron analysis for iron tissue analysis. *Journal of Plant Nutrition* 10, 795–804
- Lanno R, Wells J, Conder J, Bradham K and Basta N (2004) The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57, 39–47
- Le Merrer B (2007) Détermination des paramètres cinétiques d'absorption du cuivre par le blé dur en vue de la modélisation de son prélèvement selon l'approche de Barber-Cushman. Stage IUT Département Génie Biologique, Université de Bretagne Occidentale, IUT de Brest. 20 p.
- Lebourg A, Sterckeman T and Ciesielski H (1994) Evaluation de la biodisponibilité des métaux en traces dans les sols au moyen d'extractions chimiques : synthèse bibliographique. AFNOR, Commission X31-Qualité des sols
- Lebourg A, Sterckeman T, Ciesielski H and Proix N (1998) Trace metal speciation in three unbuffered salt solutions used to assess their bioavailability in soil. *Journal of Environmental Quality* 27, 584–590
- Lebourg A, Sterckeman T, Ciesielski H, Proix N and Gomez A (1996) Estimation of soil trace metal bioavailability using unbuffered salt solutions: degree of saturation of polluted soil extracts. *Environmental Technology* 19, 243–252

- Lemanceau P, Robin A, Corberand T and Vansuyt G (2006) Pyroverdine-mediated iron uptake affects plant health and nutrition. 13th International Symposium in Iron Nutrition and Interactions in Plants. pp. 29.
- Lexmond TM and Van der Vorm PDJ (1981) The effect of pH on copper toxicity to hydroponically grown maize. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 29, 217–238
- Leyval C and Joner EJ (2001) Bioavailability of heavy metals in the mycorrhizosphere. In: Trace elements in the rhizosphere (Gobran GR, Wenzel WW & Lombi E Eds), CRC Press, pp. 165–185
- Liao MT, Hedley MJ, Wooley DJ, Brooks RR and Nichols MA (2000) Copper uptake and translocation in chicory (*Cichorium intybus* L. cv Grasslands Puna) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Rondy) plants grown in NFT system. II. The role of nicotianamine and histidine in xylem sap copper transport. *Plant and Soil* 223, 243–252
- Lindsay WL (1979) Chemical equilibria in soils. John Wiley and Sons, 449 p.
- Linehan WL (1984) Micronutrient cation sorption by roots and uptake by plants. *Journal of Experimental Botany* 35, 1571–1574
- Lofts S, Spurgeon DJ, Svendsen C and Tipping E (2004) Deriving soil critical limits for Cu, Zn, Cd, and Pb: A method based on free ion concentrations. *Environmental Science & Technology* 38, 3623–3631
- Lombnaes P and Singh BR (2003) Varietal tolerance to zinc deficiency in wheat and barley grown in chelator-buffered nutrient solution and its effect on uptake of Cu, Fe, and Mn. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 166, 76–83
- Loneragan JF (1981) Distribution and movement of copper in plants. In: Copper in soils and plants. Eds Loneragan JF, Robson AD and Graham RD, Academic Press, pp. 165–187
- Ma JF (2005) Plant root responses to three abundant soil minerals: silicon, aluminium and iron. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24, 267–281
- Ma JF and Nomoto K (1993) Inhibition of mugineic acid-ferrous complex uptake in barley by copper, zinc and cobalt. *Physiologia Plantarum* 89, 331–334
- Ma JF and Nomoto K (1996) Effective regulation of iron acquisition in graminaceous plants. The role of mugineic acids as phytosiderophores. *Physiologia Plantarum* 97, 609–617
- Ma JF, Kusano G, Kimura S and Nomoto K (1993) Specific recognition of mugineic acid-ferrous complex by barley roots. *Phytochemistry* 34, 599–603
- Ma JF, Ryan PR and Delhaize E (2001) Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science* 6, 273–278
- Ma JF, Ueno H, Ueno D, Rombola AD and Iwashita T (2003) Characterization of phytosiderophore secretion under Fe deficiency stress in *Festuca rubra*. *Plant and Soil* 256, 131–137
- Macnicol RD and Beckett PHT (1985) Critical tissue concentrations of potentially toxic elements. *Plant and Soil* 85, 107–129
- Marschner H (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants, 2nd edn. London, UK, Academic Press. 889 p.
- Marschner H (1991) Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. *Plant and Soil* 134, 1–20
- Marschner H, Römheld V and Kissel M (1986) Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *Journal of Plant Nutrition* 9, 695–713
- Marschner H, Römheld V and Kissel M (1987) Localization of phytosiderophore release and of iron uptake along intact barley roots. *Physiologia Plantarum* 71, 157–162
- Marschner H, Treeby M and Römheld V (1989) Role of root-induced changes in the rhizosphere for iron acquisition in higher plants. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 152, 197–204
- McBride MB (1981) Forms and distribution of copper in solid and solution phases of soil. In: Copper in soils and plants. Eds Loneragan JF, Robson AD and Graham RD, Academic Press, pp. 25–45
- McBride MB (1989) reactions controlling heavy metal solubility in soils. *Advances in Soil Science* 10, 1–56
- McBride MB (2001) Cupric ion activity in peat soil as a toxicity indicator for maize. *Journal of Environmental Quality* 30, 78–84
- McBride MB and Bouldin DR (1984) Long-term reactions of copper(II) in a contaminated calcareous soil. *Soil Science Society of America Journal* 48, 56–59

- McLaughlin MJ, Smolders E and Merckx R (1998) Soil-root interface: Physicochemical processes. In: Soil chemistry and ecosystem health. Special Publications no 52 pp. 233–277. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA
- Meda AR, Scheuermann E, Erenoglu B, Schaaf G and von Wirén N (2005) Transcriptional regulation of the iron-phytosiderophore transporter ZmYS1 in dependency of iron supply and heavy metal excess in maize. Plant nutrition for food security, human health and environmental protection. Tsinghua University Press. pp. 658–649
- Meda AR, Scheuermann EB, Prechsl UE, Erenoglu B, Schaaf G, Hayen H, Weber G and von Wirén N (2007) Iron acquisition by phyto siderophores contributes to cadmium tolerance. Plant Physiology 143, 1761–1773
- Mench M (1990) Transfert des oligo-éléments du sol à la racine et absorption. Compte Rendu de l'Académie de Agriculture Française 76, 17–30
- Mench M and Martin E (1991) Mobilization of cadmium and other metals from two soils by root exudates of *Zea mays* L., *Nicotiana tabacum* L. and *Nicotiana rustica* L. Plant and Soil 132, 187–196
- Mench M, Bussiere S, Boisson J, Castaing E, Vangronsveld J, Ruttens A, De Koe T, Bleeker P, Assunção A and Manceau A (2003) Progress in remediation and revegetation of the barren Jales gold mine spoil after in situ treatments. Plant and Soil 249, 187–202
- Mench M, Morel JL, Guckert A and Guillet B (1988) Metal binding with root exudates of low molecular weight. Journal of Soil Science 39, 521–527
- Mengel K and Kirkby EA (2001) Soil copper. In: Principles of plant nutrition, 5th Edition, Kluwer Academic Publishers, pp. 599–611
- Michaud AM, Bravin M, Galleguillos M and Hinsinger P (2007) Copper uptake and phytotoxicity as assessed in situ for durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cultivated in Cu-contaminated, former vineyard soils. Plant and Soil, DOI 10.1007/s11104-007-9343-0
- Mocquot B, Vangronsveld J, Clijsters H and Mench M (1996) Copper toxicity in young maize (*Zea mays* L.) plants: Effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and enzyme activities. Plant and Soil 182, 287–300
- Mori S (1994) Mechanisms of iron acquisition by graminaceous (Strategy II) plants. In: Biochemistry of metal micronutrients in the rhizosphere. Eds Manthey JA, Crowley DE and Luster DG, pp. 225–249
- Mori S, Nakanishi H, Nishizawa NK, Singh K and Sudhakar PC (2001) Molecular physiological approach of plant borne phyto siderophore based iron deficiency stress mechanism (strategy II) for sustained rice productivity under high pH calcareous soils. Recent Res. Devel. Phytochem. 5, 95–107
- Mulligan CN, Yong RN and Gibbs BF (2001) Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. Engineering Geology 60, 193–207
- Murakami T, Ise K, Hayakawa M, Kamei S and Takagi S (1989) Stabilities of metal complexes of mugineic acids and their specific affinities for iron (III). Chemistry letters 2137–2140
- Murata Y, Ma JF, Yamaji N, Ueno D, Nomoto K and Iwashita T (2006) A specific transporter for iron(III)-phyto siderophore in barley roots. The Plant Journal 46, 563–572
- Murphy AS, Eisinger WR, Shaff JE, Kochian LV and Taiz L (1999) Early copper-induced leakage of K<sup>+</sup> from Arabidopsis seedlings is mediated by ion channels and coupled to citrate efflux. Plant Physiology 121, 1375–1382
- Neumann G, Haake C and Romheld V (1999) Improved HPLC method for determination of phyto siderophores in root washings and tissue extracts. Journal of Plant Nutrition 22, 1389–1402
- Nguyen C (2003) Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. Agronomie 23, 375–396
- Nian H, Yang ZM, Ahn SJ, Cheng ZJ and Matsumoto HA (2002) comparative study on the aluminium- and copper-induced organic acid exudation from wheat roots. Physiologia Plantarum 116, 328–335
- Nolan AL, McLaughlin MJ and Mason SD (2003) Chemical speciation of Zn, Cd, Cu, and Pb in pore waters of agricultural and contaminated soils using Donnan dialysis. Environmental Science & Technology 37, 90–98

- Nolan AL, Zhang H and McLaughlin MJ (2005) Prediction of zinc, cadmium, lead, and copper availability to wheat in contaminated soils using chemical speciation, diffuse gradients in thin films, extraction, and isotopic dilution techniques. *Journal of Environmental Quality* 34, 496–507
- Nomoto K, Sugiura Y and Takagi S (1987) Mugineic acids, studies on phytosiderophores. In: Iron transport in microbes, plants, and animals (Winkelmann G, Van der Helm D & Neilands JB Eds), pp. 401–425
- Nowack B, Koehler S and Schulin R (2004) Use of Diffuse Gradients in Thin Films (DGT) in undisturbed field soils. *Environmental Science and Technology* 38, 1133–1138
- Parker DR and Pedler JF (1997) Reevaluating the free-ion activity model of trace metal availability to higher plants. *Plant and Soil* 196, 223–228
- Parker DR, Chaney RL and Norvell WA (1995) Chemical equilibrium models, applications to plant nutrition research. In *Chemical equilibrium and reaction models*. Soil Science Society of America Special Publication No. 42. Madison, WI. Eds. Loeppert RH, Schwab AP and Goldberg S. pp 163–200
- Parker DR, Pedler JF, Thomason DN and Li HY (1998) Alleviation of copper rhizotoxicity by calcium and magnesium at defined free metal-ion activities. *Soil Science Society of America Journal* 62, 965–972
- Parvizi Y, Ronaghi A, Maftoun M and Karimian NA (2004) Growth, nutrient status, and chlorophyll meter readings in wheat as affected by nitrogen and manganese. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 35, 1387–1399
- Pégon JF (2007) Un biotest pour l'estimation de la biodisponibilité et de la phytotoxicité du cuivre pour le blé dur en sols à antécédent viticole. Stage Master 1 Fonctionnement des Ecosystèmes Naturels Et Cultivés, Université de Montpellier 2, 11 p.
- Peijnenburg W, Baerselman R, de Groot A, Jager T, Leenders D, Posthuma L and Van Veen R (2000) Quantification of metal bioavailability for lettuce (*Lactuca sativa* L.) in field soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39, 420–430
- Peijnenburg WJGM and Jager T (2003) Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 63–77
- Peijnenburg WKGM, Posthuma L, Eijsackers HJP and Allen HE (1997) A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 37, 163–172
- Pich A and Scholz G (1996) Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill): Nicotianamine-stimulated copper transport in the xylem. *Journal of Experimental Botany* 47, 41–47
- Pich A, Manteuffel R, Hillmer S, Scholz G and Schmidt W (2001) Fe homeostasis in plant cells: Does nicotianamine play multiple roles in the regulation of cytoplasmic Fe concentration? *Planta* 213, 967–976
- Pietrzak U and McPhail DC (2004) Copper accumulation, distribution and fractionation in vineyard soils of Victoria, Australia. *Geoderma* 122, 151–166
- Pineros MA and Kochian LV (2001) A patch-clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize. Identification and characterization of Al<sup>3+</sup>-induced anion channels. *Plant Physiology* 125, 292–305
- Pineros MA, Magalhaes JV, Alves VMC and Kochian LV (2002) The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. *Plant Physiology* 129, 1194–1206
- Planquart P, Bonin G, Prone A and Massiani C (1999) Distribution, movement and plant availability of trace metals in soils amended with sewage sludge composts: application to low metal loadings *Science of the Total Environment* 241, 161–179
- Puig S, Andres-Colas N, Garcia-Molina A and Penarrubia L (2007) Copper and iron homeostasis in Arabidopsis: response to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. *Plant Cell and Environment* 30, 271–290
- Qin R, Hirano Y and Brunner I (2007) Exudation of organic acid anions from poplar roots after exposure to Al, Cu and Zn. *Tree Physiology* 27, 313–320

- Quartacci MF, Pinzino C, Sgherri CLM, Dalla Vecchia F and Navari-Izzo F (2000) Growth in excess copper induces changes in the lipid composition and fluidity of PSII-enriched membranes in wheat. *Physiologia Plantarum* 108, 87–93
- Ranjard L, Lignier L and Chaussod R (2006) Cumulative effects of short-term polymetal contamination on soil bacterial community structure. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1684–1687
- Reeves DR (2003) Tropical hyperaccumulators of metals and their potential for phytoextraction. *Plant and Soil* 249, 57–65
- Reichard PU, Kraemer SM, Frazier SW and Kretschmar R (2005) Goethite dissolution in the presence of phytosiderophores: Rates, mechanisms, and the synergistic effect of oxalate. *Plant and Soil* 276, 115–132
- Reichman SM and Parker DR (2005) Metal complexation by phytosiderophores in the rhizosphere. In *Biogeochemistry of trace elements in the rhizosphere*. Eds. Huang PM and Gobran GR. Elsevier pp 129–156
- Reichman SM and Parker DR (2007a) Probing the effect of light and temperature on diurnal rhythms of phytosiderophore release in wheat. *New Phytologist* 174, 101–108
- Reichman SM and Parker DR (2007b) Critical evaluation of three indirect assays for quantifying phytosiderophores released by the roots of Poaceae. *European Journal of Soil Science* 58, 844–853
- Rengel Z (1996) Tansley review no 89 - Uptake of aluminium by plant cells. *New Phytologist* 134, 389–406
- Rengel Z and Römheld V (2000a) Differential tolerance to Fe and Zn deficiencies in wheat germplasm. *Euphytica* 113, 219–225
- Rengel Z and Römheld V (2000b) Root exudation and Fe uptake and transport in wheat genotypes differing in tolerance to Zn deficiency. *Plant and Soil* 222, 25–34
- Rengel Z (1997) Root exudation and microflora populations in rhizosphere of crop genotypes differing in tolerance to micronutrient deficiency. *Plant and Soil* 196, 255–260
- Rengel Z, Römheld V and Marschner H (1998) Uptake of zinc and iron by wheat genotypes differing in tolerance to zinc deficiency. *Physiologia Plantarum* 152, 433–438
- Reuter DJ and Robinson JB (1997) *Plant Analysis: an Interpretation Manual*. CSIRO publishing, Australia. 572 p.
- Rieuwerts JS, Thornton I, Farago ME and Ashmore MR (1998) Factors influencing metal bioavailability in soils: preliminary investigations for the development of a critical loads approach for metals. *Chemical Speciation and Bioavailability* 10, 61–75
- Roberts LA, Pierson AJ, Panaviene Z and Walker EL (2004) Yellow stripe1. Expanded roles for the maize iron-phytosiderophore transporter. *Plant Physiology* 135, 112–120
- Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL and Guerinot ML (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* 397, 694–697
- Römheld V (1987) Different strategies for iron acquisition in higher plants. *Physiologia Plantarum* 70, 231–234
- Römheld V and Awad F (2000) Significance of root exudates in acquisition of heavy metals from a contaminated calcareous soil by graminaceous species. *Journal of Plant Nutrition* 23, 1857–1866
- Römheld V and Marschner H (1986) Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. *Plant Physiology* 80, 175–180
- Römheld V and Marschner H (1990) Genotypical differences among graminaceous species in release of phytosiderophores and uptake of iron phytosiderophores. *Plant and Soil* 123, 147–153
- Römken PFAM, Bouwman LA and Boon GT (1999) Effect of plant growth on copper solubility and speciation in soil solution samples. *Environmental Pollution* 106, 315–321
- Rønn R, Gavito M, Larsen J, Jakobsen I, Frederiksen H and Christensen S (2002) Response of free-living soil protozoa and microorganisms to elevated atmospheric CO<sub>2</sub> and presence of mycorrhiza. *Soil Biology & Biochemistry* 34, 923–932
- Rooney CP, Zhao FJ and McGrath SP (2006) Soil factors controlling the expression of copper toxicity to plants in a wide range of European soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 726–732

- Rooney CP, Zhao FJ, McGrath SP (2007) Phytotoxicity of nickel in a range of European soils: Influence of soil properties, Ni solubility and speciation. *Environmental Pollution* 145, 596–605
- Rroco E, Kosegarten H, Harizaj F, Imani J and Mengel K (2003) The importance of soil microbial activity for the supply of iron to sorghum and rape. *European Journal of Agronomy* 19, 487–493
- Sakaguchi T, Nishizawa NK, Nakanishi H, Yoshimura E and Mori S (1999) The role of potassium in the secretion of mugineic acids family phytosiderophores from iron-deficient barley roots. *Plant and Soil* 215, 221–227
- Salam AK and Helmke PA (1998) The pH dependence of free ionic activities and total dissolved concentrations of copper and cadmium in soil solution. *Geoderma* 83, 281–291
- Sancenon V, Puig S, Mateu-Andres I, Dorcey E, Thiele DJ and Penarrubia L (2004) The Arabidopsis copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development. *Journal of Biological Chemistry* 279, 15348–15355
- Sasaki T, Yamamoto Y, Ezaki B, Katsuhara M, Ahn SJ, Ryan PR, Delhaize E and Matsumoto H (2004) A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *The Plant Journal* 37, 645–653
- Sattelmacher B (2001) The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *Tansley review*, 22. *New Phytologist* 149, 167–192
- Sauvé S (2006) Copper inhibition of soil organic matter decomposition in a seventy-year field exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 854–857
- Sauvé S, Cook N, Hendershot WH and McBride MB (1996) Linking plant tissue concentrations and soil copper pools in urban contaminated soils. *Environmental Pollution* 94, 153–157
- Sauvé S, Dumestre A, McBride M and Hendershot W (1998) Derivation of soil quality criteria using predicted chemical speciation of  $Pb^{2+}$  and  $Cu^{2+}$ . *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 1481–1489
- Sauvé S, Hendershot W and Allen HE (2000) Solid-solution partitioning of metals in contaminated soils: dependence on pH, total metal burden, and organic matter. *Environmental Science and Technology* 34, 1125–1131
- Sauvé S, McBride MB and Hendershot WH (1995) Ion-selective electrode measurements of copper(II) activity in contaminated soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 29, 373–379
- Sauvé S, McBride MB, Norvell WA and Hendershot WH (1997) Copper solubility and speciation of in situ contaminated soils: effects of copper level, pH and organic matter. *Water Air and Soil Pollution* 100, 133–149
- Schaaf G, Ludewig U, Erenoglu BE, Mori S, Kitahara T and Von Wirén N (2004a) ZmYS1 functions as a proton – coupled symporter for phytosiderophore- and nicotianamine – chelated metals. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 9091–9096
- Schaaf G, Erenoglu BE and VonWirén N (2004b) Physiological and biochemical characterization of metal-phytosiderophore transport in graminaceous species. *Soil Science and Plant Nutrition* 50, 989–995
- Schaidler LA, Parker DR and Sedlak DL (2006) Uptake of EDTA-complexed Pb, Cd and Fe by solution- and sand-cultured Brassica juncea. *Plant and Soil* 286, 377–391
- Scholl W and Enkelmann R (1984) The copper content of vineyard soils. *Landwirtsch. Forschung* 37, 286–297
- Schramel O, Michalke B and Kettrup A (2000) Study of the copper distribution in contaminated soils of hop fields by single and sequential extraction procedures. *Science of the Total Environment* 263, 11–22
- Schwertmann U (1991) Solubility and dissolution of iron oxides. *Plant and Soil* 130, 1–25
- Seguin V, Gagnon C and Courchesne F (2004) Changes in water extractable metals, pH and organic carbon concentrations at the soil-root interface of forested soils. *Plant and Soil* 260, 1–17
- Sheldon AR and Menzies NW (2005) The effect of copper toxicity on the growth and root morphology of Rhodes grass (*Chloris gayana* Knuth.) in resin buffered solution culture. *Plant and Soil* 278, 341–349
- Shenker M, Hadar Y and Chen Y (1996) Stability constants of the fungal siderophore rhizoferrin with various microelements and calcium. *Soil Science Society of America Journal* 60, 1140–1144

- Shi WM, Chino M, Youssef RA, Mori S and Takagi S (1988) The occurrence of mugineic acid in the rhizosphere soil of barley plant. *Soil Science and Plant Nutrition* 34, 585–592
- Smith SE and Read DJ (1997) Vesicular-arbuscular mycorrhizas. In: *Mycorrhizal symbiosis*, 2nd Edition, Academic Press, pp. 11–160
- Song J, Zhao FJ, Luo YM, Steve P. McGrath and Zhang H (2004) Copper uptake by *Elsholtzia splendens* and *Silene vulgaris* and assessment of copper phytoavailability in contaminated soils. *Environmental Pollution* 128, 307–315
- Stephan UW, Schmidke I, Stephan VW and Scholz G (1996) The nicotianamine molecule is made-to-measure for complexation of metal micronutrients in plants. *BioMetals* 9, 84–90
- Ström L, Owen AG, Godbold DL and Jones DL (2005) Organic acid behaviour in a calcareous soil implications for rhizosphere nutrient cycling. *Soil Biology Biochemistry* 37, 2046–2054
- Suzuki M, Takahashi M, Tsukamoto T, Watanabe S, Matsushashi S, Yazaki J, Kishimoto N, Kikuchi S, Nakanishi H, Mori S and Hishizawa NK (2006) Biosynthesis and secretion of mugineic acid family phytosiderophores in zinc-deficient barley. *The Plant Journal* 48, 85–97
- Takagi S (1976) Naturally occurring iron-chelating compounds in oat- and rice-root washings. I. Activity measurement and preliminary characterization. *Soil Science and Plant Nutrition* 45, 993–1002
- Takagi S (1993) Production of phytosiderophores. In: *Iron chelation in plants and soil microorganisms*. Eds Barton LL and Hemming BC, pp. 111–131
- Takagi S, Kamei S and Yu MH (1988) Efficiency of iron extraction from soil by mugineic acid family phytosiderophores. *Journal of Plant Nutrition* 11, 641–651
- Takagi SI, Nomoto K and Takemoto T (1984) Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plants. *Journal of Plant Nutrition* 7, 469–477
- Takemoto T, Nomoto K, Fushiya S, Ouchi R, Kusano G, Hikino H, Takagi SI, Matsuura Y and Kakudo M (1978) Structure of mugineic acid, a new amino acid possessing an iron-chelating activity from roots washings of water-cultured *Hordeum vulgare* L. *Proceedings of the Japan Academy*, B 54, 469–473
- Tao S, Chen YJ, Xu FL, Cao J and Li BG (2003) Changes of copper speciation in maize rhizosphere soil. *Environmental Pollution* 122, 447–454
- Tao S, Liu WX, Chen YJ, Xu FL, Dawson RW, Li BG, Cao J, Wang XJ, Hu JY and Fang JY (2004) Evaluation of factors influencing root-induced changes of copper fractionation in rhizosphere of a calcareous soil. *Environmental Pollution* 129, 5–12
- Taylor GJ and Foy CD (1985) Differential uptake and toxicity of ionic and chelated copper in *Triticum aestivum*. *Canadian Journal of Botany* 63, 1271–1275
- Thakali S, Allan HE, di Toro DM, Ponizovsky AA, Rooney CP, Zhao FJ, McGrath SP, Criel P, van Eeckhout H, Janssen CR, Oorts K and Smolders E (2006b) *Terrestrial Biotic Ligand Model. 2. Application to Ni and Cu toxicities to plants, invertebrates, and microbes in soil*. *Environmental Science and Technology* 40, 7094–7100
- Thakali S, Allen HE, di Toro D, Ponizovsky AA, Rooney CP, Zhao FJ and McGrath SP (2006a) *A Terrestrial Biotic Ligand Model. 1. Development and application to Cu and Ni toxicities to barley root elongation in soils*. *Environmental Science and Technology* 40, 7085–7093
- Thornton I (1999) Bioavailability of trace metals in the foodchain. In: *Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Conference on the Biochemistry of Trace Elements*. Eds Wenzel WW, Adriano DC, Alloway B, Doner HE, Keller C, Lepp NW, Mench M, Naidu R & Pierzynski GM, 11-15th July 1999, Vienna, Austria
- Tiller KG and Merry RH (1981) Copper pollution of agricultural soils. In: *Copper in soils and plants* Eds Loneragan JF, Robson AD and Graham RD, Academic Press, pp. 25–45
- Tolay I, Erenoglu B, Romheld V, Braun HJ and Cakmak I (2001) Phytosiderophore release in *Aegilops tauschii* and *Triticum* species under zinc and iron deficiencies. *Journal of Experimental Botany* 52, 1093–1099
- Treeby M, Marschner H and Römheld V (1989) Mobilization of iron and other micronutrient cations from a calcareous soil by plant-borne, microbial, and synthetic metal chelators. *Plant and Soil* 114, 217–226
- Tyler G and Olsson T (2001) Concentrations of 60 elements in the soil solution as related to the soil acidity. *European Journal of Soil Science* 52, 151–165

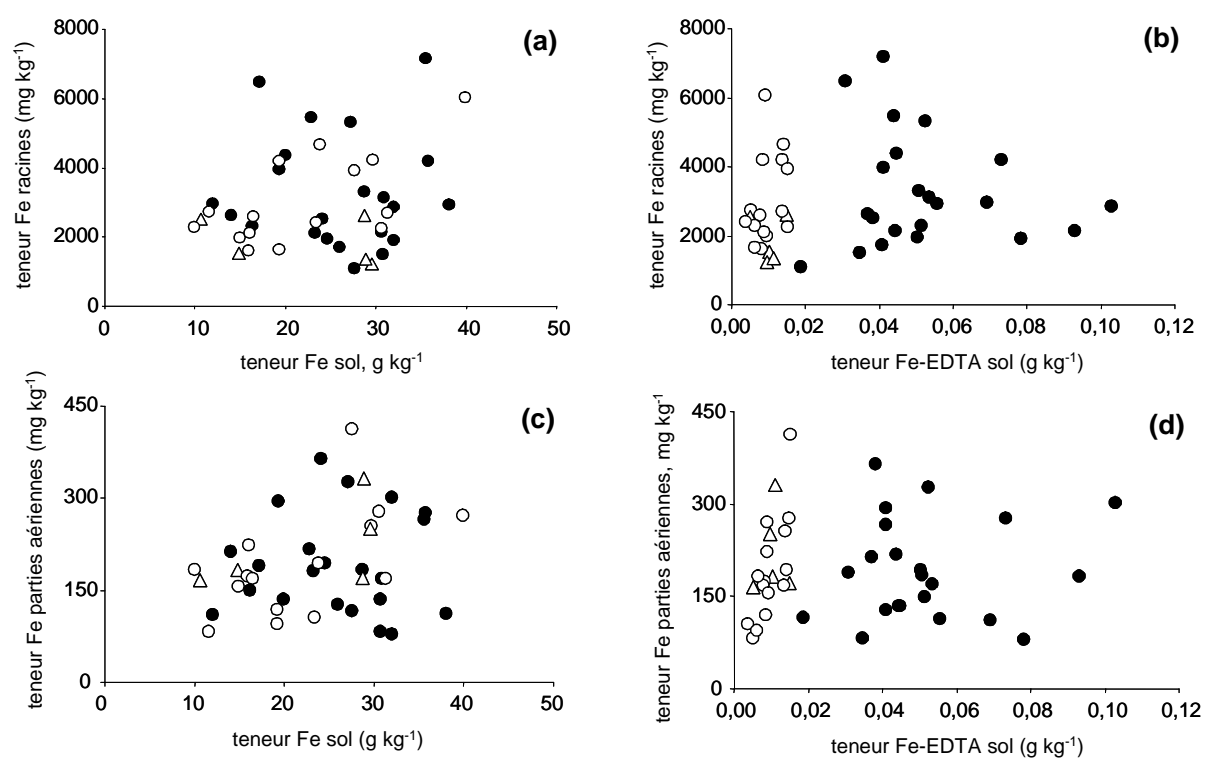
- Ueno D, Rombolà AD, Iwashita T, Nomoto K and Ma JF (2007) Identification of two novel phytosiderophores secreted by perennial grasses. *New Phytologist* 174, 304–310
- Ure AM (1995) Methods of analyses of heavy metals in soils. In: *Heavy metals in soils*. 2nd Edition, Ed. BJ Alloway, Blackie Academic and Professional, London, pp. 40–80
- Uren NC (2001) Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. In: *The rhizosphere, biochemistry and organic substances at the soil-root interface* (Pinto R, Varanini Z & Nannipieri P Eds), Marcel Dekker Inc., pp. 19–39
- van Hees PAW, Jones DL and Godbold DL (2002) Biodegradation of low molecular weight organic acids in coniferous forest podzolic soils. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 1261–1272
- van Hees PAW, Vinogradoff SI, Edwards AC, Godbold DL and Jones DL (2003) Low molecular weight organic acid adsorption in forest soils: effects on soil solution concentrations and biodegradation rates. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 1015–1026
- Vert G, Grotz N, Dédaldéchamp F, Gaymard F, Guerinot ML, Briat JF and Curie C (2002) IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *The Plant Cell* 14, 1223–1233
- Vindimian E (2001) <http://eric.vindimian.9online.fr/> (last access on 08/08/2007)
- von Wirén N, Khodr H and Hider RC (2000) Hydroxylated phytosiderophore species possess an enhanced chelate stability and affinity for iron(III). *Plant Physiology* 124, 1149–1157
- von Wirén N, Marschner H and Römheld V (1995) Uptake kinetics of iron-phytosiderophores in two maize genotypes differing in iron efficiency. *Physiologia Plantarum* 93, 611–616
- von Wirén N, Römheld V, Morel JL, Guckert A and Marschner H (1993) Influence of microorganisms on iron acquisition in maize. *Soil Biology & Biochemistry* 25, 371–376
- von Wirén N, Romheld V, Shioiri T and Marschner H (1995) Competition between micro-organisms and roots of barley and sorghum for iron accumulated in the root apoplasm. *New Phytologist* 130, 511–521
- Vulkan R, Yermiyahu U, Mingelgrin U, Rytwo G and Kinraide TB (2004) Sorption of copper and zinc to the plasma membrane of wheat root. *Journal of Membrane Biology* 202, 97–104
- Vulkan R, Zhao FJ, Barbosa-Jefferson V, Preston S, Paton GI and McGrath SP (2000) Copper speciation and impacts on bacterial biosensors in the pore water of copper-contaminated soils. *Environmental Science and Technology* 34, 5115–5121
- Walker CD and Webb J (1981) Copper in plants: forms and behaviour. In: *Copper in soils and plants* (Loneragan JF, Robson AD & Graham RD Eds), Academic Press, pp. 189–211
- Walter A, Römheld V, Marschner H and Mori S (1994) Is the release of phytosiderophores in zinc-deficient wheat plants a response to impaired iron utilization. *Physiologia Plantarum* 92, 493–500
- Weber G, Neumann G, Haake C and Romheld V (2001) Determination of phytosiderophores by anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography A* 928, 171–175
- Weng L, Lexmond TM, Wolthoorn A, Temminghoff EJM, van Riemsdijk WH (2003) Phytotoxicity and bioavailability of nickel: chemical speciation and bioaccumulation. *Environmental Toxicology & Chemistry* 22, 2180–2187
- Wheeler D M and Power I L (1995) Comparison of plant uptake and plant toxicity of various ions in wheat. *Plant and Soil* 172, 167–173
- Wheeler DM, Power IL and Edmeades DC (1993) Effect of various metal ions on growth of two wheat lines known to differ in aluminium tolerance. *Plant and Soil* 155/156, 489–492
- Wheeler DM, Power IL and Edmeades DC (1993) Effect of various metal-ions on growth of 2 wheat lines known to differ in aluminium tolerance. *Plant and Soil* 156, 489–492
- Woolhouse HW and Walkers S (1981) The physiological basis of copper toxicity and copper tolerance in higher plants. In: *Copper in soils and plants* (Loneragan JF, Robson AD & Graham RD Eds), Academic Press, pp. 235–262
- Xuan Y, Scheuermann EB, Meda AR, Hayen H, von Wirén N and Weber G (2006) Separation and identification of phytosiderophores and their metal complexes in plants by zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 1136, 73–81



- Yehuda Z, Shenker M, Römheld V, Marschner H, Hadar Y and Chen Y (1996) The role of ligand exchange in the uptake of iron from microbial siderophores by gramineous plants. *Plant Physiology* 112, 1273–1280
- Yoshida T, Kawai S and Takagi S (2004) Detection of the regions of phytosiderophore release from barley roots. *Soil Science and Plant Nutrition* 50, 1111–1114
- Young SD, Zhang H, Tye AM, Maxted A, Thums C and Thornton I (2006) Characterizing the availability of metals in contaminated soils. I. The solid phase: sequential extraction and isotopic dilution. *Soil Use and Management* 21, 450–458
- Yruela I (2005) Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 145–156
- Yruela I, Pueyo JJ, Alonso PJ and Picorel R (1996) Photoinhibition of photosystem II from higher plants - Effect of copper inhibition. *Journal of Biological Chemistry* 271, 27408–27415
- Zhang F S, Treeby M, Römheld V and Marschner H (1991) Mobilization of iron by phytosiderophores as affected by other micronutrients. *Plant and Soil*, 130, 173–178
- Zhang H and Young SD (2006) Characterizing the availability of metals in contaminated soils. II. The soil solution. *Soil Use and Management* 21, 459–467
- Zhang H, Davison W, Knight B and McGrath S (1998) In situ measurements of solution concentrations and fluxes of trace metals in soils using DGT. *Environmental Science and Technology* 32, 704–710
- Zhang H, Zhao FJ, Sun B, Davison W and McGrath SP (2001) New method to measure effective soil solution concentration predicts copper availability to plants. *Environmental Science and Technology* 35, 2602–2607
- Zhao FJ, Hamon RE and McLaughlin MJ (2001) Root exudates of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* do not enhance metal mobilization. *New Phytologist* 151, 613–620
- Zhao FJ, Rooney CP, Zhang H and McGrath SP (2006) Comparison of soil solution speciation and diffusive gradients in thin-films measurement as an indicator of copper bioavailability to plants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 733–742

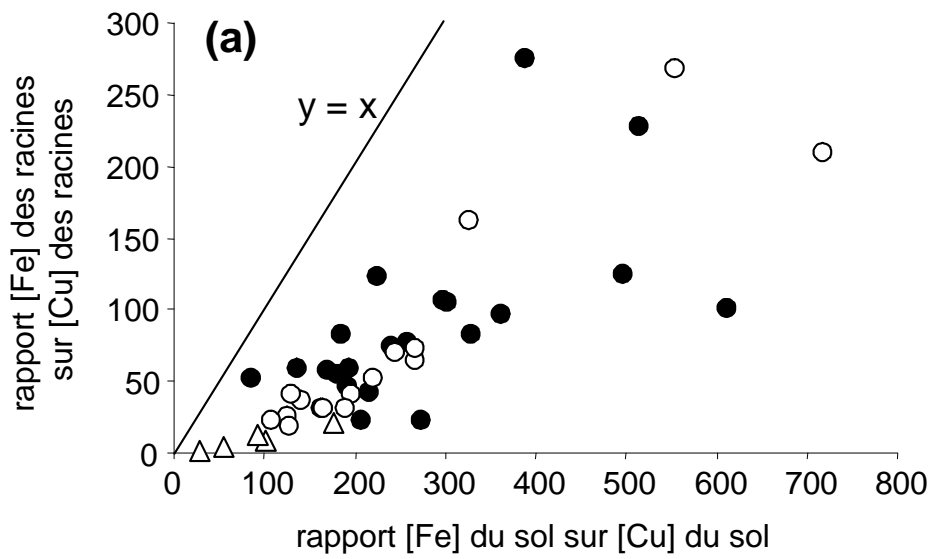
# Annexes

## Annexes 1



Teneur en Fe des racines (a, b) et des parties aériennes (c, d) en fonction de la teneur en Fe du sol (a, c) et de Fe extractible à l'EDTA (b, d). Les ronds blancs correspondent aux sols calcaires, les triangles blancs aux sols calcaires où des symptômes de chlorose internervaire ont été observés et les ronds noirs aux sols non calcaires.

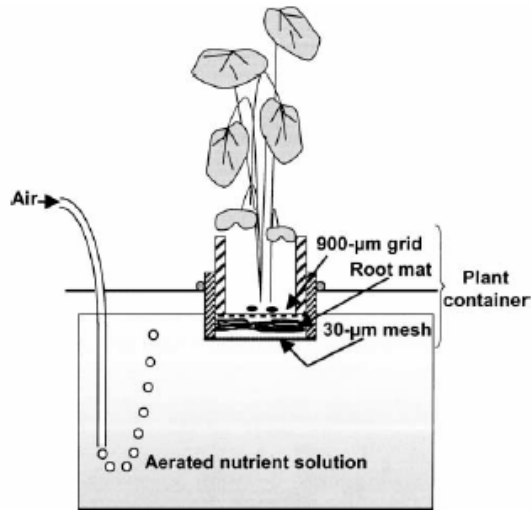
## Annexes 2



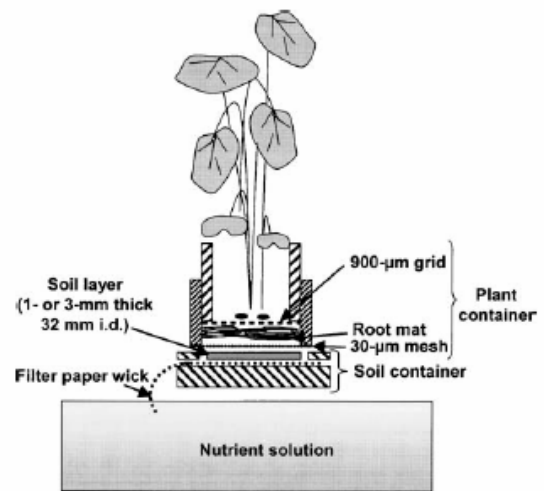
Rapport des teneurs en Fe et Cu des racines en fonction de celui des teneurs en Fe et Cu total du sol. Les ronds blancs correspondent aux sols calcaires, les triangles blancs aux sols calcaires où des symptômes de chlorose internervaire ont été observés et les ronds noirs aux sols non calcaires.

## Annexes 3

### (a) Dispositif de culture de Chaignon et Hinsinger (2003)



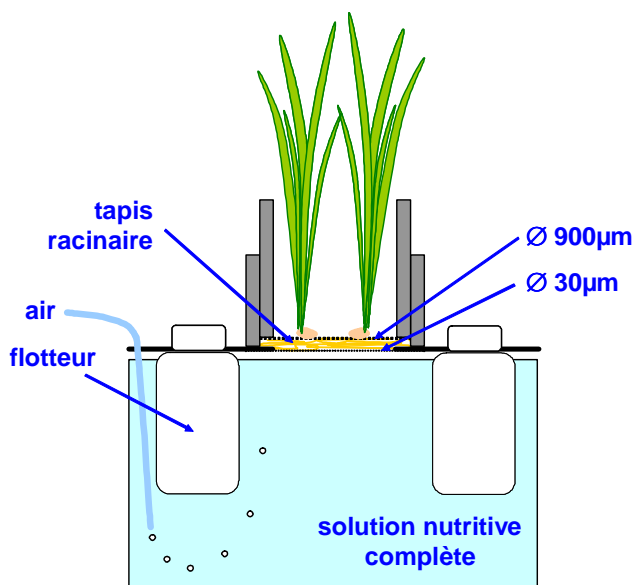
(1) Dispositif utilisé pendant la phase en hydroponie pour obtenir un tapis racinaire dense



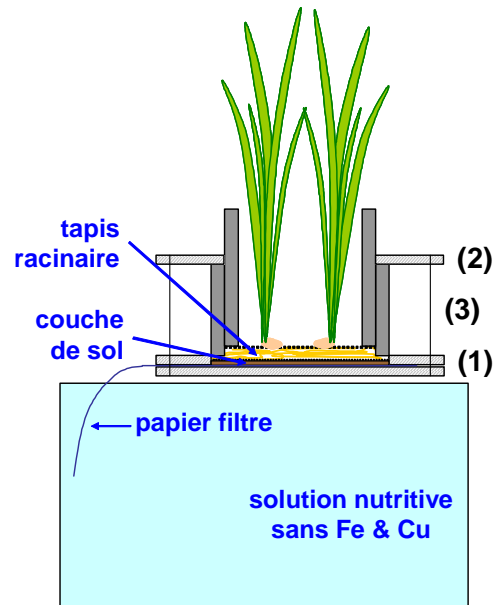
(2) Dispositif utilisé pendant la phase en contact avec le sol

### (b) Dispositif de culture utilisé dans cette étude

#### phase en hydroponie



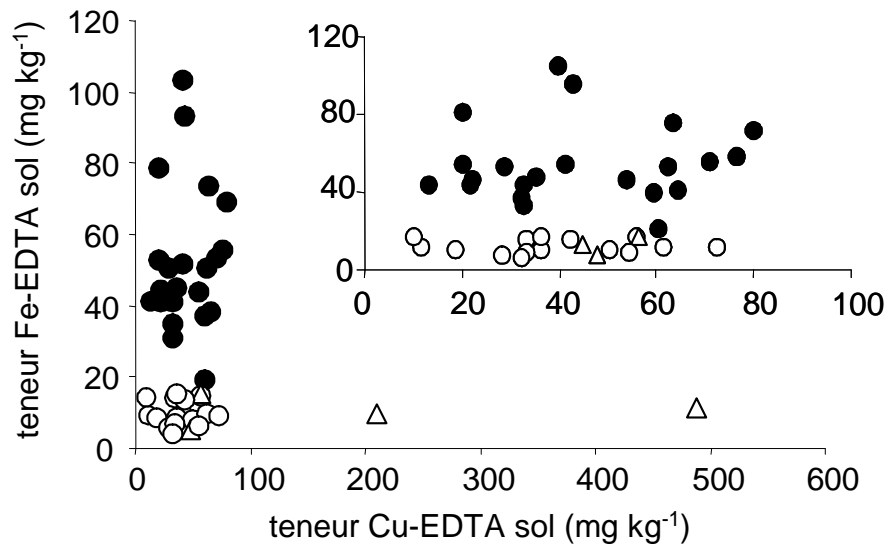
#### phase en contact avec le sol



#### modifications apportées

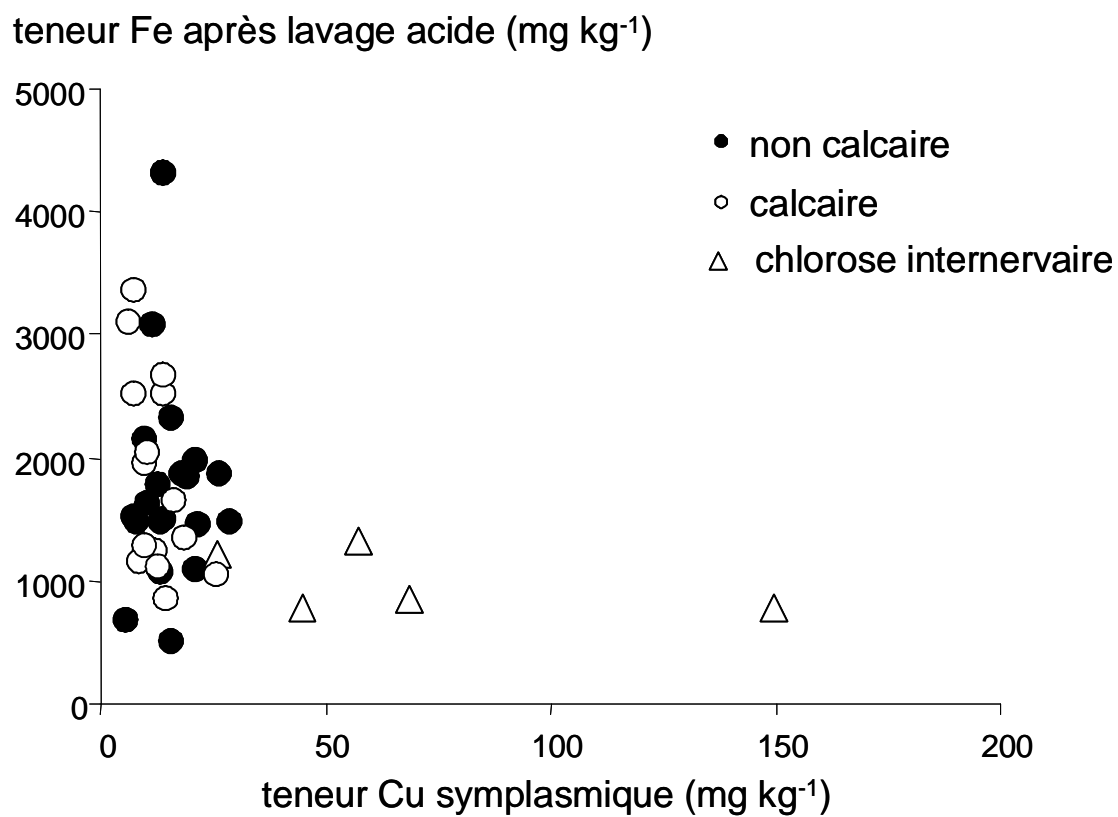
- (1) les deux plaques de PVC formant la base du dispositif ont été agrandies (7 x 7 cm) pour augmenter la stabilité
- (2) plaque de PVC mise en butée sur le dispositif contenant les plantes (gris foncé) et (3) maintenue en légère pression avec les plaques de PVC de la base avec du fil de nylon pour améliorer la qualité du contact sol-racines

## Annexes 4



Fe extractible à l'EDTA en fonction de Cu extractible à l'EDTA. Les ronds blancs correspondent aux sols calcaires, les triangles blancs aux sols calcaires où des symptômes de chlorose internervaire ont été observés et les ronds noirs aux sols non calcaires.

## Annexes 5



Teneur en Fe après extraction de Cu apoplasmique ( $\text{HCl } 0,01 \text{ M}$ ) en fonction de la teneur en Cu symplasmique. Les ronds blancs correspondent aux sols calcaires, les triangles blancs aux sols calcaires où des symptômes de chlorose internervaire ont été observés et les ronds noirs aux sols non calcaires.