



Contribution to the cadmium absorption modeling by sunflower roots (*Helianthus annuus* L.) in relation with root system architecture

Marie-Aline Laporte

► To cite this version:

Marie-Aline Laporte. Contribution to the cadmium absorption modeling by sunflower roots (*Helianthus annuus* L.) in relation with root system architecture. Earth Sciences. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2013. English. NNT : 2013BOR15214 . tel-00960832

HAL Id: tel-00960832

<https://theses.hal.science/tel-00960832>

Submitted on 18 Mar 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET ENVIRONNEMENTS

Par Marie-Aline, LAPORTE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : Géochimie et écotoxicologie

CONTRIBUTION A LA MODELISATION DE L'ABSORPTION DU CADMIUM PAR LES RACINES DU TOURNESOL (*Helianthus annuus* L.) EN RELATION AVEC L'ARCHITECTURE RACINAIRE

Directeur de thèse : M. NGUYEN Christophe
Co-directrice de thèse : Mme DENAIX Laurence

Thèse effectuée à : UMR 1220 INRA-Bordeaux Sciences Agro □ Transfert sol-plante et cycle des éléments minéraux dans les écosystèmes cultivés □.
71, avenue Edouard Bourlaux. CS 20032. 33882 Villenave d'Ornon, FRANCE

Soutenue publiquement le : 20/12/2013

Devant la commission d'examen formée de :

M. BERTHOMIEU, Pierre	Montpellier Sup Agro	Professeur des universités, rapporteur
M. LAURENT, François	INRA	Chargé de recherche (HDR), rapporteur
M. STERCKEMAN, Thibault	INRA	Ingénieur de recherche, examinateur
Mme. DAUGUET, Sylvie	CETIOM	Ingénieur agronome, examinatrice
Mme. DENAIX, Laurence	INRA	Directeur de recherche, co-directeur de thèse
M. NGUYEN Christophe	INRA	Directeur de recherche, directeur de thèse

*Université Bordeaux 1
Les Sciences et les Technologies au service de l'Homme et de l'environnement*

Avant propos

Cette thèse a été effectuée au sein de l'équipe Biogéochimie des éléments traces (Bioget) du laboratoire de recherche Transfert sol-plante et Cycle des Eléments Minéraux dans les écosystèmes cultivés : UMR 1220 TCEM INRA/Bordeaux Sciences Agro, 71 avenue Edouard Bourlaux B.P. 81, F-33883 Villenave d'Ornon, France. Elle fait partie du projet ANR Sim-Traces (ANR 2011 CESA 008 01) portant sur l'élaboration d'un simulateur numérique du transfert sol-organe consommé du Cadmium. Elle a été cofinancée par le département Environnement et Agronomie de l'INRA et par le centre technique interprofessionnel des oléagineux (CETIOM).

Cette thèse a fait l'objet d'un article déjà publié dans la revue *Plant and soil* sous le titre *Longitudinal variation in cadmium influx in intact first order lateral roots of sunflower (Helianthus annuus. L)* (DOI 10.1007/s11104-013-1756-3). Deux autres articles issus de cette thèse, et en composant ses parties sont encore à soumettre.

Remerciements

Je souhaite exprimer ma gratitude à toutes les personnes qui ont joué un rôle important dans la réalisation de ce travail et qui ont permis, d'une manière ou d'une autre, son aboutissement.

Je tiens tout d'abord à remercier Christophe Nguyen, en sa qualité de directeur de thèse, pour avoir su encadrer ce projet, mais aussi pour m'avoir beaucoup appris dans le domaine de la modélisation, et enfin pour m'avoir toujours incité à approfondir mes idées tout en les exprimant avec rigueur.

Pour m'avoir proposé cette thèse, accueillie dans cette unité, et également encadrée lors de ces trois années, je suis également particulièrement reconnaissante à Laurence Denaix.

Pour leurs précieux conseils scientifiques et leurs aides lors de la rédaction des articles, je tiens également à remercier les membres de mes comités de thèse, Francis Flénet, Sylvie Dauguet, Thibault Sterckeman, et Loïc Pagès.

Je tiens également à remercier plus particulièrement Sylvie Dauguet, pour nous avoir fourni toutes les semences nécessaires à la réalisation des expérimentations.

Pour leur aide technique, plus qu'essentielle à la réalisation des expériences et à l'acquisition des données, je remercie vivement Cécile Coriou, Sylvie Bussière, et Stéphane Thunot. Un grand merci pour m'avoir aidé durant toutes ces heures éreintantes. Un grand merci aussi, ainsi qu'à Valérie Sappin-Didier et Florian Delerue, pour votre présence, pour toutes les discussions et les rigolades, et pour votre soutien durant ces trois années.

Pour leur investissement dans la mise au point et la réalisation des protocoles d'observation de coupes de racines au microscope, je souhaite exprimer ma gratitude à Martine Peypelut et Catherine Cheniclet du pôle imagerie de Bordeaux (BIC).

Un grand merci aussi à tous les membres de l'unité avec qui j'ai pu échanger dans un coin de la salle café ou dans un couloir. Merci pour votre bonne humeur qui a rendu les journées plus agréables!

Pour leurs encouragements, leur confiance, leur patience, leur écoute, et leur soutien, un énorme merci à tous mes proches qui m'ont supporté durant ces trois dernières années, qui ont rendu ma vie plus douce et agréable en allégeant le poids du labeur : mes amies Senda Zarrouk, Nathalie Gallegos, et Sarah Martinez, ainsi que ma famille, plus particulièrement ma belle-mère, mon frère, ma belle-sœur, et mon père qui m'a insufflé depuis toute petite l'amour des sciences qui m'a guidé lors de mes études jusqu'à cette thèse. Un grand merci tout particulier pour Jean-Philippe, qui a su me redonner confiance pour avancer, qui a toujours cru en moi beaucoup plus que moi-même, et qui a su faire preuve d'un soutien à toutes épreuves.

Enfin, parce qu'elle a toujours cru en moi, et parce qu'elle m'a appris, avec mon père, à toujours garder l'esprit ouvert et éveillé aux curiosités de ce monde, ce qui m'a amené à m'intéresser à la recherche, je tiens à rendre hommage à ma mère.

Résumé

Le cadmium (Cd) est naturellement présent dans les sols qui sont aussi enrichis par l'activité humaine. Le Cd contamine les produits végétaux alimentaires car il est absorbé par les racines des plantes. Élément toxique pour les organismes vivants, les concentrations dans les produits consommés sont soumises aux réglementations pour l'alimentation humaine et animale. Il est donc nécessaire de comprendre le transfert sol-organe consommé du Cd, spécialement pour le tournesol (*Helianthus annuus* L.), notre plante modèle, pouvant accumuler plus de Cd que d'autres plantes cultivées. Ce travail a testé l'hypothèse que la quantité de Cd absorbée par le système racinaire du tournesol était liée à l'architecture de ce dernier. Nous avons caractérisé au niveau des racines individuelles une variation longitudinale de l'influx d'absorption du Cd^{2+} en lien avec le milieu de culture, l'ordre et l'âge des racines. Ces variations ont été attribuées à la dynamique de développement des barrières apoplasmiques (dépôts de cellulose lignine et subérine) qui limitent l'internalisation du Cd^{2+} dans le cytoplasme cellulaire. Par simulation, il a été montré que ces variations pouvaient théoriquement impacter l'absorption totale de Cd^{2+} en fonction de l'architecture racinaire en hydroponie mais beaucoup moins sur substrat solide (sable). En outre, une comparaison de 14 cultivars de tournesol cultivé en hydroponie a montré que la variabilité des teneurs en Cd dans les parties aériennes était plutôt liée à des différences d'absorption indépendantes de l'architecture racinaire et à des variations de répartition dans la plante. Les variations longitudinales d'absorption du Cd peuvent alors être considérées comme mineures face à des variations inter-cultivars dont l'origine reste à élucider. Dans une optique de modélisation du prélèvement total en conditions de sol, il serait alors possible de ne considérer qu'un influx moyen de Cd pour la totalité du système racinaire indépendamment de son architecture.

Mot clés: Architecture racinaire, cadmium, différences inter-variétales, tournesol, traçage isotopique, variation longitudinale d'influx

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	13
CHAPITRE 1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	19
1.1 Le cadmium.....	21
<i>1.1.1 Généralités.....</i>	<i>21</i>
<i>1.1.2 Le cadmium dans le sol.....</i>	<i>21</i>
<i>1.1.3 La phytodisponibilité du cadmium.....</i>	<i>24</i>
1.2 La contamination des plantes.....	25
<i>1.2.1 Schéma général de circulation du contaminant dans la plante.....</i>	<i>25</i>
<i>1.2.2 L'absorption racinaire du cadmium</i>	<i>30</i>
1.3 L'architecture du système racinaire et ses variations	41
<i>1.3.1 Architecture du système racinaire</i>	<i>41</i>
<i>1.3.2 Variations de l'architecture du système racinaire.....</i>	<i>44</i>
<i>1.3.3 Modélisation du système racinaire</i>	<i>48</i>
1.4 Le tournesol	50
<i>1.4.1 Généralités.....</i>	<i>50</i>
<i>1.4.2 Le cadmium et le tournesol.....</i>	<i>52</i>

1.4.3 Le système racinaire du tournesol	53
CHAPITRE 2. MISE EN EVIDENCE D'UNE VARAITION LONGITUDINALE DE L'INFLUX DE Cd²⁺ CHEZ LES RACINES INDIVIDUELLES DU TOURNESOL (<i>Helianthus annuus</i> L.)	59
CHAPITRE 3. DEPENDANCE DE L'INFLUX RACINAIRE DE Cd²⁺ AU SUBSTRAT DE CULTURE, A L'ORDRE ET L'AGE DE LA RACINE CHEZ LE TOURNESOL (<i>Helianthus annuus</i> L.)	89
CHAPITRE 4. EXISTE-T-IL UNE VARIABILITE D'ACCUMULATION DU Cd ENTRE CULTIVARS DE TOURNESOL ET PEUT-ELLE ETRE ATTRIBUEE A DES DIFFERENCES D'ARCHITECTURE RACINAIRE?	113
CHAPITRE 5. DISCUSSION GENERALE	139
5.1 Regard critique sur les approches expérimentales de détermination de la capacité racinaire d'absorption du Cd ²⁺	142
5.2 Relation entre l'architecture du système racinaire et sa capacité à absorber le cadmium.....	142
5.3 La capacité à absorber le Cd sous le contrôle d'autres déterminants physiologiques?	151
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	153
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	157
Annexe. Article paru dans Plant and soil	175
Abstract.....	193

Liste des tableaux et figures du manuscrit.

Figure 1. Concentrations totales en Cadmium des horizons de surface des sols français.

Figure 2. Schéma représentatif de l'absorption et de la translocation du Cd dans la plante

Figure 3. Développement des barrières apoplsmiques: Cadre de Caspary, lamelles de subérine et parois tertiaires

Figure 3. Schéma représentatif d'un axe racinaire principal et de ses ramifications

Figure 5. Les différents types de systèmes racinaires

Figure 6. Stratification du système racinaire de *Kuhnia glutinosa*

Figure 7. Répartition des surfaces françaises cultivées pour le tournesol en 2008

Figure 8. Schéma représentatif des débouchés économiques des graines de tournesol

Figure 9. Schematic representation of the protocol for studying the axial transfer of ^{109}Cd in first order lateral roots of sunflower

Figure 10. Schematic representation of the root segment sampling pattern for mapping ^{109}Cd influx in first order lateral roots of sunflower

Figure 11. Radioactivity recovered in ~1cm root segments of sunflower first order lateral roots exposed to 500nM ^{109}Cd (approximately 23 kBq per segment) for 5, 10 or 20 min

Figure 12. Influx of Cd^{2+} ($\text{nmol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) in three root segments of first order lateral roots of sunflower as a function of Cd concentration in the solution of exposure

Figure 13. Axial profile of the root absorbing power ($\text{RP, L cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) for Cd^{2+} uptake in first order lateral roots of sunflower

Figure 14. Observed versus simulated values of Cd^{2+} uptake by second order lateral roots of sunflower

Figure 15. Analysis of variance for the simulated uptake of Cd^{2+} by cohorts of first order lateral roots in sunflower

Figure 16. Simulation of Cd^{2+} uptake (μmol) by sunflower first order lateral root cohorts exposed for 24 h to 20 nM Cd

Figure 17. Schematic representation of root segment sampling for mapping ^{109}Cd influx in first and second order lateral roots of sunflower

Figure 18. Influx of Cd^{2+} ($\text{nmol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) in segment n°2 behind the root tip of the first and second order lateral roots of sunflower grown in hydroponics (a and b) or in sand (c and d) as function of Cd concentrations in the solution of exposure

Figure 19. Axial profile of the root absorbing power (RP, $\text{L cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) for Cd^{2+} uptake in first and second order lateral roots of sunflower grown in hydroponics (a) or in sand (b)

Figure 20. Coefficient of variation of variables related to plant growth and to Cd and Zn accumulation for 14 sunflower cultivars grown in hydroponics at 20 nM Cd and 760 nM Zn

Figure 21. Principal component analysis on variables related to plant growth and to Cd and Zn accumulation for 14 sunflower cultivars grown in hydroponics at 20 nM Cd and 760 nM Zn

Figure 22. Relationships between the shoot biomass and the total Cd (a) and Zn (b) accumulation in plant for fourteen sunflower cultivars

Figure 23. Bubble plots of the Cd (a) or Zn (b) concentration in shoots depending on the % of total Cd or Zn recovered in shoots (% Cd shoots, % Zn shoots, respectively) and on the total Cd or Zn accumulated in the whole plant (root+shoot biomass)

Figure 24. Linear relationships between Cd and Zn for the total metals in plant (a) and for the % of total Cd or Zn recovered in shoots (% Cd shoots, % Zn shoots, respectively) (b) for the 14 sunflower cultivars

Figure 25. Coupes transversales de racines, latérales d'ordre 1 de tournesol échantillonnées à six positions derrière l'apex

Figure 26. Correspondance des profils longitudinaux des capacités d'absorption racinaire chez le tournesol et des concentrations racinaires des métabolites chez le maïs (Jones, 1998).

Figure 27. Correspondance des profils de maturation des barrières apoplasmiques chez des racines de maïs (gauche) (Redjala *et al.*, 2009), et des profils des capacités d'absorption chez les racines de tournesol (droite), en hydroponie et sur substrat solide (sable ~ sol).

Figure 28. Impact calculé de la variation longitudinale de l'influx de Cd sur l'influx moyen (RP racinaire moyen) du métal à l'échelle de la racine individuelle

Figure 29. Corrélations entre la quantité de Cd total prélevée et le nombre d'apex (par unité de longueur totale), la surface racinaire, la biomasse racinaire, et la biomasse aérienne pour la totalité des plantes appartenant aux 14 variétés de tournesol testées.

Tableau 1. Gammes de concentrations phytotoxiques de huit ETM recensées par Kopittke *et al* (2010), résultats de 34 ans de littérature.

Table 2. Values of the different parameters tested in the sensitivity analysis of the model that simulates the uptake of Cd^{2+} by first order lateral roots of sunflower by accounting for the longitudinal variation in the root absorbing power (See Eq 7 in materials and methods).

Table 3. Study of the axial movement of cadmium in first order lateral roots of sunflower. The root apex or a segment close to the branching zone was exposed for 5, 10 or 20 min to 500 nM radiolabelled Cd

Table 4. Parameters of the exponential + constant model fitted to the axial profile of the root absorbing power for Cd absorption by first order lateral roots of sunflower

Table 5. Comparison of the root absorbing power of sunflower roots for Cd between sand and hydroponics cultures for the six root segments (Seg1 to Seg6) sampled starting from the root apex (seg1)

Table 6. Effect of some covariables on the root absorbing power of sunflower roots for Cd for sand (S) and hydroponics (H) cultures and for the six root segments (Seg1 to Seg6) sampled starting from the root apex (seg1)

Table 7. Characteristics of the fourteen cultivars of sunflower used in the study

Table 8. Mean and standard deviation between brackets for the growth variables of 14 sunflower cultivars

Table 9. Mean and standard deviation between brackets for the variables related to Cd and Zn accumulation in 14 sunflower cultivars

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Les éléments traces métalliques (ETM) sont des éléments présents en très faibles concentrations dans l'environnement, inférieure à $<0.1\%$ dans le sol et $<0.01\%$ dans les organismes vivants. Certains ETM tels que le cuivre et le zinc sont essentiels à la vie tout en pouvant induire une toxicité lorsqu'ils sont absorbés en trop grandes quantités. D'autres éléments traces n'ont pas de fonction biologique connue et sont toxiques à partir de très faibles concentrations dans les tissus vivants. C'est le cas du cadmium (Cd), élément naturel particulièrement toxique, classé par l'"International Agency for research on cancer" comme agent carcinogène (IARC, 1993). Les cas d'intoxication aiguë de l'homme par le Cd ont déjà été observés, le plus célèbre étant la contamination de l'environnement par une exploitation minière dans la préfecture de Toyama au Japon. La maladie qui en résulte, connue sous le nom de maladie d'Itaï-itaï se traduit par une fragilité osseuse liée à la substitution du calcium des os par le cadmium et par une insuffisance rénale. En dehors des cas intoxications massives, une exposition chronique des populations humaines à de faibles quantités de Cd est également une préoccupation car ce métal est faiblement éliminé par l'organisme, sa demi-vie étant de 20-30 ans. Une exposition chronique est suspectée d'être à l'origine de cancers et de pathologies rénales.

Chez l'homme, la contamination au Cd se fait par inhalation et par ingestion, cette dernière voie étant majoritaire pour les populations non professionnellement exposées et pour les non-fumeurs. En conséquence, de par sa nature hautement toxique, le Cd fait partie des éléments réglementés dans le domaine de l'alimentation animale et humaine. Les commissions de réglementations européennes ont fixé les concentrations maximales de Cd pour certains aliments ou matières premières à destination de l'alimentation animale (2005/87/EC) et humaine (EC/629/2008). A titre d'exemple, la concentration en Cd du tournesol, plante cible de cette étude, ne doit pas dépasser 1 mg kg^{-1} pour l'alimentation animale et 0.05 mg kg^{-1} pour l'alimentation humaine.

Ces réglementations se basent essentiellement sur les recommandations des organisations reconnues de santé la "Food and Agriculture Organisation/World Health Organisation" (FAO/WHO) et l'"European Food Safety Authority" (EFSA) qui conduisent régulièrement des études de risques associant épidémiologie et analyses de l'exposition des populations par

voie alimentaire. Récemment, l'EFSA a renouvelé l'évaluation de l'exposition de la population européenne au Cd par voie alimentaire et elle a conclu que l'ingestion maximale hebdomadaire tolérable devrait être révisée à la baisse à $2,5 \mu\text{g Cd kg}^{-1}$ de poids corporel (EFSA, 2011). Cette recommandation est quasiment trois fois plus basse que la précédente de $7 \mu\text{g Cd kg}^{-1}$ établie par la "Food and Agriculture Organisation/World Health Organisation" (FAO/WHO, 1972). Un projet de révision à la baisse des concentrations maximales autorisées en Cd dans les produits alimentaires est en cours de discussion. Les produits végétaux récoltés devant être conformes aux seuils réglementaires pour être commercialisés, l'étude de la contamination cadmiée des plantes agricoles s'insère donc dans un enjeu économique de notre société actuelle.

La quantité de cadmium retrouvée dans les sols est la résultante du fond pédogéochimique et de la pollution liée aux activités anthropiques. L'altération de la roche mère plus ou moins riche en Cd est le facteur de contamination naturelle des sols. L'épandage d'engrais minéraux, principalement phosphatés, et les retombées atmosphériques, par exemple, contribuent à l'augmentation de la contamination cadmiée des sols. La plus grande partie de la contamination cadmiée des plantes se fait, de manière générale, via l'absorption racinaire du Cd présent dans le sol qui est le réservoir de Cd le plus important auquel la plante est exposée. C'est donc le transfert sol-organe consommé qu'il est nécessaire de comprendre. Pour ce faire, trois points principaux doivent être étudiés : i) la disponibilité du Cd du sol pour la plante (phytodisponibilité), ii) l'absorption par le système racinaire, et iii) l'allocation du Cd aux différents organes. Ce travail de thèse se concentre sur le deuxième point.

L'architecture du système racinaire des plantes est très variable. Elle dépend d'une composante génétique avec des variations entre espèces et même entre variétés d'une même espèce. Le système racinaire modifie également son architecture en fonction des conditions de son environnement, notamment la disponibilité en nutriments et la texture du sol (Becel *et al.*, 2012 ; Loades *et al.*, 2013 ; Weaver, 1926 ; Hodge, 2004 ; Charlton, 1991). Les modifications d'architecture ont des conséquences sur la surface racinaire et sur le nombre de racines. Sachant que l'absorption du Cd se fait au prorata de la surface racinaire et qu'en outre, la capacité d'absorption peut être plus importante vers les extrémités des racines, il est attendu que l'architecture du système racinaire impacte la capacité de ce dernier à prélever de manière

plus ou moins importante le contaminant. C'est l'hypothèse centrale du travail que nous avons conduit.

Nos travaux ont portés sur le tournesol. En France, sur la base de la superficie cultivée, il s'agit de la deuxième plus importante culture oléagineuse derrière le colza. Le tournesol a la particularité d'accumuler assez fortement le Cd (Grant *et al.*, 2008; Li *et al.*, 1997) et peut même être utilisé pour la phytoremédiation (Vangronsveld *et al.*, 2009). Le cadmium des graines de tournesol se retrouve majoritairement dans les tourteaux résultant de la trituration et de l'extraction de l'huile. Ces tourteaux, valorisés en alimentation animale, ont des teneurs en Cd qui s'approchent parfois des seuils réglementaire actuels (Dauguet and Lacoste, 2013).

Ce mémoire présente donc l'étude de la capacité d'absorption du cadmium par le système racinaire du tournesol en relation avec son architecture. La première partie du mémoire synthétise les connaissances liées d'une part au cadmium et à son absorption par les racines, d'autre part à l'architecture des systèmes racinaires, et enfin plus particulièrement à la description de notre plante modèle, le tournesol. La deuxième partie du mémoire aborde l'étude de la variation longitudinale de l'influx en Cd^{2+} à l'échelle de la racine. La troisième partie de cette thèse s'intéresse aux facteurs influençant cette variation longitudinale de l'influx. La quatrième partie porte sur l'étude des relations architecture racinaire – prélèvement total en Cd^{2+} et concentration en Cd dans les parties aériennes pour un panel de 14 cultivars de tournesol. Enfin, la dernière partie de cette thèse présente une réflexion générale en rapport avec les résultats de tous les travaux.

CHAPITRE 1.
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

1.1 Le cadmium

1.1.1 Généralités

Le cadmium peut se trouver sous différentes formes chimiques dans l'environnement, dont sa forme libre Cd^{2+} . Ses principaux composés sont le chlorure de cadmium (CdCl_2), l'oxyde de cadmium (CdO), le sulfate de cadmium (CdSO_4), le bicarbonate de cadmium ($\text{Cd}(\text{HCO}_3)_2$), le carbonate de cadmium (CdCO_3), le phosphate de cadmium ($\text{Cd}_3(\text{PO}_4)_2$), le sulfure de cadmium (CdS), ainsi que sous forme complexée à la matière organique (Adriano, 2001 ; Boruvka *et al.*, 1997 ; Krishnamurti *et al.*, 1997 ; Ross, 1995).

Même si cet élément est souvent retrouvé comme déchet contaminant de la métallurgie du zinc (Zn), il présente cependant de nombreuses utilisations. Le cadmium est principalement utilisé pour la protection des surfaces métalliques contre la corrosion. Il est aussi un élément essentiel de certains pigments, d'accumulateurs électriques tels que les batteries rechargeables Ni-Cd, et de certains alliages. Il sert également de stabilisant pour la fabrication de plastiques polyvinyl (Adriano, 2001; Bisson *et al.*, 2011). Outre ces principales utilisations, on peut également le retrouver dans les produits pour la photographie, comme fongicide, ou encore comme durcisseur de caoutchoucs (Adriano, 2001).

1.1.2 Le cadmium dans le sol

Le Cd est un élément naturellement présent dans les sols, constitutif de la roche mère et résultant de l'altération de celle-ci. La concentration moyenne du Cd la plus fréquemment reportée dans la croûte terrestre est de 0.15 à 0.20 mg kg^{-1} (Adriano, 2001). Les roches les moins riches en Cd sont les roches magmatiques (basaltiques et granitiques), avec en moyenne 0.082 mg Cd kg^{-1} de roche, et les plus riches sont les roches sédimentaires (carbonates, schistes, limons), présentant en moyenne 3.42 mg Cd kg^{-1} de roche, exceptés les sables et grès qui sont également très pauvres (Adriano, 2001; Baize and Sterckeman, 2001; Nagajyoti *et al.*, 2010). En conséquence, les sols agricoles les plus riches en Cd sont souvent les sols argileux (0.56 mg Cd/kg sol en valeur médiane pour les sols agricoles français) et les plus pauvres les sols sableux (0.16 mg Cd/kg sol en valeur médiane pour les sols agricoles

français) (Baize *et al.*, 2007). En France, les concentrations totales en Cd des sols agricoles se situent entre 0.14 mg kg⁻¹ (premier quartile) et 0.35 mg kg⁻¹ (troisième quartile), avec 0.23 mg kg⁻¹ en valeur médiane (données issues du Réseau de Mesure de la Qualité des Sols (RMQS), Figure 1). Il n'existe pas de valeur maximale réglementaire des concentrations en Cd dans les sols agricoles, seule une valeur seuil de 2 mg kg⁻¹ a été fixée pour l'autorisation de l'épandage des boues de stations d'épuration (Arrêté du 08/01/98).

Par ailleurs, l'activité anthropique contribue à augmenter la contamination des sols agricoles en Cd. En France, la majorité du cadmium apporté par l'homme sur les parcelles agricoles provient des engrais minéraux principalement les engrais phosphatés et par les épandages d'effluents d'origines animales (fumiers, lisiers). Viennent ensuite les retombées atmosphériques issues de l'industrie, de la combustion de combustibles fossiles et de l'incinération des ordures ménagères (Bisson *et al.*, 2011; Tremel-Schaub and Feix, 2005). Sur une superficie plus faible, les boues de stations d'épuration et les composts contribuent également à enrichir les sols cultivés en Cd (Adriano, 2001; SOGREAH, 2007; Tremel-Schaub and Feix, 2005).

De manière générale, le Cd apporté par ces contaminations anthropiques est peu lixivié et a tendance à s'accumuler dans les horizons de surface où se développent la plus grande partie du système racinaire des plantes (Chang *et al.*, 1984; Li and Shuman, 1996; Robert, 1995). Cette accumulation de surface induit donc une contamination de plus en plus forte de l'horizon cultivé au cours des années (Jones *et al.*, 1987; Rasmussen *et al.*, 1998). Cependant, une concomitante augmentation du risque de contamination de la culture n'est pas systématique car seule une fraction de la totalité du cadmium du sol est disponible pour l'absorption racinaire, la fraction phytodisponible.

Le sol est un système composé de plusieurs phases : une phase solide, une phase liquide et une phase gazeuse. Le cadmium se situe dans les deux premières phases mais il n'est absorbé par les racines qu'à partir de la phase liquide sachant que le Cd s'échange entre la phase solide et la phase liquide. C'est pourquoi la répartition du Cd entre ces phases a été beaucoup étudiée afin de comprendre la phytodisponibilité du métal. Sur la phase solide du sol, le Cd peut être constitutif des minéraux ou sorbé de manière plus ou moins forte aux particules minérales et à la matière organique solide (SOM) par des réactions de complexation

ou de sorption (Degryse *et al.*, 2009). Une partie du Cd de la phase solide est susceptible de passer en solution par désorption, décomplexation: la fraction échangeable.

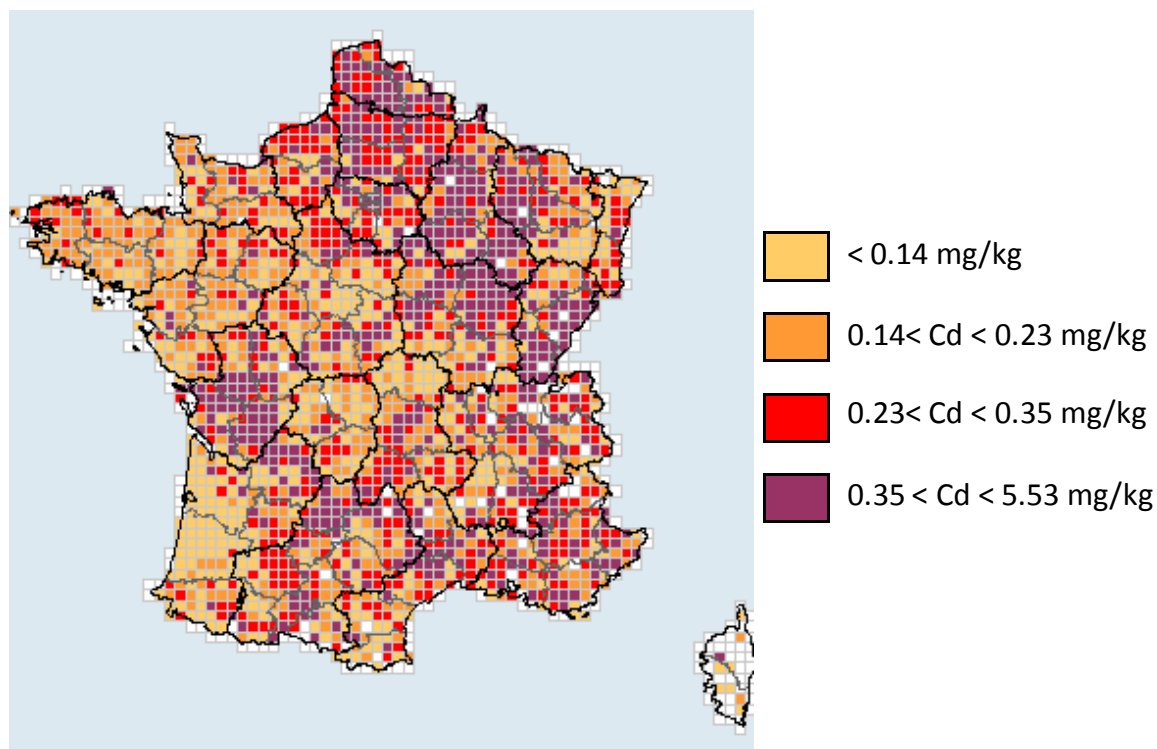


Figure 1. Concentrations totales en Cadmium des horizons de surface des sols français. Données issues du Réseau de Mesure de la Qualité des Sols (RMQS) <http://indiquasol.gissol.fr>

A l'équilibre, la répartition du Cd entre la phase solide et la solution est sous le contrôle de nombreuses caractéristiques du sol. Les argiles, les oxydes, la matière organique solide de par leurs propriétés sorbantes et complexantes tendent à sorber le Cd initialement en solution. La dessorption sera en revanche favorisée par la présence d'ions compétiteurs pour la sorption/complexation sur la phase solide, le plus influent étant le proton (McBride *et al.*, 1997; Sauve *et al.*, 2000). De cette manière, la solubilité du Cd augmente avec une diminution du pH (Salam and Helmke, 1998). La matière organique dissoute telle que les acides humiques et fulviques est reconnue pour fortement complexer le Cd, augmentant donc sa solubilité (Almas *et al.*, 2000; Strobel *et al.*, 2005; Kaschl *et al.*, 2002).

Dans la phase liquide, le cadmium peut être sous différentes formes : l'ion libre Cd^{2+} supposé être la forme majoritaire absorbée par les cellules racinaires, des complexes formés avec des ligands organiques ou inorganiques, et une fraction associée aux colloïdes minéraux (Degryse *et al.*, 2009; Tarradellas *et al.*, 1997). A l'équilibre, selon les caractéristiques du sol, la fraction libre Cd^{2+} de la solution de sol représente généralement entre 0 et 60%, avec une moyenne de 20% (Degryse *et al.*, 2009; Sauve *et al.*, 2000).

1.1.3 La phytodisponibilité du cadmium

L'estimation de la phytodisponibilité du Cd à partir d'extractants chimiques fait l'objet de très nombreux travaux. Les extractants peuvent être des sels neutres (CaCl_2 , NH_4NO_3 , etc.), des acides (HCl), ou des complexants (EDTA, DTPA), qui mettent en solution une partie plus ou moins importante du Cd de la matrice solide du sol (Aten and Gupta, 1996). Cependant, de nombreux auteurs ont démontré leur manque de généricité pour prédire la contamination des plantes dans des conditions de sol contrastées (Nolan *et al.*, 2005). En effet, ces extractants ne peuvent rendre compte correctement de la totalité des processus qui régissent la concentration du Cd^{2+} à la surface racinaire : le transport par diffusion (gradients de concentrations) et convection (transport associé à l'absorption racinaire de l'eau), les modifications d'équilibres de sorption/désorption et de complexation consécutifs à l'absorption racinaire du Cd, la précipitation/dissolution éventuelle liée à l'acidification ou l'alcalinisation de la rhizosphère par les racines, et les modifications de la quantité et des propriétés de la matière organique résultant de l'activité microbienne ou racinaire (minéralisation, exsudation de ligands) (Custos *et al.*, 2013; Hinsinger *et al.*, 2005; Jungk and Claassen, 1997).

Une approche plus complète de prédiction de la phytodisponibilité consiste à établir des modèles mécanistes rendant compte des processus précédemment cités. Les modèles fondateurs de Nye et Tinker et de Barber et Cushman (Barber, 1995; Jungk and Claassen, 1997), établis pour les éléments nutritifs ne considèrent que le transport par diffusion/convection, la sorption/désorption et l'absorption racinaire ont été appliqués aux contaminants métalliques (Adhikari and Rattan, 2000; Sterckeman *et al.*, 2004) dont le Cd, et commencent à être complétés par la prise en compte d'autres processus comme la complexation (Lin *et al.*, 2013). Cependant, pour prédire correctement la contamination des

cultures par le Cd, il convient de considérer également la physiologie de la plante vis-à-vis du métal.

1.2 La contamination des plantes

1.2.1 Schéma général de circulation du contaminant dans la plante

Dans les zones agricoles de forte contamination atmosphérique en Cd (e.g. parcelles agricoles proches de zones minières ou fortement industrialisées), la contamination des plantes peut se faire en partie par les feuilles. En effet, le Cd atmosphérique dissout dans l'eau de pluie ou d'irrigation peut pénétrer directement dans les stomates et la cuticule recouvrant les feuilles (Kannan, 1986). Cependant, la plus grande partie du Cd ainsi absorbé reste stockée sous forme insoluble dans la cuticule et les parois cellulaires, et le transport par le phloème reste faible, ce qui limite la contamination du reste de la plante (Kannan, 1986). La contribution de cette voie à la contamination globale de la plante est encore peu étudiée. Cependant, il a été démontré que cette voie de contamination reste négligeable face à l'absorption racinaire dans des zones de faibles contaminations atmosphériques (Smolders, 2001).

De manière générale, la voie de contamination principale des plantes par le Cd se fait donc par l'absorption racinaire métaboliquement active de l'ion libre Cd^{2+} présent dans l'espace des parois, l'apoplasme (Cataldo *et al.*, 1983). Cette absorption racinaire fera ultérieurement l'objet d'une partie bibliographique plus spécifiquement détaillée, en relation avec notre travail.

Le cadmium étant un élément non essentiel et fortement toxique, les plantes développent des mécanismes de défense contre la toxicité cadmiée. Un mécanisme majeur consiste à détoxifier le Cd au niveau des cellules racinaires, de sorte qu'il n'interfère pas avec les fonctions physiologiques vitales, notamment la photosynthèse. En premier lieu donc, le Cd est complexé dans les racines par des ligands organiques, principalement des carboxylates (malate, citrate) et des polypeptides contenant de nombreux sites sulfurés : les phytochélatines et les métallothionéines. Cette complexation inactive la réactivité de l'ion libre Cd^{2+} . Le cadmium libre ou complexé est également séquestré dans les vacuoles (Baker, 1987;

Boominathan and Doran, 2003; Clemens *et al.*, 2002; Tarradellas *et al.*, 1997). Pour certaines plantes il existe même une excrétion du Cd dans le milieu extérieur (Tarradellas *et al.*, 1997). Le Cd qui n'est pas séquestré se déplace jusqu'au xylème grâce à la continuité des cytoplasmes assurée par les plasmodesmes (voie symplasmique). Par la voie apoplasmique le Cd diffuse passivement dans l'espace extracellulaire des parois jusqu'au cylindre central où la diffusion est stoppée par l'endoderme dont les parois sont imperméables aux ions en raison de leur épaississement et des dépôts secondaires de lignine et subérine (Enstone *et al.*, 2002). Le cadmium doit donc être absorbé activement à ce niveau pour être ensuite transféré au xylème. L'intensification des dépôts imperméables de lignine et subérine et l'épaississement des parois à la fois au niveau de l'endoderme mais aussi potentiellement au niveau de l'exoderme sont également des réponses à la toxicité du Cd et contribuent à limiter le chargement du xylème et le transfert du contaminant vers les parties aériennes (Lux *et al.*, 2011).

Lorsqu'il atteint le cylindre central, le Cd est chargé dans le xylème et est transféré vers les parties aériennes (Figure 22). Peu de connaissances sont disponibles sur les mécanismes de chargement du Cd dans le xylème. Il semblerait que le chargement se fasse via des canaux ioniques où le Cd passerait complexé à des ligands tels que l'histidine ou le citrate (Clemens *et al.*, 2002; Lux *et al.*, 2011) ou bien via des transporteurs membranaires. En effet, certains auteurs ont démontré qu'une efficacité de translocation plus élevée, liée à un plus grand chargement du xylème, se retrouve chez les plantes sur-exprimant les gènes codant pour les HMAs (Heavy metal transporting ATPase) (Rascio and Navari-Izzo, 2011).

Dans le xylème, le Cd circule vers les parties aériennes grâce au flux résultant de la transpiration. Là encore, le Cd s'échange entre les formes complexées et les sites des parois du xylème chargées négativement (Tarradellas *et al.*, 1997), notamment au niveau des nœuds comme cela a été montré chez le riz (Fujimaki *et al.*, 2010). Cette sorption réduit encore la mobilité du Cd dans la plante sans toutefois l'annuler car une partie assez importante du métal circule sous la forme complexée.

Tout comme pour d'autres éléments comme le zinc dont il est assez proche en termes de mobilité, le Cd peut également circuler dans le phloème, vaisseaux conducteurs impliqués dans la distribution et mise en réserve des photoassimilats. Par cette circulation, le contaminant est donc redistribué au sein des organes aériens dont les fruits et graines mais

aussi vers les racines. Ce chargement du phloème en Cd serait un facteur explicatif de la redistribution du Cd radioactif d'une zone racinaire marquée à d'autres zones du système racinaire chez le blé (Page and Feller, 2005). Certains auteurs suggèrent que le Cd serait chargé dans le phloème par remobilisation du Cd stocké dans les feuilles, ou par échange direct avec le xylème via les cellules de transfert (Clemens *et al.*, 2013; Roda and Reid, 2011; Tanaka *et al.*, 2007). Chez les céréales comme le riz, les nœuds sont probablement des sites d'échanges xylème-phloème importants (Fujimaki *et al.*, 2010). Cependant, encore peu de connaissances sur le chargement du Cd et sa mobilité dans le phloème sont disponibles dans la littérature.

Suivant l'importance relative des mécanismes précédemment décrits, l'accumulation et la répartition du cadmium dans la plante est variable entre espèces et entre variétés au sein des espèces végétales. On peut distinguer grossièrement plusieurs types de plantes selon la réponse de leur concentration en contaminant en fonction de l'exposition : les plantes dites 'excluanes' qui accumulent peu lorsque l'exposition augmente, par exemple la fétuque; les plantes dites indicatrices dont l'accumulation est globalement proportionnelle au Cd disponible du sol (ex: le blé) et les plantes dites accumulatrices (ex: tournesol) ou hyperaccumulatrices (ex: *Noccaea caerulescens*) accumulant respectivement assez fortement ou très fortement le Cd (Adriano, 2001).

L'intensité d'accumulation du Cd dans les parties aériennes dépend beaucoup de la capacité de séquestration du Cd dans les cellules racinaires, séquestration qui varie à la fois entre espèces végétales et entre variétés au sein d'une même espèce (Sugiyama *et al.*, 2007). Pour fixer les ordres de grandeurs, un rapport de concentration du Cd entre les racines et les parties aérienne de 1.7 a été trouvé pour la moutarde et le sorgho (Jiang *et al.*, 2003; Pinto *et al.*, 2004) alors que ce rapport peut atteindre 80 chez le soja (Sugiyama *et al.*, 2007). De même, un facteur de 3.5 pour ce rapport a été observé entre deux cultivars de blé (Hart *et al.*, 1998). Ces différences spécifiques et variétales du taux de translocation illustrent la capacité de séquestration du Cd par les racines. Cette capacité est plus développée pour les plantes non-accumulatrices que pour les plantes accumulatrices, comme le tournesol notre plante modèle, qui a alors un taux de translocation plus important (Rascio and Navari-Izzo, 2011). Il faut également préciser que pour une plante donnée, le taux de translocation peut dépendre

des conditions de l'environnement et notamment de la concentration en Cd du milieu (Perriguet *et al.*, 2008).

Le cadmium qui parvient aux parties aériennes ne doit pas nuire aux processus vitaux de la plante. A nouveau, la complexation et la séquestration vacuolaire sont mises en œuvre et le Cd peut être également stocké et accumulé dans les trichomes (Figure 22). Certains auteurs ont interprétés l'hyperaccumulation du Cd dans les parties aériennes comme étant un mécanisme de protection contre les bioagresseurs pour des plantes vivant sur des sols très riches en métaux (Poschenrieder *et al.*, 2006).

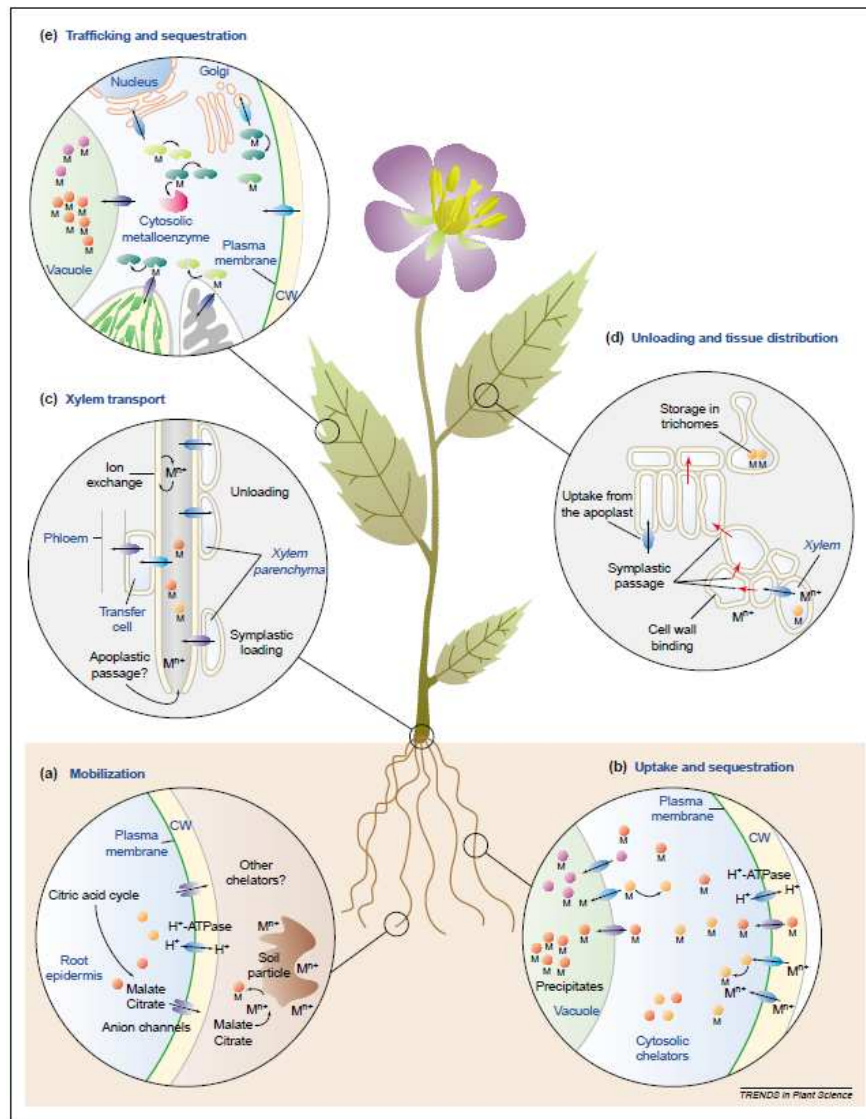


Figure 2. Schéma représentatif de l'absorption et de la translocation du Cd dans la plante. D'après Clémens (Clemens *et al.*, 2002)

1.2.2 L'absorption racinaire du cadmium

1.2.2.1 Approches expérimentales et difficultés d'interprétation

L'absorption racinaire du Cd est généralement mesurée en exposant ponctuellement les racines à du ^{109}Cd radioactif. L'exposition doit être courte pour éviter qu'un éventuel efflux ne rejette une quantité significative du traceur et pour ne pas trop appauvrir la solution d'exposition et garder ainsi une vitesse d'absorption constante. L'apoplasme ayant une capacité d'échange cationique non négligeable de l'ordre de 20-100 mmol kg^{-1} racine fraîche (Greger and Landberg, 2008), le ^{109}Cd se sorbe sur les parois cellulaires et il est nécessaire d'éliminer cette fraction qui conduit à surestimer l'internalisation du Cd. En effet, chez deux variétés de *Noccaea*, une hyper-accumulatrice et une non-accumulatrice, et chez le maïs, pour des concentrations en Cd correspondantes à celles retrouvées dans les sols agricoles, il a été montré que cette adsorption pouvait représenter entre 35% et 50% du Cd total retrouvé dans les racines (adsorbé+internalisé) (Redjala *et al.*, 2009). La désorption est réalisée en exposant les racines à plusieurs bains successifs d'une solution ayant de fortes concentrations en Ca et Cd non marqué qui remplacent alors le ^{109}Cd sorbé sur l'apoplasme. Au terme de l'exposition au ^{109}Cd et des bains de désorption, le Cd radioactif retrouvé dans les racines est considéré correspondre au Cd internalisé.

De nombreux travaux montrent que la courbe reliant la vitesse d'absorption racinaire du Cd^{2+} à la concentration de cet ion dans la solution peut être décomposée en une composante linéaire et une autre composante saturable (Hart *et al.*, 1998; Redjala *et al.*, 2010). Il y a consensus pour attribuer la composante saturable à l'internalisation du Cd^{2+} dans les cellules racinaires par une réaction de type enzyme-substrat dont la cinétique est généralement modélisée par le modèle de Michaelis-Menten (synthèse de Lux *et al.* (2011)). L'origine de la composante linéaire est plus discutée. Certains auteurs l'attribuent à une fraction de Cd liée fortement aux parois des cellules et qui n'aurait pas été éliminée par les procédures de désorption (Harris and Taylor, 2004; Hart *et al.*, 2006). Selon cette hypothèse, le Cd non désorbé représenterait jusqu'à 20% à 25% du Cd total retrouvé (Cataldo *et al.*, 1983; Redjala *et al.*, 2009; Tarradellas *et al.*, 1997). A contrario, selon l'analyse de cinétique de désorption ajustées à un modèle compartimentale qui semble correct, Buckley *et al.* (2010) estiment que 99% du Cadmium peuvent être désorbés selon leur protocole. La composante linéaire pourrait

donc dans ce cas être attribuée à une véritable internalisation dans le symplasme par un système de transport cellulaire à faible affinité qui ne sature donc pas aux concentrations testées et qui prendrait le relai d'un système à haute affinité responsable de la composante saturable (Redjala *et al.*, 2010; Redjala *et al.*, 2009).

Ces éléments de la littérature montrent que la procédure de désorption est donc particulièrement importante et incontournable mais que cependant, il demeure toujours un doute pour affirmer que la totalité du Cd retrouvé après exposition des racines au cadmium suivis de bains de désorption est totalement internalisé dans le symplasme.

1.2.2.2 L'internalisation du Cd dans le symplasme

La concentration de l'ion libre Cd^{2+} au niveau des cellules racinaires est la résultante de plusieurs processus : l'internalisation, les échanges avec le Cd sorbé sur l'apoplasme et la matrice solide du sol, la réaction de complexation en solution et le transport de toutes les espèces de Cd par diffusion et advection avec le flux d'absorption d'eau par les racines. La diffusion purement passive du Cd à travers la membrane plasmique est très faible. L'internalisation du métal se fait par un processus actif c'est-à-dire mettant en œuvre une consommation d'énergie (Cataldo *et al.*, 1983) ce qui est mis en évidence par le fait que le processus cesse par application d'inhibiteurs du métabolisme (Hart *et al.*, 1998; He *et al.*, 2009).

Le cadmium est internalisé par deux mécanismes. Le premier, dont la contribution est probablement minoritaire de l'ordre 20% à 30% met en œuvre des canaux ioniques (Adriano, 2001; Lux *et al.*, 2011), notamment ceux du Ca^{2+} (Clemens, 2001). Le Cd en tant que cations pénètre dans le symplasme en suivant le gradient électrochimique généré par les ATPases, les canaux ioniques facilitant le passage de la membrane plasmique. D'autres voies de diffusion facilitée ont été mises à jour : le Cd diffuse également via des antiports- H^+ (Burzynski *et al.*, 2005).

Le deuxième mécanisme met en œuvre des protéines transporteurs qui se lient au métal pour assurer le transport. Selon le modèle de Michaelis Menten, la concentration de l'ion libre Cd^{2+} au niveau de la membrane plasmique des cellules définit la vitesse d'internalisation par

transport et à forte concentration en Cd, les transporteurs sont saturés et la vitesse d'absorption plafonne. Cette voie d'absorption est la voie principale d'absorption symplasmique pour des concentrations en Cd du milieu correspondant à celles des sols agricoles ($<0.5\mu\text{M}$, *i.e.* la plupart des sols) (Grant *et al.*, 1998; Tarradellas *et al.*, 1997). Par exemple, cette voie représente 70% à 80% du Cd absorbé chez le lupin, le soja et la laitue, pour des concentrations en Cd correspondantes à celles de sols agricoles, voire à des sols contaminés (Cataldo *et al.*, 1983; Costa and Morel, 1993, 1994). Comme cela a déjà été évoqué, certains travaux suggèrent qu'il pourrait y avoir deux catégories de transporteurs selon leur affinité : les transporteurs de haute affinité intervenant principalement dans l'absorption du Cd pour de faibles concentrations et les transporteurs de faible affinité, intervenant dans l'absorption pour de fortes concentrations en Cd ($>10\mu\text{M}$) (Redjala *et al.*, 2009). Bien que les mécanismes de transports ne soient pas toujours très clairs, ces transporteurs requièrent des ATPases (DalCorso *et al.*, 2008; He *et al.*, 2009; Tarradellas *et al.*, 1997; Verbruggen *et al.*, 2009), notamment des pompes à protons qui entretiennent le gradient électrochimique. Le transport du Cd ainsi contrôlé par le métabolisme peut être alors plus ou moins actif selon l'énergie disponible.

Le Cd n'étant pas un élément essentiel et étant fortement toxique, il n'est pas surprenant qu'aucun transporteur lui étant spécifique n'ait été encore identifié. En réalité, l'internalisation du Cd est assurée par des transporteurs membranaires assurant l'absorption d'éléments essentiels dont le manque de spécificité conduit à assurer également l'internalisation d'un élément non essentiel et toxique comme le Cd. Cela explique qu'à fortes concentrations, le Cd est un antagoniste compétitifs de certains cations divalents essentiels, les principaux étant le zinc (Zn^{2+}), le calcium (Ca^{2+}), le cuivre (Cu^{2+}) et le fer (Fe^{2+}) (Adriano, 2001; Clemens *et al.*, 2002; Lux *et al.*, 2011; Tarradellas *et al.*, 1997). Réciproquement, de nombreuses études ont démontré que la présence en forte concentration de Ca, Zn, Cu, et potentiellement du manganèse (Mn^{2+}) a pour effet de diminuer l'absorption et l'accumulation de Cd dans les tissus végétaux (Cataldo *et al.*, 1983; Costa and Morel, 1993; Ghnaya *et al.*, 2007; Hart *et al.*, 2002; He *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003; Niu *et al.*, 2007).

La principale famille de transporteurs impliquée dans l'absorption du Cd, est la famille des transporteurs ZIP (Zinc regulated transporter/Iron regulated transporter-like protein), transporteurs dédiés en premier lieu à l'absorption du Zn^{2+} (Clemens, 2001; Lombi *et al.*,

2002). D'autres transporteurs sont également supposés participer à l'internalisation du Cd : les transporteurs AtNramp (Fe) associés également au transport du Mn (Clemens, 2001; Thomine *et al.*, 2000). Les protéines YSL (Yellow-Stripe 1-Like) transporteraient le Cd sous forme complexée (Curie *et al.*, 2009).

La régulation des gènes codant pour ces transporteurs, notamment ceux de la famille ZIP, peuvent être des leviers pour réduire l'absorption symplasmique du Cd^{2+} dans le cas des concentrations retrouvées dans les sols agricoles (Cataldo *et al.*, 1983; Grant *et al.*, 1998). Il a été observé qu'une surexpression des gènes ZIP induit une augmentation du nombre de ces transporteurs résultant en un influx en Cd^{2+} plus important et donc à une augmentation de l'accumulation du contaminant dans la plante (Clemens *et al.*, 2002; Lombi *et al.*, 2002). Deux principaux facteurs influencent la régulation de l'expression des gènes codant pour ces transporteurs : la génétique et le statut nutritionnel de la plante vis à vis des éléments essentiels transportés par ces protéines (Clemens *et al.*, 2002; Guerinot, 2000). En effet, des différences d'influx en Cd^{2+} inter-variétales peuvent être expliquées par une différence du nombre de transporteurs (Su *et al.*, 2009) ce qui ouvre une perspective de sélection génétique. Cependant, en minimisant l'expression de ces transporteurs par sélection génétique, on pénaliserait la nutrition minérale de la plante pour le Zn, Fe, etc. En revanche, en assurant une disponibilité suffisante pour ces oligo-éléments essentiels, il n'y a pas surexpression induite des gènes codant pour les transporteurs et la compétition de Zn, et Fe pour l'absorption du Cd est renforcée.

1.2.2.3 Les barrières apoplasmiques

L'espace libre constitué par les parois des cellules, l'apoplasme, permet aux ions dont le Cd d'être transportés par diffusion et convection vers l'intérieur des tissus racinaires (Enstone *et al.*, 2002). C'est à partir de la solution de l'apoplasme que se fait l'internalisation du Cd dans le symplasme des cellules racinaires.

Le transport extracellulaire des ions dans l'apoplasme peut être fortement restreint par le développement de barrières apoplasmiques constituées de dépôts de lignine et/ou subérine dans les parois (bandes de Caspary et lamelles de subérine). Ces dépôts rendent les parois

imperméables (Cholewa, 2000; Ferguson and Clarkson, 1976; Van der Vliet *et al.*, 2007), forçant l'eau et les ions à emprunter la voie symplasmique pour le transport radial vers le xylème (Enstone *et al.*, 2002; Lux *et al.*, 2011). Ces barrières se développent dans les parois des cellules de l'endoderme, assise cellulaire séparant le cortex du cylindre central, et de l'exoderme, l'assise de cellules se développant sous l'épiderme. L'endoderme et l'exoderme comportant ces barrières apoplasmiques sont considérées comme étant matures. Certains auteurs soulignent que ces barrières apoplasmiques ne sont pas totalement imperméables aux ions en raison de la présence de cellules non subérifiées, appelées cellules de passage, ou parce que le développement de racines latérales secondaires perfore l'endoderme et l'exoderme (Enstone *et al.*, 2002; Marschner, 1995), permettant à ce niveau le rétablissement du flux apoplasmique vers les cellules du cortex et de la stèle (Hardiman and Jacoby, 1984). Cependant, malgré la présence de ces passages réduits à quelques cellules, la circulation de l'eau et des solutés est globalement fortement restreinte par la présence de ces barrières. Par exemple, une observation de coupes racinaires en imagerie et autoradiographie démontrent que les solutés tels que le lanthanum, le calcium, et le phosphore s'accumulent au niveau externe de l'exoderme mature, mettant en évidence l'efficacité des barrières apoplasmiques exodermiques contre la diffusion extracellulaire de ces solutés vers les cellules du cortex (Cholewa, 2000; Ferguson and Clarkson, 1976; Lehmann *et al.*, 2000).

Les rôles de barrières apoplasmiques de l'endoderme et de l'exoderme matures vis-à-vis des mouvements extracellulaires d'eau et des solutés ont été beaucoup étudiés (synthétisés dans Enstone *et al.* (2002)). Au niveau de l'endoderme, les barrières forcent les ions à emprunter le symplasma afin de pouvoir gagner le xylème et donc les parties aériennes. Cette contrainte permet un certain 'contrôle' de la nature et de la quantité des ions empruntant le flux xylémien. En effet, l'entrée dans le symplasma est assurée par des canaux ioniques et des transporteurs plus ou moins spécifiques vis-à-vis des ions transportés. Une fois dans le symplasma les ions en excès ou 'indésirables' peuvent être stockés dans les vacuoles et un dernier point de contrôle s'opère grâce aux transporteurs éventuellement impliqués dans le chargement du xylème à partir du symplasma. Pour le Cd, il a été montré chez le riz que la différence variétale d'accumulation du métal dans les parties aériennes y compris dans le grain, avait pour origine le contrôle du chargement du xylème et non une différence d'intensité d'absorption racinaire (Uraguchi *et al.*, 2009). Les barrières apoplasmiques de

l'endoderme permettent également d'obtenir une pression osmotique au niveau cylindre centrale qui peut être plus forte que celle de la solution du sol en empêchant la contre-diffusion lorsque les ions sont activement chargés dans le symplasme du cylindre central. Il en résulte un appel d'eau vers le xylème et donc une pression positive dans ce dernier appelée 'poussée racinaire'. Cette dernière maintient un flux d'eau et de solutés dans le xylème en cas de transpiration faible ou nulle, ce qui permet une circulation de la sève brute la nuit et contribue à contrecarrer l'embolie.

Comme l'endoderme, l'exoderme présente un rôle de restriction de la diffusion extracellulaire de l'eau et des solutés, cette fois vers les cellules du cortex. En effet, de nombreuses études ont démontré que le flux d'eau, flux apportant également les solutés, est fortement restreint au niveau de l'exoderme mature (Miyamoto *et al.*, 2001; Zimmermann and Steudle, 1998). L'exoderme va donc limiter la perte d'eau en cas de dessèchement du sol. En forçant le passage des ions par voie symplasmique, il va contribuer à filtrer l'entrée des ions dans la racine et limiter au niveau du cortex l'accumulation d'ions toxiques qui pourraient être véhiculés dans l'apoplasme avec le flux d'eau.

1.2.2.4 Développement des barrières apoplasmiques et conséquences sur la variation longitudinale des capacités d'absorption racinaires du Cd

Pour la plupart des plantes, le développement des barrières apoplasmiques suit un ordre précis résultant de la maturation de l'endoderme en premier, puis de la maturation de l'exoderme ensuite.

La première étape de la maturation de l'endoderme est la formation des bandes de Caspary, composées de lignine et de subérine, sur les parois anticlinales des cellules de l'endoderme de manière à la fois transverse et radiale (Figure) (Enstone *et al.*, 2002). Les bandes de Caspary n'occupent pas plus d'un tiers à la moitié des parois anticlinales, mais permettent de fermer les espaces intercellulaires apoplasmiques. Même si les auteurs ne s'accordent pas sur la totale imperméabilité à l'eau et aux ions des bandes de Caspary (Lux *et al.*, 2011), elles restreignent fortement leur passage vers la stèle (Harrison-Murray and Clarkson, 1973).

Ce stade de développement des cellules de l'endoderme se produit généralement dans les quelques millimètres derrière l'apex racinaire (Enstone and Peterson, 2005; Lux *et al.*, 2004; Redjala *et al.*, 2011). La seconde étape de maturation de l'endoderme est la formation des lamelles de subérine additionnelles sur les parois des cellules (Figure 3). Cette étape n'est pas systématique. Selon les espèces, certaines cellules proches du protoxylème ne développent pas tout de suite cette lamelle de subérine, ces cellules sont appelées cellules de passage (Enstone *et al.*, 2002). Ces cellules peuvent se subérifier par la suite avec l'âge. Les lamelles de subérine assurent l'imperméabilisation totale des passages apoplasmiques intercellulaires vers la stèle (Baxter *et al.*, 2009; Lux *et al.*, 2011; Melchior and Steudle, 1993). Cette zone de l'endoderme plus mature se retrouve généralement de quelques millimètres à quelques centaines de millimètres derrière l'apex (Lux *et al.*, 2011). Chez certaines plantes faisant partie des dicotylédones, une troisième étape de la maturation de l'endoderme peut avoir lieu : un épaissement des parois de l'endoderme, formant une paroi tertiaire composée principalement de cellulose et de lignine (Enstone *et al.*, 2002; Lux *et al.*, 2011) (Figure 3). Cette formation de paroi tertiaire ne se produit que dans les parties les plus âgées des racines.

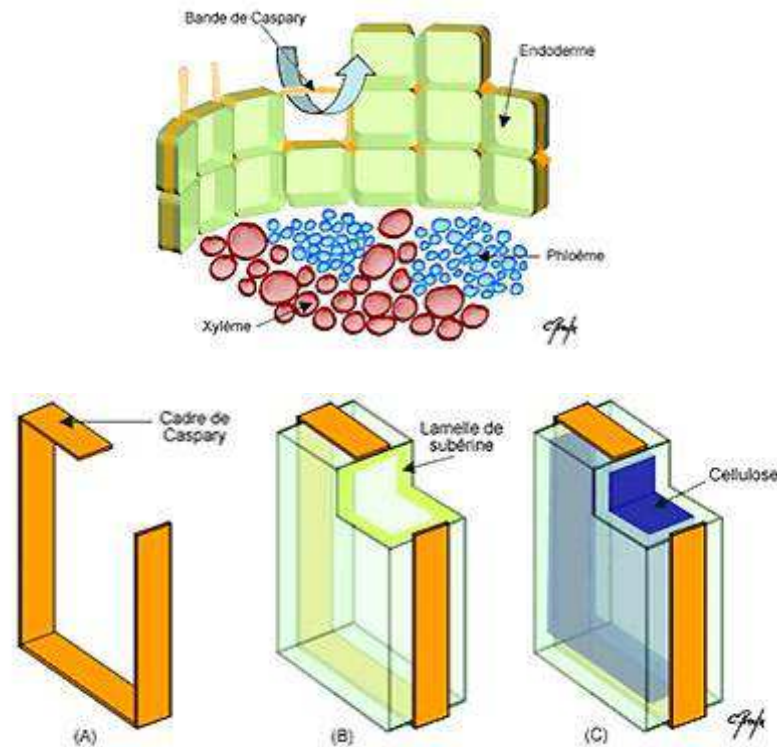


Figure 3. Développement des barrières apoplasmiques: Bande de Caspary, lamelles de subérine et parois tertiaires. Schéma tiré du site suivant : http://www.plantes-botanique.org/biologie_04_0_le-systeme-racinaire

Chez la majorité des angiospermes, une maturation de l'exoderme s'opère en parallèle de la maturation de l'endoderme (Lux *et al.*, 2011). La maturation de l'exoderme suit le même schéma et présente les mêmes fonctions physiques (barrières contre le passage intercellulaire de l'eau et des ions) que celle de l'endoderme (Enstone *et al.*, 2002; Lux *et al.*, 2011): cadre de Caspary, puis éventuellement dépôts de lamelle de subérine (parois secondaires) et de cellulose (parois tertiaires). Pour des espèces comme le tournesol, notre plante modèle, ou le maïs, l'exoderme est dit uniforme. Toutes les cellules sont identiques et présentent le même degré d'imperméabilité. Pour d'autre espèces comme l'oignon, l'exoderme est dimorphique: des cellules longues comportant le cadre de Caspary et des lamelles de subérine alternent avec des cellules plus petites dites de passage car dépourvues de lamelle de subérine et ne comportant que le cadre de Caspary (Enstone *et al.*, 2002).

Trois grands types de facteurs vont déterminer la topologie du développement des barrières apoplasmiques, c'est-à-dire la position d'un stade de développement donné par rapport à un point de référence comme l'extrémité apicale de la racine. La génétique fixe le potentiel de développement des barrières en termes de vitesse de maturation et de degré de développement (présence potentielle ou non de parois secondaires ou tertiaires). Ensuite, des stimuli biotiques et abiotiques vont entraîner un développement plus ou moins rapide et poussé des barrières. Par exemple, des conditions d'hypoxie, de sécheresse, de salinité ou de forte contamination en ETM, notamment en Cd^{2+} , vont favoriser le développement des barrières qui contribueront alors à limiter les pertes d'oxygène et d'eau et à réduire l'entrée de sodium et d'ETM (Enstone and Peterson, 1998, 2005; Vaculik *et al.*, 2012). Enfin, la vitesse de croissance de la racine relativement à la vitesse de maturation de l'endoderme et de l'exoderme détermine la position de ces barrières par rapport à l'apex racinaire et donc l'étendue de la zone de plus forte perméabilité où les barrières sont peu développées (Enstone *et al.*, 2002; Perumalla *et al.*, 1990). Ainsi, des cultures hydroponiques, comparée à des cultures en aéroponie et en sol, favorisent une maturation plus tardive des barrières apoplasmiques, et donc un développement situé plus loin de l'apex racinaire (Enstone and Peterson, 2005; Redjala *et al.*, 2011). L'absence de contrainte mécanique favorise une croissance rapide des racines et la solution nutritive écarte toute contrainte hydrique qui pourrait stimuler la formation de l'exoderme. Cependant, la génétique intervient également puisque les variations anatomiques entre des cultures hydroponique et aéroponique, ne s'observent pas chez toutes les plantes et sont donc espèces-dépendantes (Meyer *et al.*, 2009; Miyamoto *et al.*, 2001).

Dans le cas particulier du Cd, Lux *et al.* (2004) montrent que les variétés de saules (*Salix* spp.) tolérantes au Cd^{2+} présentent des barrières apoplasmiques plus importantes et proches de l'apex que les variétés sensibles. Lux *et al.* (2011) montrent également que l'application longitudinale unilatérale de Cd induit un plus fort développement de l'exoderme et de l'endoderme sur le côté exposé au contaminant. Enfin, sachant qu'une forte contamination en Cd^{2+} du milieu entraîne une diminution du taux d'élongation des racines (Maksimovic *et al.*, 2007), la zone de maturité des barrières apoplasmiques se rapproche de l'apex racinaire réduisant par conséquent la zone vulnérable de forte perméabilité. Ces exemples montrent comment à la fois la génétique et la plasticité de la physiologie permet de développer des

réponses de protection des racines face à un contaminant comme le Cd. Ces éléments suggèrent également qu'indépendamment de l'activité propre des transporteurs du Cd, l'internalisation du métal à partir de sa concentration dans l'apoplasme devrait étroitement dépendre du schéma de développement des barrières apoplasmiques, et il est donc attendu que l'absorption du Cd^{2+} soit variable le long des racines.

1.2.2.5 Variation longitudinale d'absorption du Cd le long de racines et conséquences sur le prélèvement du contaminant par le système racinaire

Des variations longitudinales de l'influx racinaire en Cd^{2+} ont été observées chez le peuplier, cinq variétés de blé, et deux variétés de thlaspi à l'aide de micro-électrodes (Farrell *et al.*, 2005; He *et al.*, 2011; Pineros *et al.*, 1998). Dans ces travaux, une zone de plus fort influx a été systématiquement observée dans le premier millimètre derrière l'apex, puis le taux d'absorption décroît jusqu'à se stabiliser à des distances de l'apex variables selon les espèces.

Plusieurs hypothèses peuvent être liées à ces variations longitudinales d'influx. Premièrement, l'absorption du Cd^{2+} est majoritairement liée aux pompes H^+ -ATPase et est donc dépendante de la disponibilité en énergie (Costa and Morel, 1994; Hart *et al.*, 1998). Par conséquent, la disponibilité en substrats énergétiques étant plus forte au niveau de l'extrémité racinaire en raison de l'activité de croissance (Aguirrezabal, 1993; Jones, 1998), l'absorption active des ions dont le Cd^{2+} pourrait être ainsi stimulée. La réduction de l'allocation de photoassimilats au système racinaire lors de son vieillissement pourrait de la même manière expliquer que l'influx d'absorption du Cd^{2+} diminue avec l'âge de la plante (Perriguet *et al.*, 2008).

Ensuite, la relation entre l'absorption des ions dans le symplasme et le développement des barrières apoplasmiques a été clairement mise en évidence. Par exemple, le taux d'absorption du Ca^{2+} dans la stèle diminue en s'éloignant de l'apex en cohérence avec le développement des bandes de Caspary et des lamelles de subérine au niveau de l'endoderme (Harrison-Murray and Clarkson, 1973; Pitman, 1977; Robards *et al.*, 1973). Concernant le Cd, des travaux ont démontré que la majorité du métal qui est chargé dans le xylème provient de la

voie symplasmique (Van der Vliet *et al.*, 2007), ce qui prouve que l'endoderme restreint fortement le transport apoplasmique du Cd^{2+} vers le xylème. Certains auteurs ont par ailleurs relié une plus faible accumulation en Cd pour différentes espèces avec un développement précoce de ces barrières apoplasmiques (Lux *et al.*, 2004; Redjala *et al.*, 2011; Vaculik *et al.*, 2012). Une diminution importante du flux apoplasmique au niveau des cellules du cortex et de la stèle par la présence de barrières subérifiées au niveau de l'exoderme et de l'endoderme engendre une diminution du Cd^{2+} disponible pour l'absorption symplasmique, réduisant en conséquence le chargement du xylème et la translocation vers les parties aériennes. En outre, le blocage de l'absorption symplasmique du Cd au niveau de l'endoderme conduit à une accumulation de Cd^{2+} dans l'apoplasme réduisant en conséquence le gradient électro-chimique et donc la diffusion du Cd^{2+} vers l'intérieur de la racine.

Les travaux publiés dans la littérature montrent donc que pour plusieurs espèces, l'influx de Cd^{2+} est plus important vers l'extrémité apicale de la racine et le développement de l'exoderme et l'endoderme est une explication très probable sans pour autant être exclusive. Cette variabilité longitudinale des capacités d'absorption du Cd^{2+} à l'échelle de la racine individuelle suggère que toutes choses étant égales par ailleurs, à l'échelle de la plante entière, le prélèvement du Cd^{2+} sera d'autant plus important que le système racinaire comportera d'apex. Malheureusement, expérimentalement, cette hypothèse est difficile à tester car il est impossible de faire varier le nombre de ramifications indépendamment de la surface racinaire et du profil longitudinal d'absorption. Par exemple, chez deux variétés de blé dur, Berkelaar and Hale (2000) montrent que la variété la plus accumulatrice est bien celle qui a le plus de ramifications mais également la plus grande surface racinaire. Le même type de confusion d'effets est observé par Farrell *et al.* (2005) en comparant quatre variétés de blé dur : la variété la plus accumulatrice est celle qui a le plus de racines mais également la plus grande surface racinaire tout en ayant la plus forte variation longitudinale d'influx mais le plus faible influx longitudinal moyen. En conséquence, une approche pertinente pour différencier et hiérarchiser les effets sur l'absorption du Cd^{2+} par un système racinaire, du degré de ramification, de la surface totale et du profil d'absorption consiste à regrouper l'ensemble de ces processus dans un modèle et de tester leur influence sur le prélèvement simulé (analyse de sensibilité).

1.3 L'architecture du système racinaire et ses variations

1.3.1 Architecture du système racinaire

Le système racinaire d'une plante est composé de deux grands types de racines : les racines séminales et les racines nodales (ou adventives). Les racines séminales sont formées directement à partir de l'embryon. Elles se ramifient en général rapidement, formant ainsi le système racinaire primaire (Weaver, 1926). Les racines ne faisant pas partie de ce système racinaire primaire et formées à partir des nœuds de la tige sont appelées les racines adventives (ou nodales) (Waisel and Eshel, 1991; Weaver, 1926). Les ramifications se formant sur les racines séminales ou adventives sont appelées latérales d'ordre 1 (Figure 4). Il peut également se former des latérales ordre 2 à partir des latérales ordre 1, ainsi que des latérales ordre 3 à partir des latérales ordre 2, etc. (Figure 4) (Fitter, 1991). Les proportions des deux types de racines dans un système racinaire, *i.e.* séminales ou adventives, sont dépendantes de l'espèce et vont définir des grands types de systèmes racinaires (Cannon, 1949), dont les trois principaux sont les systèmes fasciculés, pivotants et traçants (, A, B, C). Chez les monocotylédones, dans la majorité des cas, les racines adventives ramifiées composent la plus grande partie du système racinaire qui est du type fasciculé (, B) car se développant en faisceau. A contrario, chez certaines dicotylédones comme le tournesol, le système racinaire est dit pivotant (, A) car il se compose d'une unique racine séminale, le pivot, sur laquelle vont se former de nombreuses latérales (Weaver, 1926). Le système racinaire traçant (, C), comme celui du framboisier, est composé de nombreuses racines adventives se développant à chaque nœud de la tige souterraine peu profondément enfouie dans le sol. Cependant, des systèmes intermédiaires à ceux précédemment décrits peuvent être également observés, notamment en raison de la plasticité du système racinaire en réaction aux contraintes abiotiques (Fitter, 1991).

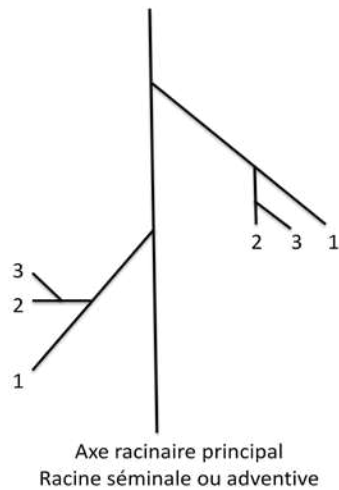


Figure 4. Schéma représentatif d'un axe racinaire principal et de ses ramifications. Les *numéros* représentent l'ordre de chaque latérale

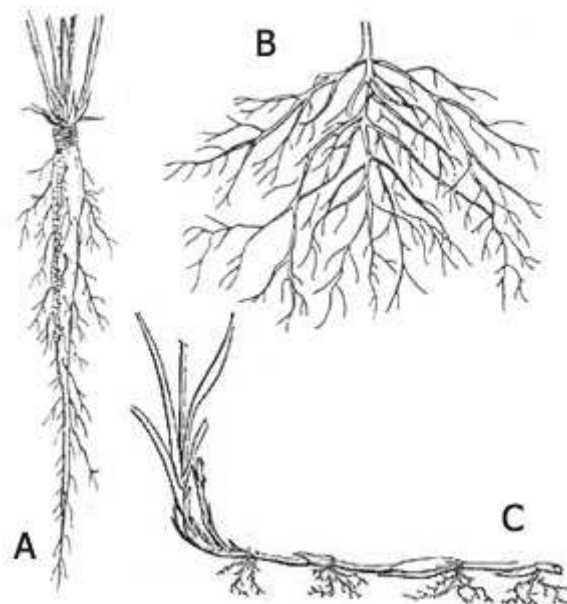


Figure 5. Les différents types de systèmes racinaires. Système racinaire pivotant (A), système racinaire fasciculé (B), et système racinaire traçant (C). D'après http://www.plantes-botanique.org/biologie_04_0_le-systeme-racinaire

L'architecture du système racinaire se caractérise par plusieurs variables : la longueur et surface totale, la longueur des zones non ramifiées, le nombre de latérales par ordre, ainsi que leurs diamètres moyens et leur vitesse de croissance maximale, leur distribution au sein du système racinaire et au niveau de leur axe racinaire d'ancrage, leur angle d'insertion, et leur durée de vie (Fitter, 1991).

La longueur et la surface totale du système racinaire sont des variables résultant à la fois du nombre de racines (séminales, adventives et leur latérales), de leur diamètre, de leur taux d'allongement, et de leur durée de vie. Selon certaines études, la durée de vie des racines diminue avec l'augmentation de l'ordre de ramification (Waisel and Eshel, 1991). Le diamètre racinaire présente de fortes variations inter et intra-spécifiques. Il contribue notamment à déterminer l'allongement racinaire pouvant être produit par unité de ressource carbonée allouée aux racines (Fitter, 1991). Le diamètre racinaire diminue également avec l'augmentation de l'ordre de ramification (Fitter, 1991).

Le taux de croissance des racines est également un élément déterminant de l'architecture du système racinaire puisqu'il détermine sa longueur et sa surface totale en fonction du temps. Ce taux de croissance racinaire diminue généralement avec l'âge de la racine (Pellerin and Pages, 1994), et avec l'augmentation du degré de ramification (Aguirrezabal *et al.*, 1994; Aguirrezabal and Tardieu, 1996), ce qui peut être expliqué par une diminution de l'allocation de ressource carbonée avec l'éloignement à la base de la racine (Aguirrezabal *et al.*, 1994; Aguirrezabal and Tardieu, 1996).

Les latérales émergent sur un axe parent de façon acropétale (Charlton, 1991). Deux hypothèses complémentaires portant sur les mécanismes d'initiation des latérales expliquent cette observation. La première est liée au stade de développement et à la maturation et différenciation des tissus de la racine mère, l'autre est liée aux hormones. Les ramifications n'apparaissent généralement qu'après la zone d'élongation racinaire (Weaver, 1926) où l'initiation de ramifications peut débuter par différenciation des primordia racinaires. Par ailleurs, les hormones de type auxine, sont connues comme favorisant l'initiation des ramifications (Charlton, 1991). En effet, dans le cas de mutants déficients pour la voie de signalisation de celles-ci, le système racinaire est souvent peu ou pas ramifié (De Smet *et al.*, 2006) alors que l'application exogène d'auxines sur des racines coupées initie la production

de latérales (Charlton, 1991). Sachant que l'auxine est essentiellement synthétisée par les apex des tiges et distribuée aux racines par le phloème, il est donc cohérent que l'initiation des latérales ne commence que lorsque le phloème se trouve suffisamment mature pour distribuer cette hormone (Charlton, 1991), c'est à dire acropétalement. De plus, la densité de ramifications est souvent plus importante au niveau des zones proximales des racines (McCully, 1999; Pages and Pellerin, 1994), pouvant notamment résulter d'un taux d'hormone décroissant avec l'éloignement à la source (base de la racine primaire) (Pages and Pellerin, 1994). Selon les processus qui viennent d'être exposés, les latérales apparaissent à des temps thermiques relativement constant après la production d'un segment racinaire donné par le méristème apicale (Pellerin and Pages, 1994). Dans ce cas, la longueur de la zone non ramifiée diminuera avec le temps en conséquence de la diminution du taux d'élongation de la racine mère (Pellerin and Pages, 1994). Dans certains cas particulier de croissance relativement constante, les ramifications apparaissent à des distances de l'apex également peu variables (Aguirrezabal and Tardieu, 1996; Charlton, 1991).

1.3.2 Variations de l'architecture du système racinaire

1.3.2.1 Variations génétiques

La variation génétique portant sur l'architecture racinaire au sein d'une même espèce, mais aussi entre variétés (inter-variétale) est un fait avéré pour de très nombreuses espèces comme en témoignent les nombreuses études portant sur les espèces cultivées et recensées par O'Toole and Bland (1987). Par exemple, chez le soja Zobel (Zobel, 1983) a noté des variations inter-variétales portant sur le nombre de latérales ainsi que sur le nombre de racines primaires.

Dans certains cas, ces variations intra-spécifiques ont pu être reliées aux gènes correspondants. En effet, chez le riz des QTL (quantitative trait loci) ont été identifiés comme intervenant sur la longueur racinaire (de Dorlodot *et al.*, 2007). De même, il a été démontré qu'un certain nombre de mutations génétiques peuvent affecter directement l'architecture racinaire, comme le nombre de latérales ou leur longueur (Zobel, 1991). Cependant, nombre de mutations peuvent également porter sur des caractères qui impactent indirectement

l'architecture racinaire. Par exemple, la durée de la phase de croissance végétative de la plante va avoir un effet sur le développement du système racinaire (Otoole and Bland, 1987). De même, une maturation du xylème et du phloème plus proche de l'apex, ou un taux de production d'auxine plus important peuvent influencer le degré de ramifications ainsi que l'étendue de la zone racinaire non ramifiée (Charlton, 1991). Les variations inter-variétales de l'architecture racinaire résultent principalement d'effet additif de multiples gènes et il est donc difficile d'attribuer à une zone génétique donnée un rôle direct (Otoole and Bland, 1987). De plus, l'architecture racinaire est souvent le résultat des interactions génotype * environnement.

1.3.2.2 Variations liées aux conditions environnementales

Le système racinaire est un organe particulièrement plastique pouvant moduler ses caractéristiques en réponse aux contraintes de son environnement. Les variations de l'architecture racinaire par l'environnement sont espèce/variété/écotype dépendantes (Bennie, 1991; Hodge, 2004; Kafafi, 1991; McMichael and Quisenberry, 1993). Par exemple, pour des espèces adaptées aux sols pauvres en nutriments le système racinaire varie moins en réponse à des patches de nutriments que des espèces adaptées à des sols riches en nutriments (Hodge, 2004).

L'architecture racinaire est influencée par de nombreux facteurs abiotiques ou biotiques, comme la température et l'impédance du sol, la disponibilité en eau et nutriments ainsi que la présence de micro-organismes et de symbiose mycorhiziennes. Ces deux derniers facteurs ont en général pour effet d'augmenter le développement du système racinaire, notamment par l'allongement des racines, et l'augmentation de la biomasse racinaire et du nombre de latérales (Shutsrirung *et al.*, 2013; Sukumar *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2013). Les facteurs abiotiques semblent cependant être les principaux facteurs de variations architecturales du système racinaire.

La croissance du système racinaire est fortement influencée par la température du sol, avec une réponse suivant une courbe en cloche. Ainsi, pour chaque espèce il est possible d'identifier un seuil minimal et maximal de température en dessous et au dessus desquels la

croissance racinaire est très ralentie voir stoppée, avec entre les deux un optimum de température pour lequel le système racinaire se développe pleinement (Zobel, 1991). De manière générale, les températures de croissance racinaire sont comprises entre 5°C et 35°C, avec un optimum aux alentours des 20 à 25°C selon les espèces (Bowen, 1991; McMichael and Quisenberry, 1993). Par exemple, les racines de maïs commencent à croître pour des températures supérieures à 10°C, avec un optimum de croissance aux alentours de 30°C (Bowen, 1991). L'augmentation de la température du minimum à l'optimum entraîne donc entre autre l'augmentation du taux de croissance racinaire et du nombre de ramifications, mais également une réduction du diamètre moyen du système racinaire lié à l'augmentation du nombre de latérales ayant un diamètre moyen plus fin que les racines primaires (Bowen, 1991; McMichael and Quisenberry, 1993; Weaver, 1926).

Parmi les facteurs abiotiques influençant l'architecture racinaire, les effets de l'impédance du sol sont également importants et bien documentés. Pour la plupart des espèces, une impédance du sol forte entraîne un système racinaire peu développé : elle a pour effets principaux de diminuer l'élongation racinaire et le nombre de latérales (Becel *et al.*, 2012; McMichael and Quisenberry, 1993), en augmentant le diamètre moyen (Alameda and Villar, 2012; Lipiec *et al.*, 2012; Loades *et al.*, 2013).

La disponibilité en eau et nutriments du sol sont les derniers principaux facteurs abiotiques pouvant faire varier l'architecture racinaire. Un sol relativement sec ou pauvre en nutriment favorise le développement en profondeur de racines longues et fines, explorant un maximum de sol (Fitter, 1991; Weaver, 1926). En revanche, la présence de zones dans le sol de plus forte disponibilité en nutriments (ammonium, nitrate, ou phosphore) influence la plupart des systèmes racinaires qui vont y développer de nombreuses latérales caractérisées par un fort taux de croissance et de ramifications et souvent une augmentation du diamètre racinaire (Charlton, 1991; Wang *et al.*, 2006; Hodge, 2004; McCully, 1999). A titre d'exemple, une alternance de couches sableuses, pauvres en nutriments et en eau et ayant une impédance faible, et de couche argileuses riches en nutriments et en eau et ayant une plus forte impédance, crée un système racinaire d'architecture alternant des zones de longues racines peu ramifiées avec des zones de racines courtes très ramifiées (5) (Weaver, 1926).

Certains stress abiotiques tels qu'une forte contamination en ETM (e.g. plomb ou cadmium) ou un stress salin peuvent également modifier l'architecture racinaire. En effet, il a fréquemment été reporté dans la littérature une diminution de la longueur et de la biomasse totale du système racinaire, ainsi qu'une diminution du nombre de ramifications, et une augmentation du diamètre moyen, pour des concentrations dites phytotoxiques en Cd, Zn, Cu, Pb, et Ni dans le milieu de culture (Clarke and Brennan, 1989; Fiala *et al.*, 2013; Gurpreet *et al.*, 2013; Nagajyoti *et al.*, 2010; Rascio *et al.*, 1993). La phytotoxicité de ces éléments peut aller jusqu'à la nécrose des apex racinaires (Nagajyoti *et al.*, 2010). Les concentrations en ETM pour lesquels une phytotoxicité peut être observée dépendent à la fois de l'élément, de l'espèce et du cultivar étudié, mais également de la composition du milieu de culture (Kopittke *et al.*, 2010). Ainsi, Kopittke *et al.* (2010) ont recensé les gammes de concentrations phytotoxiques (phytotoxicité observée par une réduction de la biomasse) de plusieurs ETM reportés sur 34 ans d'études (Tableau 1).

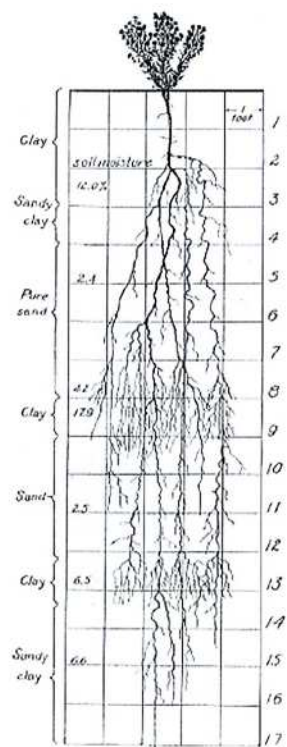


Figure 6. Stratification du système racinaire de *Kuhnia glutinosa*. La plante a été excavée d'un sol alluvial alternant des couches d'argiles et de sable. D'après Weaver (1926)

Tableau 1. Gammes de concentrations phytotoxiques de huit ETM recensées par Kopittke *et al.* (2010), résultats de 34 ans de littérature

Elément	Premier quartile (µM)	Médiane (µM)	Troisième quartile (µM)
Cadmium	2.20	5	10
Plomb	0.07	0.30	1.30
Cuivre	0.7	2	15
Zinc	9	25	60
Nickel	9	15	60
Manganèse	5	40	150
Mercure	0.15	0.60	0.80
Arsenic	6	9	25

1.3.3 Modélisation du système racinaire

Les modèles statiques décrivent le système racinaire à un instant 't' de son évolution, le plus souvent par des modèles de composantes fractales ou topologiques (Wang *et al.*, 2006). Le modèle basé sur la géométrie fractale représente le système racinaire dans l'espace du sol comme étant l'agrégation d'un motif unique qui se répète de la plus petite échelle (échelle racinaire) à la plus grande échelle (système racinaire entier) (Tatsumi *et al.*, 1989). Cependant, ce système de modélisation du système racinaire ne prend pas en compte les variations d'architecture en fonction des différents facteurs biotiques ou abiotiques. Les modèles basés sur la topologie décrivent le système racinaire comme étant composé d'un ensemble de liens reliant un apex au collet du système racinaire, et de distances entre ces liens et l'apex (Wang *et al.*, 2006). Ce dernier modèle racinaire, est bien plus adapté que le modèle fractal aux variations architecturales du système racinaire sur l'ensemble du volume du sol exploité, nécessaires à la modélisation de l'absorption racinaire en Cd^{2+} dans des conditions édaphiques hétérogènes.

De nombreux modèles dynamiques ont été développés mais seulement peu semblent génériques à la fois pour la description des règles d'élaboration de l'architecture racinaire et pour décrire le comportement des racines face aux différents facteurs abiotiques (Pages *et al.*, 2004). Le modèle 'Root Typ', développé par Pagès *et al.* (2004) a pour but de synthétiser les modèles préexistants, tout en simplifiant le modèle final, pour représenter le développement de systèmes racinaires d'architectures variables, croissant dans des conditions édaphiques diverses. Ainsi, ce modèle permet de simuler la croissance racinaire dont les apex interagissent avec le sol qui peut réguler à la fois l'élongation racinaire, la direction de croissance et la densité d'embranchements. Le sol y est alors décrit comme étant composé de plusieurs couches horizontales d'épaisseurs définies par l'utilisateur, résultantes des processus pédologiques, d'actions biologiques ou d'application de techniques de culture. Une des nouveautés de ce modèle comparé aux autres est la modélisation du système racinaire par types de racines, et non par ordre de latérale, permettant ainsi de rendre compte de la variabilité architecturale au sein d'un même ordre de latérales. Bien que le nombre de paramètres soit important, autant pour décrire le développement du système racinaire que pour décrire les conditions biotiques et abiotiques du sol, ce modèle permet toutefois une réduction du nombre de paramètres définissant ces processus, tout en étant représentatif de la croissance d'une plante au cours d'une culture (Pages *et al.*, 2004).

D'autres mécanismes intervenant dans la croissance de la plante peuvent également être pris en compte lors de la modélisation du système racinaire. En effet, un dernier modèle de croissance de système racinaire a été développé, notamment chez le tournesol, notre plante cible, prenant en compte à la fois l'effet de la température de l'air, mais également l'effet des photons photosynthétiquement actifs interceptés par le feuillage (Aguirrezabal, 1993), mettant là en évidence l'importance de la nutrition carbonée sur le développement du système racinaire et les variations sur son architecture.

1.4 Le tournesol

1.4.1 Généralités

Le tournesol (*Helianthus annuus*. L) est une plante oléagineuse fortement présente sur les sols cultivés de France. De 1986 à 1994 les surfaces cultivées françaises occupées par le tournesol sont passées de 350 000 ha à 1 150 000 ha. Cependant, malgré une forte baisse des surfaces cultivées pour le tournesol depuis ce pic de 1994, une majorité des départements français continuent sa culture (6), et il ne reste néanmoins pas moins de 650 000 ha de surfaces cultivables françaises dédiés à sa production (d'après le site <http://www.cetiom.fr>).

L'essor des cultures de tournesol n'est cependant pas surprenant au regard des débouchés de plus en plus nombreux pour les produits issus de cette plante. En effet, des graines de tournesol est extraite l'huile servant majoritairement dans l'alimentation humaine et plus marginalement animale, mais aussi pour de nombreux usages dans l'industrie, *e.g.* la production de biodiésel principalement mais aussi de détergeant, produits cosmétiques, etc. (7). De plus, les tourteaux de tournesol, *i.e.* ce qu'il reste après extraction de l'huile, sont remaniés en granulés pour l'alimentation animale (7), essentiellement pour l'alimentation porcine et celle des ruminants.

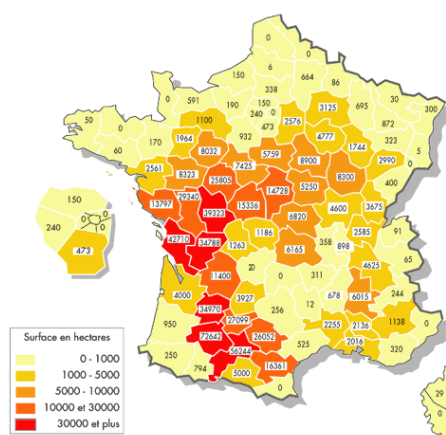


Figure 7. Répartition des surfaces françaises cultivées pour le tournesol en 2008. D'après <http://www.cetiom.fr>

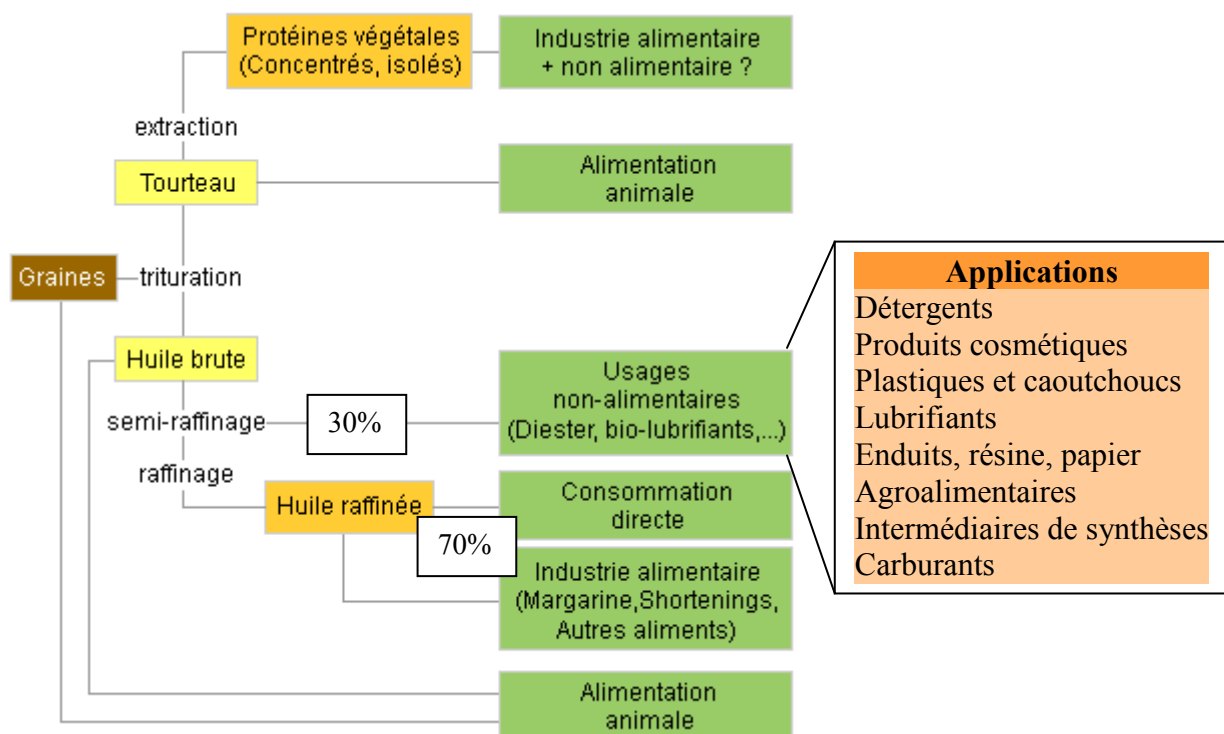


Figure 8. Schéma représentatif des débouchés économiques des graines de tournesol. D'après <http://www.cetiom.fr>

Le tournesol est une plante faisant partie de la famille des Astéracées. Le cycle de culture du tournesol varie généralement de 120 à 150 jours (jusqu'à maturité des graines), soit entre ~1590 degrés jours et ~1620 degrés jours, base de température 6°C, selon la précocité du cultivar (d'après <http://www.cetiom.fr>). D'après le rapport du Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains (CETIOM), on distingue communément cinq phases de développement de la plante (CETIOM, 2002).

La première correspond à la phase semis-levée des plantules et dure entre 10 à 20 jours, soit 190 degrés jours.

La deuxième phase couvre la période entre la levée et le stade cinq paires de feuilles et dure également environ 10 à 20 jours. C'est pendant cette phase que le système racinaire se met prioritairement en place, sa croissance pouvant atteindre trois fois celle des parties

aériennes. La fin de cette phase se traduit par l'initiation des ébauches florales. Toujours à la fin de cette phase, 75 % du pivot total est développé, laissant supposer que la majorité du système racinaire est déjà en place (Aguirrezabal, 1993).

La troisième phase se situe entre le stade cinq paires de feuilles et le début de la floraison, d'une durée d'environ 40 à 50 jours. Elle est caractérisée par une croissance exponentielle des parties aériennes, et une absorption maximale des éléments minéraux. A la fin de cette phase, le développement végétatif de la plante est considéré comme quasiment terminé. Ainsi, les parties aériennes peuvent atteindre 2 à 4 mètres de hauteur selon le cultivar.

La quatrième phase correspond à la période de floraison, d'une durée de 15 à 21 jours selon les plantes. Enfin, la cinquième phase correspond à la maturation des graines. Selon les recommandations du CETIOM, la récolte des graines se fait lorsqu'elles ont atteint entre 8 % et 11 % d'humidité.

1.4.2 Le cadmium et le tournesol

Le tournesol est une plante largement étudiée comme candidate à la phytoremédiation de sols contaminés (Faessler *et al.*, 2010; Niu *et al.*, 2007; Vangronsveld *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2011). En effet, cette espèce peut extraire $0.1 \text{ kg Cd ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ par la récolte de ses parties aériennes, permettant de décontaminer un sol modérément contaminé en 117 ans, contre 58 ans pour le tabac et 255 ans pour le peuplier (Vangronsveld *et al.*, 2009). Par conséquent, même si le tournesol ne fait pas partie des espèces hyper-accumulatrices de Cd, elle n'en reste pas moins fortement accumulatrice tout en produisant une biomasse aérienne relativement importante. En outre, elle offre la possibilité de commercialiser son huile à des fins non alimentaires ce qui confère une valeur ajoutée au processus de phytoextraction.

De manière générale, 67 % à 82 % du Cd de la plante restent stockés dans les racines et ne sont donc pas transférés aux parties aériennes (Di Cagno *et al.*, 1999; Lopez de Andrade *et al.*, 2008; Zou *et al.*, 2008). Le tournesol fait partie des espèces pouvant stocker plus fortement le métal dans les racines à mesure que la concentration en Cd augmente dans le milieu de culture. En effet, lorsque la concentration en Cd du milieu augmente, le rapport des concentrations du métal entre les racines et les parties aériennes peut varier de 1.5 à 4.5

(Chiang *et al.*, 2006; Simon, 1998). Comme dans le cas de beaucoup de plantes non hyperaccumulatrices, les concentrations en Cd des organes de la plante peuvent être alors classées comme suit : racines > feuilles et tiges > graines (Li *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2011). Même si les parties aériennes présentent une concentration plus faible que les racines, leur plus forte biomasse permet d'extraire des quantités significatives de Cd du sol dans le contexte de la phytoremédiation. Dans le cadre de la qualité des produits consommés, c'est le Cd de la graine qui fait l'objet d'attention (Dauguet and Lacoste, 2013). Le degré de contamination des graines par le Cd peut être évalué peu précocement puisque la concentration en Cd dans les feuilles au stade floral de la plante y est bien corrélée (Li *et al.*, 1997). Par contre, au stade jeune, cet indicateur n'est pas valide (Li *et al.*, 1997).

Comme pour d'autres espèces comme le riz, le blé dur ou le soja (Arao *et al.*, 2003; Grant *et al.*, 2008), l'accumulation du Cd dans le tournesol est variable selon les cultivars. En effet, des études ont montré des variations inter-variétales de concentration en Cd dans la plante, les parties aériennes, les racines ou même dans l'huile de facteurs x1.6, x4, x2, et x3.6 respectivement (Ansari *et al.*, 2009; Li *et al.*, 1995; Zou *et al.*, 2008). L'origine de cette variabilité n'est pas décrite dans la littérature et on ne sait pas si elle porte sur l'absorption racinaire ou sur le degré de séquestration du métal dans les racines. Nous n'avons trouvé aucune étude se référant à l'absorption du Cd²⁺ par les racines de tournesol et encore moins sur la variabilité de translocation du Cd des racines vers les parties aériennes qui a fait l'objet de plusieurs travaux chez le blé dur, le riz et le soja (Arao *et al.*, 2003; Chan and Hale, 2004; Harris and Taylor, 2004; Hart *et al.*, 1998; Ishikawa *et al.*, 2011). La compréhension de la variabilité inter-variétale d'accumulation du Cd est donc nécessaire et une première approche macroscopique possible porte sur la caractérisation de la variabilité de prélèvement racinaire et de translocation du Cd vers les parties aériennes.

1.4.3 Le système racinaire du tournesol

Le tournesol présente un système racinaire de type pivotant, *i.e.* comportant une racine principale de gros diamètre issue de l'embryon sur laquelle émergent des ramifications. Le tournesol ne possède pas plus de trois ordres de latérales, le premier ordre étant les latérales s'insérant sur le pivot (Weaver, 1926).

Quelle que soit la variété étudiée, de manière générale, 90% de la longueur totale des racines se situent dans les premiers 40 cm du sol (Angadi and Entz, 2002). La profondeur maximale d'enracinement du tournesol varie généralement entre 1.5 m (McMichael and Quisenberry, 1993) et 1.75 m (Angadi and Entz, 2002) et est atteinte entre 50 et 95 jours après le semis, ce qui correspond au stade 'cinq paires de feuilles – floraison' (Angadi and Entz, 2002). La dynamique saisonnière de la profondeur d'enracinement du tournesol peut être décrite par une simple fonction allométrique liée à la surface foliaire (Sadras *et al.*, 1989).

La plus grande partie du système racinaire du tournesol est composée de latérales. Les latérales ordre 1 sont très majoritairement les seules ramifications étudiées dans la littérature portant sur le tournesol. Elles apparaissent de façon acropétale à partir d'environ 300 mm à l'arrière de l'apex du pivot (Aguirrezabal and Tardieu, 1996). Il faut en moyenne un minimum de 90 degrés jour après le semis pour voir apparaître la première latérale (McMichael and Quisenberry, 1993; Seiler, 1998). Les latérales ordre 1 s'insèrent sur le pivot avec un angle compris entre 30° et 60° par rapport à l'horizontal, celles proches de la base du pivot ayant l'angle d'insertion le plus faible (Ennos *et al.*, 1993). La densité de ramifications et la longueur maximale des latérales d'ordre 1 diminuent avec la distance au collet de la plante (Corti Monzon *et al.*, 2012). La densité maximale de ramifications, pour une plante à cinq paires de feuilles est d'environ 3.5 latérales cm⁻¹ de pivot (Aguirrezabal and Tardieu, 1996). Par la suite, la densité de ramification est relativement stable à une latérale cm⁻¹ (Aguirrezabal and Tardieu, 1996).

La vitesse d'élongation des racines est variable au sein du système racinaire, selon l'ordre pivot > latérales ordre 1 proches de la base du pivot > latérales ordre 1 proches de l'apex du pivot (Aguirrezabal *et al.*, 1994). Il semblerait également que la vitesse d'élongation diminue avec l'ordre de ramification (Aguirrezabal, 1993). Selon Aguirrezabal (1993), ces variations sont liées à la distance à parcourir par le carbone (énergie nécessaire à la croissance et apporté par le phloème depuis les feuilles) depuis la base du pivot jusqu'aux apex racinaires : plus la racine est éloignée en ordre et en distance de la base du pivot, moins celle-ci aura de carbone alloué pour sa croissance.

Il existe une variabilité génétique des variables de l'architecture racinaire du tournesol. La plus grande variabilité inter-variétale observée dans la littérature porte à la fois sur la longueur

du pivot (facteur maximal observé x2.7), sur la longueur totale des latérales (facteur maximal observé x4) et sur leur nombre (facteur maximal observé x2.9) (Seiler, 1994). D'autres différences inter-variétales plus faibles ont également été observées pour la densité de ramifications (facteur maximal observé x1.6) et la profondeur d'enracinement (facteur x1.4) (Sadras *et al.*, 1989; Seiler, 1994).

Ces différences inter-variétales sont génétiques et ont été mises en évidence pour des conditions environnementales égales entre les variétés. Comme cela a été mentionné antérieurement, de nombreux facteurs abiotiques et biotiques vont interagir avec cette variabilité génétique pour définir l'architecture réelle du système racinaire du tournesol en conditions de croissance en sol.

La température du sol reste un des premiers facteurs de variation de l'architecture racinaire du tournesol. Elle influe entre autre sur l'allongement du pivot et des latérales, ainsi que sur leur nombre (Aguirrezabal and Tardieu, 1996; Seiler, 1998). L'optimum de température pour cette espèce se situe entre 20°C et 35°C avec une fenêtre de croissance comprise entre 10°C et 40°C (Seiler, 1998). La température optimale maximisant à la fois l'élongation et la ramification est de 30°C (McMichael and Quisenberry, 1993; Seiler, 1998). Les températures comprises entre 25°C et 30°C favorisent plutôt la croissance des latérales, qui peuvent représenter alors 86 % du poids frais du système racinaire. Des températures inférieures à 20°C ou supérieures à 35°C inhibent plus la croissance des latérales que celle du pivot, ce dernier représentant alors la majorité du système racinaire (Seiler, 1998) (Aguirrezabal, 1993).

La densité de flux de photons photosynthétiques (PPFD) est également un des majeurs facteurs abiotiques influençant l'architecture du système racinaire du tournesol car il est à l'origine de la disponibilité en substrats carbonés. Avant le stade deux feuilles le carbone alloué à la croissance racinaire provient de l'embryon, le PPFD n'influence donc pas la croissance du système racinaire. En revanche passé ce stade et jusqu'à la fin de la croissance de la plante, le PPFD intercepté 36 h à 12 h auparavant est bien corrélé avec la croissance racinaire. Ce décalage entre l'interception et la croissance traduit le temps nécessaire au assimilats pour atteindre les racines via le phloème, ainsi que leur mise en réserve temporaire

pour assurer le métabolisme racinaire en période nocturne (Aguirrezabal *et al.*, 1994; Aguirrezabal and Tardieu, 1996)

L'impédance du sol est également un des facteurs influençant l'architecture racinaire du tournesol. Un sol dense ne modifierait pas le nombre ou la masse des latérales d'ordre un mais entrainerait un pivot qui s'étiolerait plus rapidement, des latérales de diamètre basal plus important et qui s'insèrent sur le pivot avec un angle très faible à l'horizontal (Goodman and Ennos, 1999).

Enfin, il a été observé que la contrainte exercée par le vent sur la tige du tournesol influençait également l'architecture du système racinaire du tournesol. Cette contrainte a pour effet d'augmenter le nombre, la longueur, et le diamètre des latérales ordre 1, ainsi que le diamètre moyen du pivot et le poids frais du système racinaire (Goodman and Ennos, 1996, 1997, 1998). Cette adaptation du système racinaire sous une contrainte appliquée à la tige traduit une acclimatation du système racinaire permettant le renforcement de l'ancrage au sol.

En conclusion, le tournesol est une culture agricole importante avec des débouchés majeurs dans la chaîne alimentaire (huile pour l'alimentation humaine et tourteaux pour l'alimentation animale). Il convient donc de veiller à la faible contamination en Cd des graines pour que les récoltes satisfassent les normes sanitaires européennes (EC 2005/87 et EC 2008/629) dans un contexte où les teneurs en Cd des sols tendent à augmenter sous l'effet des activités humaines. Par ailleurs, le tournesol est une culture d'intérêt pour la phytoremédiation des sols contaminés par phytoextraction car elles accumulent assez fortement le Cd tout en produisant une biomasse aérienne non négligeable et les graines peuvent être valorisées par une utilisation non alimentaire de l'huile. Pour toutes ces raisons, la compréhension de l'accumulation du Cd du sol par le tournesol est importante, et l'absorption du contaminant par le système racinaire en est la première étape.

Comme l'a montré cette revue bibliographique, l'architecture du système racinaire peut être variable, la cause pouvant être génétique et environnementale. Bien que cette variabilité ait été plus ou moins caractérisée, son impact sur l'absorption d'un contaminant inorganique du sol comme le cadmium n'a pas été évalué. On ne sait donc pas si chez le tournesol, cette variabilité modifie de manière significative le prélèvement du Cd. D'ailleurs, ce type de

questionnement est peu abordé dans la littérature, y compris pour d'autres espèces végétales. Certains travaux ont montré chez le blé et *Thlaspi* que l'intensité de l'absorption racinaire du Cd^{2+} était plus importante au niveau des extrémités racinaires. Si tel était le cas chez le tournesol, il est attendu qu'à taille équivalente, un système racinaire absorbera d'autant plus le Cd^{2+} qu'il sera ramifié. En outre, la variation de la taille même du système racinaire doit également affecter l'accumulation du Cd. Compte tenu de ces éléments, l'objectif de ce travail de thèse était de répondre à la question : l'architecture racinaire est-elle un déterminant fort de l'accumulation du Cd par le tournesol? Pour traiter cette question, notre démarche s'est articulée en trois sous-objectifs suivants :

1- Caractériser la capacité d'absorption du Cd par des racines individuelles pour notamment mettre en évidence une possible variation longitudinale de l'absorption, plus forte au niveau apical

2- Intégrer la capacité d'absorption du Cd par des racines individuelles et ses variations au sein de différentes architectures racinaires représentatives de la variabilité observée chez le tournesol afin de hiérarchiser l'impact des caractéristiques du système racinaire sur l'absorption totale du Cd.

3- Tester la validité de nos conclusions en examinant si la variabilité d'accumulation du Cd entre variétés peut être en partie expliquée par des variations d'architecture racinaire.

CHAPITRE 2.

**MISE EN EVIDENCE D'UNE VARAITION
LONGITUDINALE DE L'INFLUX DE Cd^{2+} CHEZ LES
RACINES INDIVIDUELLES DU TOURNESOL
(*Helianthus annuus* L.)**

Chapitre 2. Mise en évidence d'une variation longitudinale de l'influx de Cd^{2+} chez les racines individuelles du tournesol (*Helianthus annuus* L.)

Ce chapitre traite de l'étude de l'influx de Cd^{2+} chez les racines individuelles de tournesol. L'objectif était de tester l'hypothèse selon laquelle l'influx de Cd^{2+} est plus important au niveau apical de la racine.

Les principaux résultats de ce travail sont les suivants :

- Au niveau expérimental, la mise au point d'une technique d'exposition de racines individuelles à du Cd radioactif (^{109}Cd) pour tracer son absorption en fonction de la position longitudinale sur l'axe racinaire, en hydroponie.
- Pour les faibles concentrations en Cd des solutions d'exposition ici utilisées, l'équation de Michaelis-Menten décrivant l'influx de Cd^{2+} en fonction de la concentration en Cd du milieu peut être simplifiée par une équation linéaire dont la pente décrit la capacité d'absorption racinaire communément appelée la $\square$ root absorbing power $\square$, soit la capacité d'absorption racinaire (Eq. 1)

$$I = \text{RP } C_{\text{Cd}} \quad \text{Eq 1 (Nye, 1973)}$$

avec I = Influx racinaire de Cd^{2+} (nmoles $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$), RP = root absorbing power ($\text{L cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) et C_{Cd} = concentration en Cd^{2+} dans la solution (nmoles L^{-1})

- Nous avons mis en évidence une variation longitudinale de l'influx en Cd^{2+} chez les latérales d'ordre un de tournesol, en hydroponie. L'influx diminue d'un facteur 2.9 en moyenne de l'apex racinaire vers la partie distale.
- Cette variation longitudinale des capacités d'absorption racinaire a été modélisée puis combinée avec des variations d'architecture racinaire (nombre et diamètre de latérales ordre un et distribution des longueurs) afin de simuler le prélèvement total

de cohortes de latérales ordre un. Les simulations ainsi obtenues indiquent que le prélèvement total en Cd^{2+} est influencé par les caractéristiques de la variation longitudinal de l'influx, probablement plus fortement pour des cultures hydroponiques que pour des racines s'étant développées sur substrat solide.

- Ce travail a fait l'objet d'un article scientifique publié dans la revue Plant and Soil et dont le tiré à part est joint en annexe :

Laporte, M.A., Denaix, L., Pagès, L., Sterckeman, T., Flénet, F., Dauguet, S., Nguyen, C., 2013. Longitudinal variation in cadmium influx in intact first order lateral roots of sunflower (*Helianthus annuus*. L). Plant Soil 372, 581–595.

**Longitudinal variation in cadmium influx in intact first order lateral roots of sunflower
(*Helianthus annuus*. L)**

Marie A. Laporte^{1,2}, Laurence Denaix¹, Loïc Pagès³, Thibault Sterckeman⁴, Francis Flenet⁵,
Sylvie Dauguet⁶, Christophe Nguyen¹.

¹ INRA, UMR1220 TCEM, F-33883 Villenave d'Ornon, France

² Univ. Bordeaux, UMR1220 TCEM, F-33883 Villenave d'Ornon, France

³ INRA - UR 1115 PSH, Domaine St Paul, Site Agroparc, CS 40509, 84914 Avignon cedex 9, France.

⁴ Université de Lorraine - INRA, Laboratoire Sols et Environnement, 2 avenue de la Forêt de Haye B.P. 172, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy cedex, France.

⁵ CETIOM, 1 avenue Lucien Brétignères B.P. 4, 78850 Thiverval Grignon, France.

⁶ CETIOM, 11 rue Monge, Parc Industriel, 33600 PESSAC, France.

Corresponding author: INRA, UMR1220 TCEM, 71 avenue Edouard Bourlaux B.P. 81, F-33883 Villenave d'Ornon, France. Christophe.Nguyen@bordeaux.inra.fr, tel : +33557122507, fax : +33557122515

Abstract

Aims- Contamination of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by cadmium (Cd) is a concern for food and feed safety as this species accumulates Cd to a greater extent than other crops. We examined the relationships between root architecture and Cd²⁺ uptake by roots.

Methods- We determined and mathematically modelled the longitudinal variation of Cd²⁺ influx in first order roots of sunflower grown in hydroponics by using short-term exposure to ¹⁰⁹Cd-labelled solutions (0.8 to 500 nM). Thereafter, by taking into account the longitudinal variation of the influx, we simulated the uptake of Cd²⁺ for 24 h by cohorts of roots characterised by various architectural characteristics.

Results- Cd²⁺ influx at the root tip was on average 2.9 times that of the basal region close to the taproot. The simulations indicated that the total Cd²⁺ uptake by root cohorts mainly depends on 1/ the root diameter and the number of roots, 2/ the value of the Cd²⁺ influx at the basal region 3/ the stronger influx at the root tip.

Conclusion- Considering a higher Cd²⁺ influx at the root tip may be important to understand the relationship between root architecture and Cd²⁺ uptake by the root system.

Keywords: cadmium, influx, longitudinal variation, root architecture, sunflower.

Introduction

Cadmium is a trace element naturally occurring in soils but due to anthropogenic inputs, mainly phosphate fertilizers (Adriano, 2001), Cd tends to accumulate in agricultural soils (Rasmussen *et al.*, 1998). Soil Cd^{2+} is absorbed by plant roots and partly transferred aboveground. Crop contamination by Cd is a serious concern for food and feed safety. This is particularly true for sunflower (*Helianthus annuus* L.), which is known to accumulate relatively high levels of Cd as compared to other crops such as maize (Grant *et al.*, 2008) and especially in edible parts (Ansari *et al.*, 2009). Although there might be a significant contribution of atmospheric fallout in some conditions, Cd found in crops mainly originates from the uptake by the root system (Smolders, 2001). Therefore, understanding the uptake of Cd^{2+} by roots is particularly important, although it is not the only mechanism that determines the concentration of this contaminant in the edible parts. Indeed, availability of soil Cd^{2+} (McLaughlin *et al.*, 1999) and metal partitioning between plant organs (Clemens *et al.*, 2002) are also crucial.

It is generally recognized that Cd^{2+} uptake by roots is mediated by energy-driven transporters (Lux *et al.*, 2011) and an apoplastic route has also been suggested (Redjala *et al.*, 2010; Redjala *et al.*, 2009). However, until now, no specific transporters have been identified for Cd^{2+} , which is assumed to enter the symplasm by Zn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} transporters (Clemens, 2001). By using specific microelectrodes, in *Triticum aestivum*, *Noccaea caerulea* (previously called *Thlaspi*), *Sueda salsa* and *Populus canescens*, Cd^{2+} influx was demonstrated to strongly decrease with the distance from the root apex (Farrell *et al.*, 2005; He *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Pineros *et al.*, 1998). This longitudinal variation in Cd^{2+} influx could result in higher Cd^{2+} uptake in strongly branched root systems, as it was observed in two wheat cultivars (Berkelaar and Hale, 2000). In sunflower, to our knowledge, no such longitudinal variation in Cd^{2+} influx has been reported. Even the parameters for the Michaelis-Menten kinetics could not be found.

Therefore, this study had two objectives: first, to test the hypothesis of an longitudinal variation in Cd^{2+} influx along sunflower roots (*Helianthus annuus* L. c.v. ES BIBA), for Cd concentrations in the range commonly found in French agricultural soils; second, to examine the consequence of a longitudinal variation in Cd^{2+} influx on the potential total Cd^{2+} uptake,

depending on the variability in root architecture. For these purposes, Cd^{2+} influx was mapped in first order lateral roots that emerge from the taproot in sunflower by using short term exposure to the radioactive tracer ^{109}Cd . Modelling was used to simulate the Cd^{2+} uptake by the cohort of first order lateral roots of a virtual sunflower root system by combining the root properties for Cd^{2+} uptake with the variability in the cohort characteristics: number of roots, distribution of their length, average root diameter. Model analysis was performed to better understand the expected impact on Cd^{2+} uptake of the root characteristics, *i.e.* the longitudinal variation in Cd^{2+} influx on one hand, and the variability in root architecture on the other hand.

Materials and methods

Plant cultivation

Seeds of sunflower (*Helianthus annuus* L. c.v. ES BIBA) were germinated on wet paper in Petri dishes in the dark at 26°C for 72 h. Then, the seedlings were transferred into hydroponics containers containing 2L of ¼ strength Hoagland nutrient solution (Hoagland and Arnon, 1950) adjusted at pH 6.7 and aerated through air bubbling. The plants were grown in a greenhouse. The air temperature was maintained within the 20-35°C range. The hydroponics containers were covered with aluminium foil to limit light diffusion into the root compartment. One third of the nutrient solution was automatically renewed every day by supplying fresh solution at the bottom of the container and by overflowing of the excess. Plants with 10-12 leaves were used for the experiments (28 days or 380 growing degree days after germination, 6 degree basis).

Longitudinal movement of ^{109}Cd during the exposure of first order lateral roots to labelled Cd (Experiment 1)

Mapping the longitudinal root influx of Cd^{2+} by using the radioisotope ^{109}Cd requires that the labelled Cd^{2+} absorbed by a given root segment does not significantly move longitudinally during the duration of labelling. Therefore, a preliminary experiment was conducted to check this. The experiment consisted in bathing a root segment in a 500 nM Cd solution labelled

with radioactive ^{109}Cd and in checking that no significant radioactivity was found in the adjacent root segments at the end of the exposure.

A single first order lateral root still attached to the plant was stretched out on a Parafilm™ foil and five stainless steel pins were placed perpendicularly to the root at 1 cm interval, either starting at the root tip or before the branching zone. Then, 40 μL -drops of a 500 nM Cd buffered solution (5 mM MES, 0.2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 500 nM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) were deposited on the junction between the root and the pins (Figure 9). The Cd concentration in the solution was analysed by atomic absorption spectrometry (AAS). Speciation modelling by using Visual MINTEQ 3.0 software indicated that Cd^{2+} activity represented 94% of Cd of the total Cd in solution. The solution spread over ~ 0.5 cm, leaving another 0.5 cm of "bare" root before the next drop. Only one of the five drops was labelled with ^{109}Cd (approximately 23 kBq per segment). In the root tip zone, the labelled solution was deposited at the root apex and was then followed by four unlabelled drops. In the basal zone, the labelled solution was the middle drop, surrounded by two unlabelled drops on every two sides (Figure 9). The untreated root part was covered with a moist paper, checking it did not touch the drops. Air temperature was 20°C and plants were exposed to light ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photosynthetically active radiations at the top of the plant). The drops were left 5, 10, or 20 min before the solutions were withdrawn by pipetting and the five ~ 1 cm long root segments were sampled by cutting the root. They were individually placed in two successive desorption baths (5 mM MES, 5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 50 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) at 2°C for 5 minutes (Buckley *et al.*, 2010). Each root segment was mineralized by wet digestion (nitric acid solution 75% + perchloric acid solution 75%, 1:1) at 60°C , and the radioactivity was determined by liquid scintillation counting (TRI-CARB 2100TR, Packard).

There were six treatments (three durations for ^{109}Cd exposure x two regions of labelling) arranged in a completely randomized block design with one plant being one block. Hence, six individual roots from the same plant were selected to perform the treatments. There were eight plants. A three-way analysis of variance was used to test the effect of the block, duration and region of exposure to ^{109}Cd on the percentage of radioactivity exported from the labelled root segment.

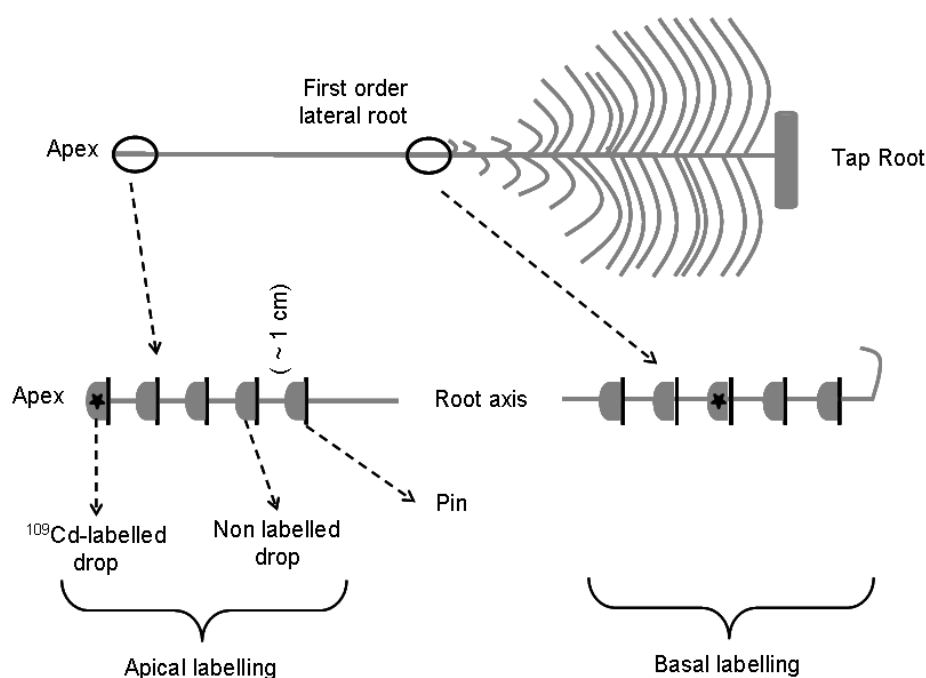


Figure 9. Schematic representation of the protocol for studying the axial transfer of ^{109}Cd in first order lateral roots of sunflower

Mapping of the longitudinal variation in ^{109}Cd influx in first order lateral roots of sunflower (Experiment 2)

This experiment aimed at characterising the longitudinal variation in ^{109}Cd influx along the first order lateral roots in sunflower. The whole root system of 28 intact plants were individually bathed for 20 minutes in 2 L of an aerated Cd-radiolabelled solution (5 mM MES, 0.2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) with Cd concentrations as $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ranging from 0.8 to 500 nM (radiolabelled with 0.18 to 5 MBq L^{-1} ^{109}Cd , respectively), the Cd^{2+} activity represented 94% of the total Cd (speciation modelling with Visual MINTEQ 3.0). The Cd concentrations in the solutions were determined by AAS before the experiment, and from the radioactivity remaining after root bathing, assuming that the specific activity of the solution did not change. The air temperature was 20°C and the plants were exposed to light ($500\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ photosynthetically active radiations at the top of the plant). At the end of the exposure, the

root system of each plant, still attached to aerial part, was immersed for 5 min into two successive 2 L desorption baths at 2°C as previously described. One representative first order lateral root per plant was detached from the tap root and divided into seven root samples according to the pattern of Figure 10. Second order lateral roots emerging from the same first order lateral root were pooled to make a unique sample. All root samples were scanned, by using a double light scanner to avoid shadows (EPSON EXPRESSION 10000XL), and the images were analysed by using Winrhizo software (Winrhizo pro V.2005a) to determine the root length and diameter. The root samples were digested by wet digestion to determine their radioactivity by liquid scintillation counting as described before.

Assuming no isotopic discrimination for the root uptake of ^{109}Cd , the influx of Cd^{2+} for each of the six root segments described in Figure 10 was calculated from the radioactivity measured in the root tissues and from the root length and diameter obtained from the scans considering roots as cylinders.

For the Cd concentrations used, the simplification of Michaelis-Menten kinetics by a linear model was first checked:

$$I = RP \cdot C_{\text{Cd}} \quad \text{Eq 2 (Nye, 1973)}$$

where I is the Cd^{2+} influx ($\text{nmol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$), C_{Cd} is the Cd concentration in the root bathing solution (nmol L^{-1}) and RP is the root absorbing power, *i.e* the root specific influx capacity, for Cd^{2+} uptake ($\text{L cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$). A linear mixed effect model was used to test the effect of the position of the segment (class variable) on the root absorbing power value (longitudinal data) for each root. This mixed effect model enabled to distinguish RP variations depending on the segment position (the fixed effects) from the random variation of RP profiles between plants (the random effects). We used backward contrast coding to test for significant differences between two subsequent segments.

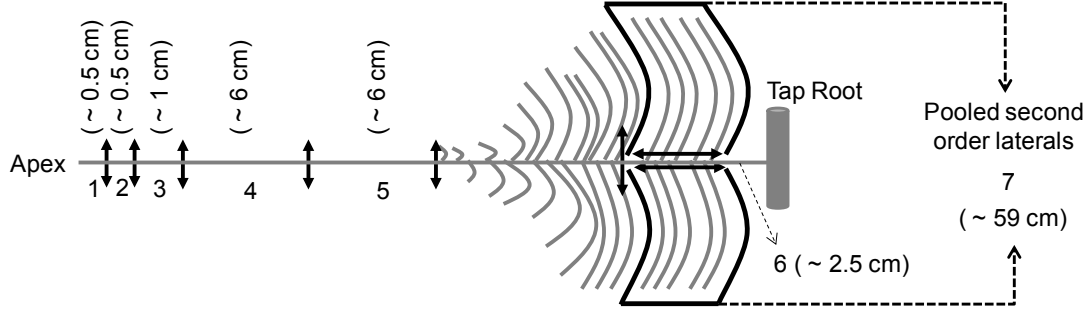


Figure 10. Schematic representation of the root segment sampling pattern for mapping ^{109}Cd influx in first order lateral roots of sunflower. *Double head arrows* indicate cutting positions. A total of seven samples were collected per first order lateral root. Samples 1 to 5 corresponded to the unbranched zone. Sample 6 was the root axis close to the tap root from which emerged the second order lateral roots pooled as sample 7

Modelling of the root absorbing power for Cd^{2+} uptake by first order lateral roots

For root regions one to six of the first order lateral roots, three mathematical models were tested to describe the changes in RP as a function of the distance to the root apex:

$$\textbf{Model 1: } RP_{(x)} = ae^{-bx} + ce^{-dx} \quad \textbf{Eq 3}$$

$$\textbf{Model 2: } RP_{(x)} = ae^{-bx} + c \quad \textbf{Eq 4}$$

$$\textbf{Model 3: } RP_{(x)} = ax^{-b} + c \quad \textbf{Eq 5}$$

where a , b , c , d are parameters estimated for each model and x is the distance between the root tip and the middle of the root segment (cm). The models were fitted by plant (longitudinal data) by using a non-linear mixed effect model so that the mean parameter estimates (fixed effects) could be separated from the between plant (root) variations (random effects). Models were compared by using the Bayesian information criteria that assesses goodness of fit while penalizing the model for the number of parameters.

Simulation of Cd^{2+} uptake by the second order lateral roots

The objective was to test if the root absorbing power model established for the first order lateral roots was also valid for the second order lateral roots. Therefore, the uptake of Cd^{2+} by each cohort of the second order lateral roots (as those present in sample #7, Figure 10) was simulated by using the 'best fit' root absorbing power model ($RP_{(x)} = ae^{-bx} + c$), parameterized for the first order lateral roots. The kinetics of Cd^{2+} influx by each second order lateral root is given by:

$$\frac{dQ_i}{dt} = \int_{x=0}^{x=L_i} (ae^{-bx} + c) \pi D_i C_{Cd} dx \quad \text{Eq 6}$$

where Q_i is the quantity of Cd^{2+} absorbed (nmol), t is time (s), x is the distance from the root apex (cm), a ($\text{L cm}^{-2} \text{s}^{-1}$), b (cm^{-1}) and c ($\text{L cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) are the parameters of the root absorbing power model, D_i (cm) and L_i (cm) are the average diameter and the length of the second order lateral root, and C_{Cd} is the Cd concentration (nmol L^{-1}).

If N is the total number of second order lateral roots sampled from a given first order lateral root (Figure 10), the total Cd^{2+} absorbed (Q) by second order lateral roots is given by the sum on all roots of the integrated uptakes (over space and time of Eq 6):

$$Q = \pi C_{Cd} t \sum_{i=1}^{i=N} D_i \left(cL_i + \frac{a}{b} (1 - e^{-bL_i}) \right) \quad \text{Eq 7}$$

where the exposure time $t = 20$ min. Then, the simulated uptake of Cd^{2+} by the second order lateral root cohorts were compared to experimental observations.

Sensitivity analysis of the Cd^{2+} uptake model for first order lateral roots in sunflower

The aim of this study was to investigate the relative influence on the total Cd^{2+} uptake of the longitudinal variation in the root absorbing power on one hand, and of the architectural variability in first order lateral roots (number, average diameter, distribution of length) on the other hand. Additionally, we examined possible interactions between these variables. Therefore, we simulated the Cd^{2+} uptake by cohorts of first order lateral roots exposed for one day to a constant Cd concentration of 20 nM. Second order lateral roots were not included in the model.

Each cohort of first order lateral roots differed for the total number of roots (N_r), for the root diameter (D), for the characteristics of the distribution (DL) of the individual root lengths L_i , and for the parameters of the root absorbing power model (a , b , c). Then, the total Cd^{2+} absorbed by a cohort of first order lateral roots is:

$$Q = \pi DC_{Cd} t \sum_{i=1}^{i=N_r} \left(cL_i + \frac{a}{b} (1 - e^{-bL_i}) \right) \quad \text{Eq 8}$$

Because the root absorbing power model $RP_{(x)} = ae^{-bx} + c$ has the constraint $a > c$, the parameter c and the difference $(a-c)$ (parameter a_c) were considered instead of combining independently parameters a and c . Table 2 shows the range for the six parameters that were tested in the sensitivity analysis.

The range for parameters a_c , c , and D were derived from our work (minimum and maximum of the observed values). For parameter b , which determines the curvature of the root absorbing power profile, the lower value corresponded to the minimum we observed and the upper value was chosen to simulate a stronger decrease in root absorbing power along 1 cm starting from the root tip, as observed by Piñeros et al. (1998). For each cohort, the different L_i were randomly drawn from the same distribution of first order lateral root length DL_k . Four empirical distributions were tested ($1 \leq k \leq 4$), obtained from experimental observations on soil-grown sunflower plants at 10 leaves growth stage (Aguirrezabal, 1993). These observations were also used to set the range for the total number of first order lateral roots (N_r) in a cohort.

All variables and parameters were combined following a four level-full factorial design giving 4096 simulations. Simulations were analysed by a six-way analysis of variance including all main effects and first order interactions.

Statistical and computation software

We used the statistical software [©]R 2.13.1 (R Core Team, 2008) to perform all computations and statistical analyses. Mixed effect models were fitted by using the 'nlme' package (version 3.1-101).

Table 2. Values of the different parameters tested in the sensitivity analysis of the model that simulates the uptake of Cd²⁺ by first order lateral roots of sunflower by accounting for the longitudinal variation in the root absorbing power (See Eq 7 in materials and methods).

Parameters names		Tested parameter values			
Root absorbing power parameters					
Shape parameter for the root absorbing power model	b (cm⁻¹)	0.17	3.11	6.06	9
Basal root absorbing power	c (L cm⁻² s⁻¹)	2.7 10 ⁻⁸	4.3 10 ⁻⁸	5.9 10 ⁻⁸	7.5 10 ⁻⁸
(Apex-Basal) root absorbing power	a_c (L cm⁻² s⁻¹)	1. 10 ⁻⁹	1. 10 ⁻⁷	2. 10 ⁻⁷	3. 10 ⁻⁷
Root architecture parameters					
Root diameter	D (cm)	0.04	0.08	0.11	0.15
Distribution of lengths in first order lateral root cohorts	DL_k	DL ₁	DL ₂	DL ₃	DL ₄
Mean –	(cm)	6.6 –	7.7 –	10.9 –	10.8 –
Median–		2.8 –	2.8 –	3.6 –	4.2 –
90 th percentile		22.1	25.9	31.1	30.3
Number of roots in first order lateral root cohorts	Nr	90	112	134	156

Results

Longitudinal movement of ^{109}Cd during exposure and choice of the duration of exposure of first order lateral roots to labelled Cd (Experiment 1)

The radioactivity found in the four root segments that were not exposed to ^{109}Cd was significantly different from the background ($p < 0.05$, not shown). However, the maximal cumulative radioactivity found in these four segments adjacent to the labelled one was 4.7% of the total recovered (Table 3), which corresponds to 5.5% of the radioactivity found in the labelled root segment (not shown). On average, the radioactivity recovered in the segments that were not exposed to the tracer decreased with the distance to the labelled segment. This movement of ^{109}Cd to adjacent root segments did not significantly depend on the labelled position (apical or basal, $p = 0.24$) nor on the exposure time ($p = 0.09$) (Table 3).

The radioactivity recovered in the labelled root segments increased linearly with the exposure duration (Figure 11). The slope of the relationship was significantly greater ($\times 2.9$) for the apical labelling than for the basal labelling ($p < 0.001$). For the 5 and 10 min exposure duration, the radioactivity recovered in the apical labelled segments was not significantly different from that found in the basal segments ($p = 0.79$ and $p = 0.09$, respectively, not shown). A significant difference between the apical and the basal ^{109}Cd uptake was only found for the 20 min exposure ($p = 0.002$). Consequently, the 20 min exposure duration was chosen for mapping the Cd^{2+} influx by sunflower roots. This duration of exposure of roots to ^{109}Cd enables sufficient radioactivity to be absorbed so that the axial variability in Cd^{2+} root influx could be revealed whilst minimizing the axial movement of Cd^{2+} during the labelling.

Table 3. Study of the axial movement of cadmium in first order lateral roots of sunflower. The root apex or a segment close to the branching zone was exposed for 5, 10 or 20 min to 500 nM radiolabelled Cd. After desorption of non-absorbed Cd²⁺, radioactivity was determined in the four root segments next to the labelled one. *Values* indicate the percentages of the total radioactivity recovered. *The bold values in grey cells* correspond to the labelled segments. The last column corresponds to the total radioactivity recovered in the four unlabelled segments and *the letter* is the mean grouping for the column by HSD Tukey test at p<0.05 (n=8).

Labelling duration (min)	Labeled segments	Percent of the total radioactivity recovered					Total transferred (%)
		1	2	Segment# 3	4	5	
5	Apex	95.26	3.29	0.22	0.26	0.97	4.74 ^a
	Basal	0.34	0.84	98.26	0.25	0.31	1.74 ^a
10	Apex	98.17	0.47	0.27	0.63	0.46	1.83 ^a
	Basal	0.15	0.20	99.00	0.47	0.18	1.00 ^a
20	Apex	99.44	0.14	0.10	0.19	0.14	0.56 ^a
	Basal	0.06	0.14	98.74	0.96	0.10	1.26 ^a

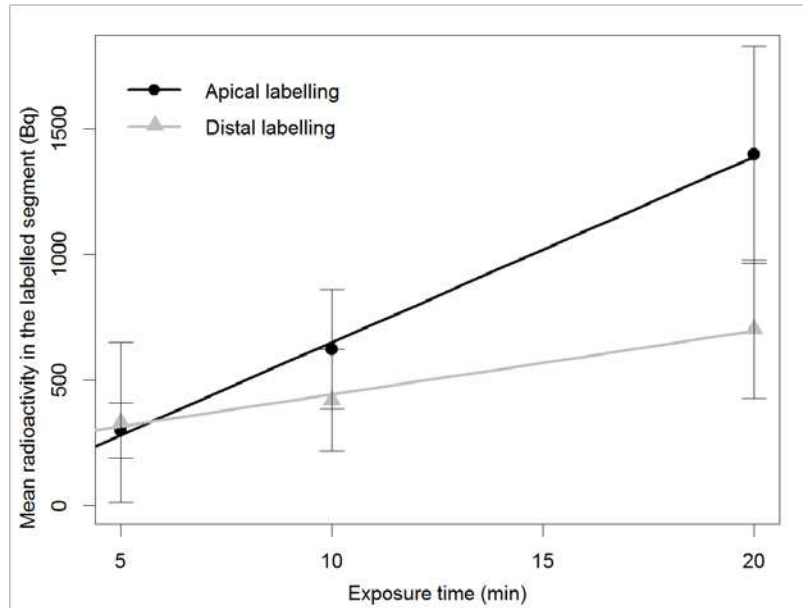


Figure 11. Radioactivity recovered in ~1 cm root segments of sunflower first order lateral roots exposed to 500 nM ^{109}Cd (approximately 23 kBq per segment) for 5, 10 or 20 min. The labelling was performed at the apex (apical labelling) or at the region just before the branching zone (basal labelling). *The lines* are the linear relationships between the radioactivity recovered and the time for the two labelling positions. *Black line with circles* represent mean radioactivity recovered for apical labelling ($y=73.9x-88.6$, $R^2=0.99$). *Grey line with triangles* represent mean radioactivity recovered for basal labelling ($y=25.3x+189.9$, $R^2=0.98$). *Vertical bars* are the standard deviation ($n=8$)

Checking for the linear model for the kinetics of Cd^{2+} influx (Experiment 2)

After exposure of different first order lateral roots to radiolabelled Cd at varying Cd concentrations, we checked that whatever the root segment number (Figure 10), the Cd^{2+} influx could be fitted by a linear relationship of the Cd concentration in the solution (Figure 12). The R^2 ranged from 0.64 to 0.88 and the worst goodness of fit resulted from a large between-plant variability. The residuals of the fits did not show any departure from the linear model (data not shown). Consequently, the Cd^{2+} influx was further modelled by using a linear model of the Cd concentration, with the root absorbing power (RP) being the slope of the relationship (Eq 2).

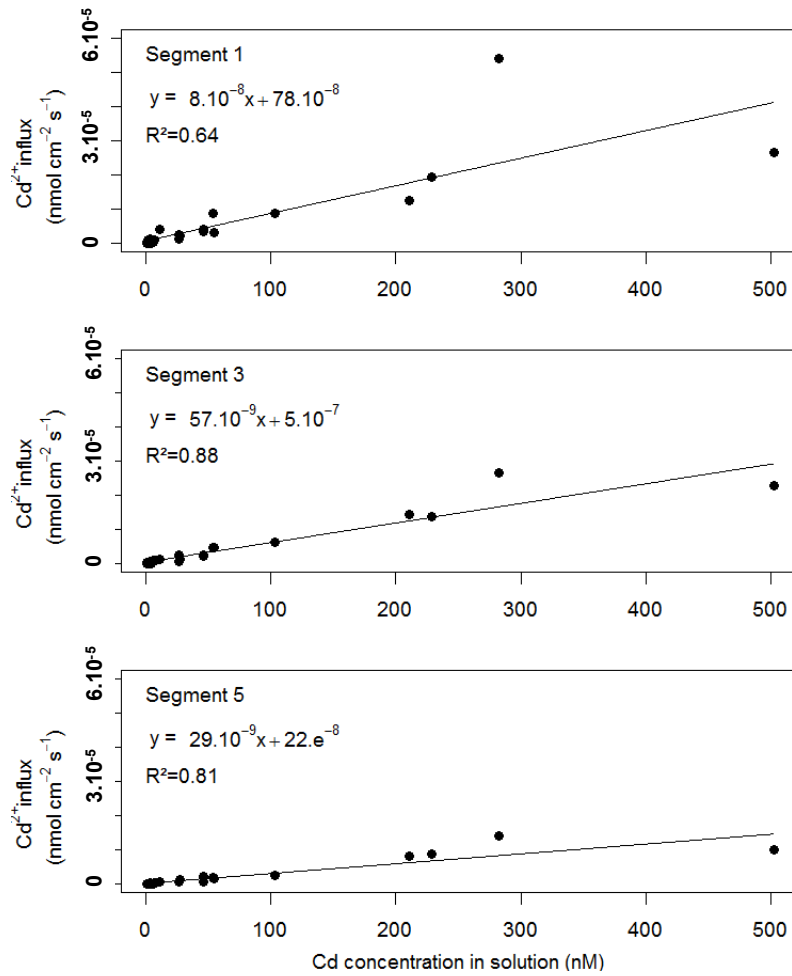


Figure 12. Influx of Cd²⁺ (nmol cm⁻² s⁻¹) in three root segments of first order lateral roots of sunflower as a function of Cd concentration in the solution of exposure. The individual first order laterals were entirely exposed to radiolabelled solution at varying Cd²⁺ concentrations (0.8 to 500 nM) for 20 min. After desorption, the roots were divided into different segments, *the number* of which refers to the position from the apex (see Figure 10). *The inset statistics* are for the linear regression between the Cd²⁺ influx and the Cd concentration

Mapping of the longitudinal variation in ¹⁰⁹Cd influx in first order lateral roots of sunflower (Experiment 2)

The root absorbing power for Cd²⁺ uptake in first order lateral roots decreased with the distance from the apex (Figure 13). The decrease was steep close to the apex, and became less pronounced in the basal positions. The values did not change significantly between 12.5 and 25 cm. Hence, from the apex to 25 cm, the root absorbing power decreased by a factor of 2.9

on average (Figure 13). The standard deviation of the root absorbing power due to the between-plant variability was high, especially for the root segments close to the root tip (grey line in Figure 13). At this location, the variability in the root absorbing power due to plant effect was as large as the apex to root base longitudinal variation.

The Bayesian information criteria (BIC) of the three different mathematical models tested to fit the axial profile were -4992, -4999, and -4875 for Model 1 (Eq 3), Model 2 (Eq 4), and Model 3 (Eq 5) respectively. So, the best one was Model 2 (Eq 4), which explained 79% of the longitudinal variation in the root absorbing power. The use of a mixed-effect model made it possible to determine the mean estimates for the model parameters (Figure 13, Table 4) while accounting for the random between plant variability (Figure 13).

Simulation of Cd^{2+} uptake by second order lateral roots

The Cd^{2+} uptake of second order lateral roots was simulated by using Model 2 that was parameterized for the first order lateral roots (Eq 4, Eq 7). The actual Cd^{2+} uptake values were strongly correlated with the simulations (Figure 14). The slope of the linear relationship (0.82) was significantly different from 1 ($p < 0.001$), indicating that the model tended to overestimate the Cd^{2+} uptake by the second order lateral roots by 22% on average.

Table 4. Parameters of the exponential + constant model fitted to the axial profile of the root absorbing power for Cd absorption by first order lateral roots of sunflower. The root absorbing power (RP, $\text{L cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) was $\text{RP} = ae^{-bx} + c$, where x is the distance to the root apex (cm) and a, b, c are the model parameters. The parameters were estimated by fitting the model to experimental data of Cd influx in first order lateral roots of 10-12 leaves sunflower plants exposed to ^{109}Cd labelled solutions at varying Cd concentrations (n=28)

Parameters	Estimates	Standard error of the estimates
a ($\text{L cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	$1.1 \cdot 10^{-7}$	$0.19 \cdot 10^{-7}$
b (cm^{-1})	0.20	0.023
c ($\text{L cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	$5.0 \cdot 10^{-8}$	$0.40 \cdot 10^{-8}$

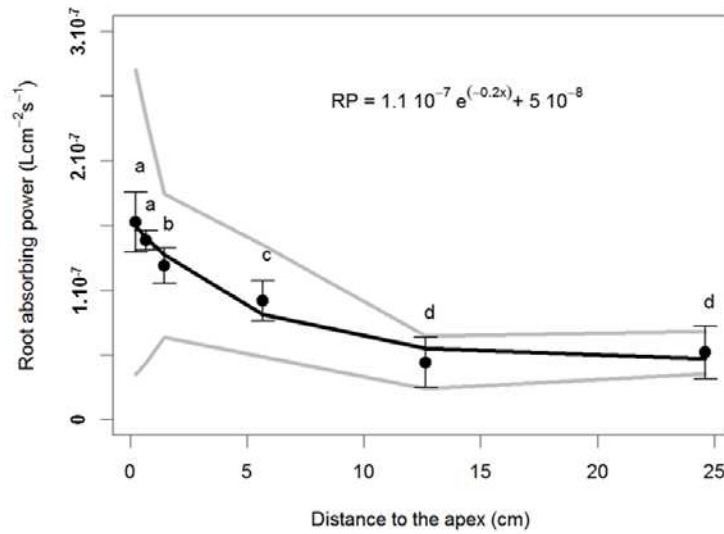


Figure 13. Axial profile of the root absorbing power (RP, $\text{L cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) for Cd^{2+} uptake in first order lateral roots of sunflower. The root absorbing power RP is given by the model : $I = \text{RP } C_{\text{Cd}}$, where I is the influx of Cd^{2+} ($\text{nmol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) and C_{Cd} is the Cd concentration in the solution (nmol L^{-1}). The points are the mean estimates, the vertical bars are their standard errors, the black line is the mean estimates fitted by the model $\text{RP} = ae^{-bx} + c$ ($\text{RP} = 1.1 \cdot 10^{-7} e^{-0.2x} + 5 \cdot 10^{-8}$, $R^2 = 0.79$), and the grey lines are the between-plant standard deviation (random effects estimated from the mixed effect model, $n=28$). Letters indicate significant differences between two neighbouring segments at $p < 0.05$

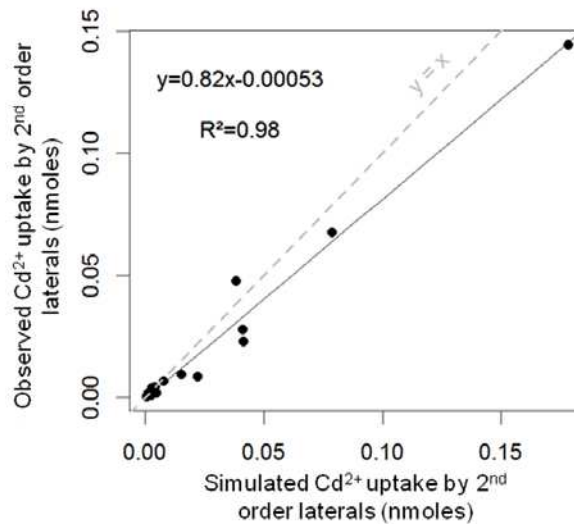


Figure 14. Observed versus simulated values of Cd^{2+} uptake by second order lateral roots of sunflower. The simulated uptakes were calculated by using the model describing the axial profile of Cd^{2+} influx in first order lateral roots (see materials and method for details). The full line is the observed vs simulated regression and the dotted line is the $y=x$ line

Sensitivity analysis of the Cd^{2+} uptake model for first order lateral roots in sunflower

A full four level factorial design was used to assess the influence of the variables and parameters of the model that predicts Cd^{2+} uptake by first order lateral roots and that accounts for the longitudinal variation in the root absorbing power (Eq 8).

The variance analysis of the simulated Cd^{2+} uptake indicates that main effects and first order interactions explain 83% of the total variance. In detail, main effects strongly dominate and first order interactions are of little influence (Figure 15). The most influential interaction $a_c \times b$ is related to parameters of the root absorbing power profile and contributes little to the total variance. The interactions between the root absorbing power parameters and the root architectural variables (Table 2) are of little importance.

Most influential variables relate to both root architecture and to the longitudinal variation in the root absorbing power variable. Comparisons of the effect of variables on Cd^{2+} uptake shows that the most influential is the root diameter D ($\times 3.4$) followed by the basal root absorbing power c ($\times 2.5$), the curvature parameter of the root absorbing power profile b ($\times 2.2$), the number of roots N_r ($\times 1.8$), the distribution of their length DL ($\times 1.6$) and the variation in the root absorbing power between the root tip and the root base a_c ($\times 1.4$) (Figure 16, a, b, c, d, f, e). Because of its interaction with the parameter a_c (Figure 15), the curvature parameter b has a non-linear total effect. It is mainly influential in the range 0.17-3.11 (Figure 16, c) and it is all the more influential than the variation in the root absorbing power between the root tip and the root base a_c is strong (not shown).

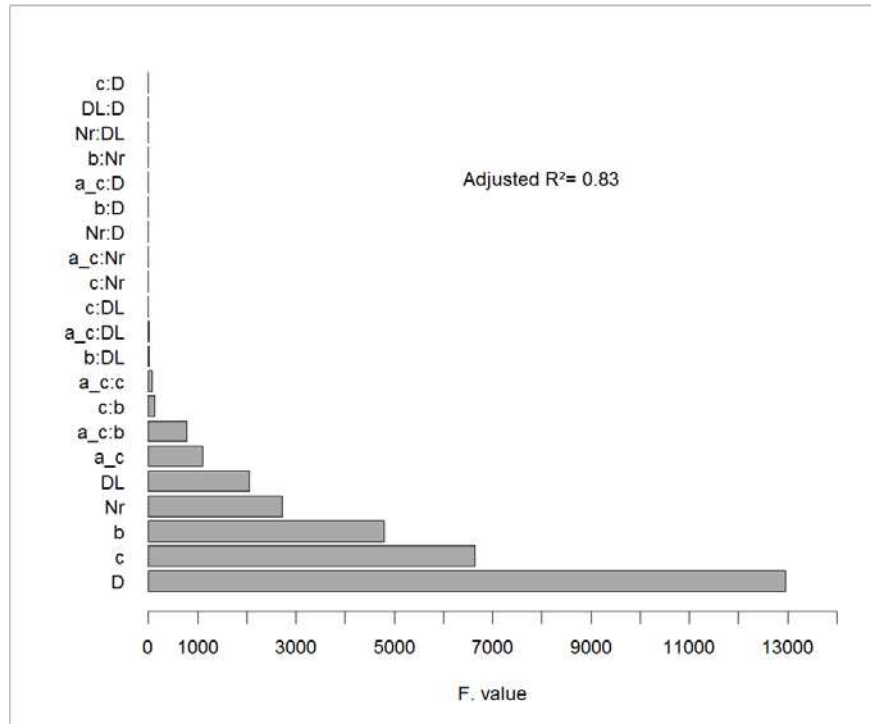


Figure 15. Analysis of variance for the simulated uptake of Cd^{2+} by cohorts of first order lateral roots in sunflower. Simulations were calculated from the model that accounts for the longitudinal variation in the root absorbing power (see Eq 8) and for 24 h exposure to 20 nM Cd. From the exponential + constant model for the root absorbing power ($\text{RP} = ae^{-bx} + c$), the parameter a_c is the root absorbing power difference between the apex and the base of the root ($a_c = a - c$) and b is the shape parameter. Other variables are D , the root diameter, Nr , the number of roots in each cohort of first order lateral roots, and DL is the distribution of individual root lengths in the cohorts. Bars are the ordered Fisher's statistics for the main and first order interactions

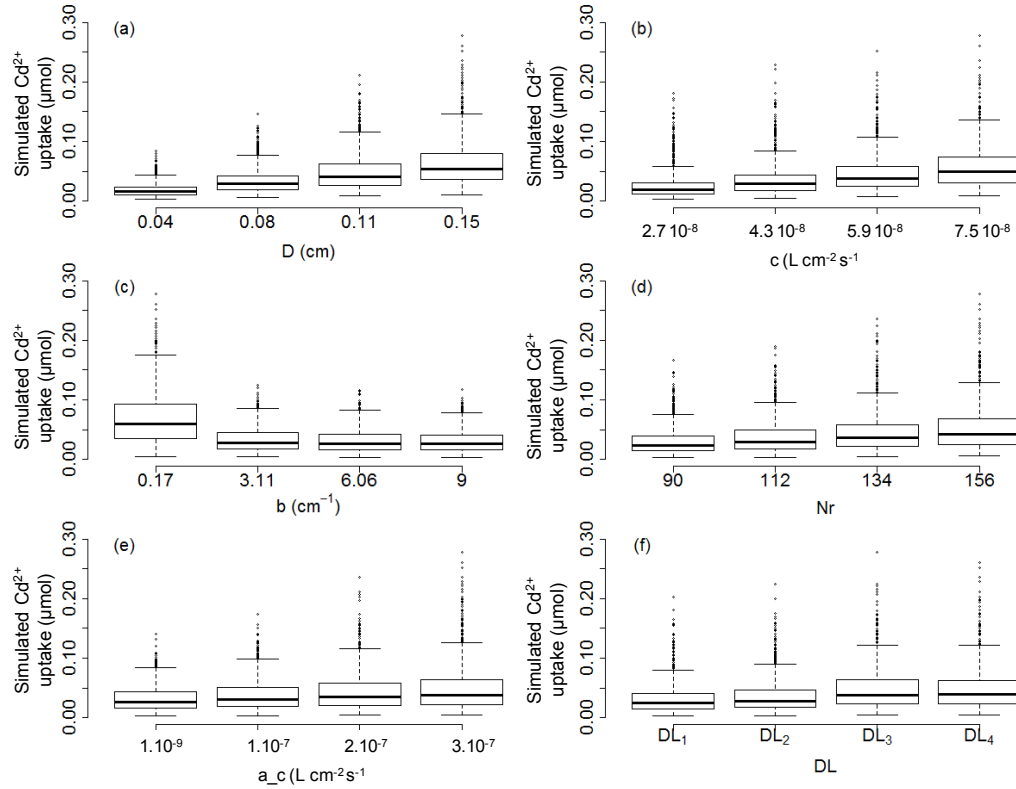


Figure 16. Simulation of Cd^{2+} uptake (μmol) by sunflower first order lateral root cohorts exposed for 24 h to 20 nM Cd. Simulations were calculated from the model that accounts for the longitudinal variation in the root absorbing power (see Eq. 8). The boxplots present the effect of the different parameters of the model tested in the sensitivity analysis. Each boxplot ((a), (b), (c), (d), (e), and (f)) corresponds to the distribution of the simulated values for the Cd^{2+} uptake when one parameter is fixed (D, c, b, Nr, a_c, and DL respectively) and the others were allowed to vary. From the exponential + constant model of the root absorbing power ($\text{RP} = ae^{-bx} + c$), the parameter a_c is the root absorbing power difference between the apex and the base of the root ($a_c = a - c$) and b is the shape parameter. Other variables are D, the root diameter, Nr, the number of roots in each cohort of first order lateral roots, and DL is the distribution of individual root lengths in the cohorts

Discussion

Longitudinal movement of ^{109}Cd during the exposure of first order lateral roots to labelled Cd

In the perspective of mapping the longitudinal variation in Cd^{2+} influx into sunflower roots supplied with ^{109}Cd , it was important to check that the radioactivity found in the root segments mainly originates from the uptake and not from the longitudinal movement of the

tracer during the exposure. When ^{109}Cd was locally supplied either at the root tip or before the branching zone of first order lateral roots, the radioactivity found in the root segments next to the labelled position was significantly different from the background counts, suggesting some longitudinal movement of ^{109}Cd . However, because no more than 5% of the total absorbed radioactivity were recovered in the non-labelled regions (Table 3), the amount of Cd^{2+} that moved longitudinally was considered to be negligible as compared to the total absorbed up to 20 min time of exposure. Similarly, very little ^{32}P moved longitudinally in bean roots for labelling duration up to 30 min (Rubio *et al.*, 2004). The very low longitudinal movement of Cd^{2+} we observed is also consistent with the 2.4 to 6.6 cm h^{-1} velocities of Cd^{2+} in xylem reported in rice by Fujimaki *et al.* (2010) and by Ishikawa *et al.* (2011). Finally, detoxification of Cd^{2+} by storage into vacuoles and interactions of Cd^{2+} with negative charges of xylem vessels are expected to further reduce its mobility (Clemens *et al.*, 2002). Hence, we can reasonably assume that during a 5 to 20 min exposure to ^{109}Cd , the longitudinal movement of the tracer is negligible and consequently, the radioactivity recovered in a root segment is representative of the amount of Cd^{2+} absorbed locally.

Mapping of the longitudinal variation in ^{109}Cd influx in first order lateral roots of sunflower

Whatever the position of the root segments, the influx of Cd^{2+} was proportional to the Cd concentrations in the exposure solutions (Figure 12). In wheat, Berkelaar and Hale (2000) also observed a linear accumulation of Cd^{2+} in roots for Cd concentration in the solution increasing up to 391 nM. Hence, in this study and in our work, the theoretical Michaelis-Menten kinetics for the Cd^{2+} influx could be approximated by a linear relationship of the Cd concentration in the solution. Numerical simulations show that this approximation is valid if the Cd concentration in the solution is approximately below half of the value of the Michaelis-Menten constant (K_m). We have not been able to find K_m values for sunflower. The range for the K_m values reviewed by Lux *et al.* (2011) for non hyperaccumulators and for Cd concentrations that are consistent with ours is 20-600 nM. Considering this, it is likely that most of the Cd concentrations tested here were low enough so that the influx could be approximated by a linear relationship.

The Cd^{2+} influx is higher at the root tip than at the basal root location. By using cadmium-selective microelectrodes, a longitudinal variation in Cd^{2+} influx has also been evidenced (Farrell *et al.*, 2005; He *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Pineros *et al.*, 1998). However the longitudinal profiles of Cd^{2+} influx derived from these previous works are hardly comparable with our results because the profiles derived from microelectrodes concentrated on the first millimetres starting at the root tip. Our work extended measurements further toward the root base, which is important in the perspective of coupling Cd^{2+} influx with the root architecture. Hence, although there was not a great spatial resolution, our results report for the first time to our knowledge, an extended longitudinal profile for Cd^{2+} influx in sunflower first order lateral roots.

There may be several reasons for the longitudinal variation in Cd^{2+} influx. First, Cd^{2+} is assumed to be mainly absorbed by energy-driven transporters (Costa and Morel, 1994; Hart *et al.*, 1998; He *et al.*, 2009), in particular those of Zn (Clemens, 2001). So, a higher metal influx in the root tip region may reflect a higher activity of the transporters. The higher activity of Cd^{2+} transporters at the root tip is possible if these proteins are over-expressed. Changes in Cd^{2+} transporter expression has already been reported, in particular depending on plant nutrient status (Durmaz *et al.*, 2011), or on plant genotype (Assuncao *et al.*, 2001; He *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2004). The greater activity of Cd^{2+} transporters at the root tip also requires more energy in that part of roots, which is consistent with the longitudinal profile of sugar concentration in root tissue (Jones, 1998).

Secondly, the longitudinal variation in Cd^{2+} influx can result from the development of apoplastic barriers, *i.e.* the Casparian bands and suberin lamellae in the endodermis and exodermis (Enstone *et al.*, 2002). In the root region before endo- and exo-dermis differentiation, all cells can potentially internalize Cd^{2+} from the apoplast whereas when the endodermis and the exodermis are mature, Cd^{2+} internalization is likely to be mainly limited to epidermis and cortex cells because the Casparian bands and suberin lamellae restrict the apoplastic diffusion of ions (Cholewa, 2000; Enstone *et al.*, 2002; Ferguson and Clarkson, 1976; Lehmann *et al.*, 2000). Hence, the differentiation of apoplastic barriers have been assumed to be responsible for the variation in Cd accumulation in different species (Lux *et al.*, 2004; Redjala *et al.*, 2011). So, starting at the root apex, the developpement of the endodermis and then of the exodermis along with the deposition of suberin lamellae could explain that we

observed a decrease in Cd^{2+} influx with the distance to the root tip in first order lateral root of sunflower. Because RP variation is likely to be linked to the differentiation of these specific structures, it could be more relevant to link the RP to the age of root segments rather than the distance from the apex.

The development of apoplastic barriers along the root is highly variable, in particular depending on the root environment. The lack of oxygen (Enstone and Peterson, 2005), the elongation rate of the root (Perumalla *et al.*, 1990), and the culture medium (Redjala *et al.*, 2011), for example, could strongly affect the axial distribution of the apoplastic barriers and probably the longitudinal variation in Cd^{2+} influx. In maize particularly, Redjala *et al.* (2011) found that as compared to hydroponics, in soil conditions, the barriers developed much closer to the apex and they were more regular. The influence of environmental conditions on the differentiation of apoplastic barriers may contribute to explain the high between-plant variability we observed. In particular, although we tried to select comparable roots for mapping the Cd^{2+} influx, we could not assert all roots had the same age, elongation rate and possibly oxygen availability. Additionally, the decline in ion influx with root age (Barber, 1995) and the variability in plant energy status may have also influenced our observations.

The Cd^{2+} uptake by second order lateral roots simulated by using the root absorbing power model parameterized for first order lateral roots was linearly related to experimental observations, suggesting that a longitudinal variation in root absorbing power for Cd^{2+} uptake is likely to also exist in second order lateral roots. However, the simulation moderately overestimated actual values, which indicates that the root absorbing power should be specifically determined for second order lateral roots.

Sensitivity analysis of the Cd^{2+} uptake model for first order lateral roots in sunflower

The simulations of Cd^{2+} uptake for 24 h by first order lateral root cohorts exposed to 20 nM Cd and the subsequent analysis of variance of the results indicate that among the root architecture variables, the root diameter is the most influential followed by the number of roots in the cohorts. As indicated by Eq 8, these variables increase linearly the Cd^{2+} uptake by increasing the root surface area. This is consistent with experimental observations from

literature that showed the uptake of ions (for example Ca, and P) can be positively related to root diameter (Harrison-Murray and Clarkson, 1973; Nwoke *et al.*, 2008).

Among the parameter related to the longitudinal variation in Cd^{2+} influx, the most influential are the basal root absorbing power c and b , the parameter characterizing the shape of the longitudinal decrease in root absorbing power. The b parameter is mainly influential for values within the $0.17 - 3.11 \text{ cm}^{-1}$ range, which corresponds to our observations for hydroponics cultures. Assuming the differentiation of apoplastic barriers are mainly responsible for the variation in Cd^{2+} influx (Redjala *et al.*, 2011; Lux *et al.*, 2004), in soil conditions, the high root absorbing power is expected to be restricted to a narrow region at the root tip because apoplastic barriers develop much more closer to the root apex than in hydroponic conditions (Redjala *et al.*, 2011). Consequently, in soil conditions, the shape parameter b , should be much higher, in the $6 - 9 \text{ cm}^{-1}$ range, where its influence is very low (Figure 16, c). We conclude that in soil conditions, the shape of the longitudinal pattern of the root absorbing power may not strongly influence the uptake of Cd^{2+} by cohorts of first order lateral roots.

Although the stronger influx at the root tip (parameter a_c) is not the most influential parameter, its variability makes the total uptake vary by 1.4 fold on average. Therefore, it may be important to consider this greater Cd^{2+} influx at the root tip when investigating the relationship between root architecture and uptake of Cd^{2+} by the root system.

The analysis of variance of the simulations shows that interactions are not very influential (Figure 15). The longitudinal variation in root absorbing power governs the Cd^{2+} uptake by individual roots, independently of the root number and diameter and in that case, the lack of interactions can easily be understood. However, the longitudinal variation in root absorbing power influences differently the Cd^{2+} uptake by individual roots, depending on their length. Consequently, interactions between the root absorbing power parameters and the root length distribution (DL) were expected. We think that the four root length distributions we tested were not enough contrasted to exacerbate the interactions with the root absorbing power profile. This low variability in the root length distribution is likely to also explain why this variable had moderate influence on Cd^{2+} uptake, although root length has been demonstrated to have a strong effect on nutrient uptake (Dong *et al.*, 1995; Hodge, 2004) or

on Cd^{2+} uptake (Berkelaar and Hale, 2000). These root length distributions we tested were derived from observations on soil-grown sunflower, shaded or not and sown at different dates (Aguirrezabal, 1993). In order to get a better insight into the interactions between the root architecture and the longitudinal variation in root Cd^{2+} influx, further observations are needed to characterize root architecture variability in sunflower, depending on growth conditions or on genotype.

Conclusion

Our work has highlighted that in sunflower first order lateral roots, Cd^{2+} influx decreased by 2.9 in average between the root tip and the root base. After combining this longitudinal variation in Cd^{2+} influx with architectural root variables (root diameter, number of roots and root length distribution), simulations indicated that the total Cd^{2+} uptake by first order lateral roots cohorts could vary by x1.4 depending on the difference in Cd^{2+} influx between the root tip and the base of the root. This is an important point to consider when investigating how root architecture could impact the uptake of Cd^{2+} by the root system. Provided that additional data on the variability in root architecture in sunflower are available, this could be achieved by including the longitudinal variation in Cd^{2+} influx for all root orders in a generic root architecture model (Pagès *et al.*, 2012) and by making a sensitivity analysis of the resulting model.

Acknowledgements

This work was supported by the funding ANR 2011 CESA 008 01 and by a research grant from the Technical Center for Oilseed Crops and Industrial Hemp (CETIOM) and from the French National Institute for Agricultural Research (INRA). The authors are grateful to S. Bussière, C. Coriou and S. Thunot for their helpful technical contribution.

CHAPITRE 3.
DEPENDANCE DE L'INFLUX RACINAIRE DE Cd^{2+} AU
SUBSTRAT DE CULTURE, A L'ORDRE ET L'AGE DE
LA RACINE CHEZ LE TOURNESOL (*Helianthus*
***annuus* L.)**

Chapitre 3. Dépendance de l'influx racinaire de Cd^{2+} au substrat de culture, à l'ordre et l'âge de la racine chez le tournesol (*Helianthus annuus* L.)

Ainsi, après avoir mis en évidence une variation longitudinale de l'influx de Cd^{2+} chez les racines latérales d'ordre 1 en hydroponie, (Chapitre 2), la suite du travail a consisté à examiner si le profil de l'influx dépendait du substrat de culture, de l'ordre des racines et de leur âge. En effet, les simulations avaient suggéré que si l'influx décroît rapidement avec la distance à l'apex la variation longitudinale d'influx aurait peu d'effet sur le prélèvement total de Cd lorsque l'architecture racinaire varie. Cela peut être le cas si les racines poussent sur substrat solide comme le sol, ce type de substrat favorisant le développement des barrières apoplasmiques plus proches de l'apex. (Redjala *et al.*, 2011). En outre, la comparaison avec les observations expérimentales des simulations du prélèvement de Cd par les latérales d'ordre deux suggère que les influx pourraient être différents entre ordres de racines.

Cette partie du travail a abouti aux conclusions suivantes :

- Nous avons confirmé la variation longitudinale de l'influx en Cd^{2+} pour des latérales d'ordre un de tournesol en hydroponie et démontré que cette variation longitudinale était retrouvée également pour les latérales d'ordre deux.
- L'influx est toujours moindre sur substrat sableux qu'en hydroponie et la baisse de l'influx se situe plus près de l'apex (profil plus creusé) sur sable
- Une baisse d'influx de Cd^{2+} avec l'âge de la racine n'est vraiment marquée qu'en hydroponie.
- Pour une position donnée, les latérales d'ordre 2 ont un influx plus faible que leur homologue d'ordre 1 car le segment racinaire est plus vieux (sauf à l'apex)
- L'influx moyen de l'ensemble de la racine chez les latérales d'ordre 2 est en moyenne plus important que celui des latérales d'ordre 1 car les latérales d'ordre 2

sont plus courtes. Il est donc attendu qu'un système racinaires comportant beaucoup de latérale d'ordre 2 prélève plus de Cd.

Ce travail a fait l'objet d'un manuscrit prêt à être soumis à la revue "Plant and Soil"

Longitudinal variation in cadmium influx in sunflower (*Helianthus annuus* L.) roots as depending on the growth substrate, root age and root order

Marie A. Laporte^{1,2}, Laurence Denaix^{1,2}, Sylvie Dauguet³, Christophe Nguyen^{1,2}.

¹ INRA, UMR1220 TCEM, F-33883 Villenave d'Ornon, France

² Univ. Bordeaux, UMR1220 TCEM, F-33883 Villenave d'Ornon, France

³ CETIOM, 11 rue Monge, Parc Industriel, 33600 PESSAC, France.

Corresponding author: INRA, UMR1220 TCEM, 71 avenue Edouard Bourlaux B.P.81, F-33883 Villenave d'Ornon, France. Christophe.Nguyen@bordeaux.inra.fr, tel : +33557122507, fax : +33557122515

Abstract

Aims – In a previous work we observed a longitudinal variation in Cd^{2+} influx in first order lateral roots of sunflower (*Helianthus annuus* L.) grown in hydroponics that could impact total Cd^{2+} uptake depending on the root system architecture and on the characteristics of the profile of variation of the influx. This work examined the influence of the culture substrate, of the age and order of lateral roots on the longitudinal variation of Cd^{2+} influx.

Methods – By using short-term exposures to ^{109}Cd -labelled solution (5 to 200 nM), we compared the longitudinal variations in Cd^{2+} roots influx depending on the growth substrate (hydroponics or sand), on the root age and order.

Results – In second order laterals, Cd^{2+} influx decreased from the apex to the root base, as for first order laterals. For sand cultures compared to hydroponics the mean Cd^{2+} influx was lower and decreased more steeply with the distance from the apex. The influx also decreased with increasing root age and order, markedly in hydroponics but less for sand cultures.

Conclusion – Cd^{2+} influx determined in hydroponics is likely to overestimate that in soil. Results suggested that the lower the average root length of the root system, the higher the total Cd^{2+} uptake.

Keywords: Cadmium, growth substrate, influx, longitudinal variation, root age and order, sunflower

Introduction

Cadmium (Cd) is a natural soil trace element, the concentration of which can increase in cultivated soils (Rasmussen et al. 1998) due to industrial contaminations and agricultural inputs, especially phosphate fertilizers (Adriano 2001). The free Cd^{2+} in the soil solution is absorbed by plant roots and part of it is translocated aboveground, including to the edible plant parts. Because Cd is extremely toxic for biological organisms including human, crop contamination by Cd is an important issue that is subjected to regulations aimed at securing food and feed products. Among the most frequently cultivated plants, sunflower (*Helianthus annuus* L.) generally accumulates higher levels of Cd than other species such as maize (Grant et al. 2008) and the Cd contamination of sunflower can be a concern regarding the quality of oil cakes used as feed (Ansari et al. 2009). On the other hand, the relative high accumulation of Cd by sunflower makes this species a good candidate for phytoremediation of contaminated soils (Faessler et al. 2010; Niu et al. 2007; Vangronsveld et al. 2009).

Crop contamination by Cd mainly originates from the absorption of the contaminant by the root system (Smolders 2001), predominantly as Cd^{2+} . It is generally recognized that Cd^{2+} uptake by roots involves both an apoplastic and a symplasmic route (Lux et al. 2011; Redjala et al. 2009) and that Cd^{2+} internalization into the symplasm is mediated by energy-dependent transporters (Cataldo et al. 1983; He et al. 2009). Furthermore, some studies have reported a longitudinal variation of Cd^{2+} influx along roots in *Triticum aestivum*, *Noccaea caerulea* (previously called *Thlaspi*), *Sueda salsa* and *Populus canescens*, (Farrell et al. 2005; He et al. 2011; Li et al. 2012; Pineros et al. 1998). In a recent work (Laporte et al. 2013), we also observed a 2.9 times decrease in Cd^{2+} influx in first order lateral roots of sunflower. The longitudinal variation of Cd^{2+} influx could impact the total Cd^{2+} uptake by the root system depending on its architecture. Root systems with relatively more root tips are likely to take up more Cd^{2+} , which was supported by some experimental observations in wheat (Berkelaar and Hale 2000). Therefore, in a previous work (Laporte et al., 2013), we theoretically examine by a modelling approach to what extent the longitudinal variations in Cd^{2+} influx of the first order lateral roots could impact the total Cd^{2+} uptake in sunflower according to typical variations in the root system architecture. The sensitivity analysis of the model indicated that the total uptake of Cd^{2+} by the cohort of first order lateral roots could vary by x1.4, depending on the value of the difference of the influx between the root tip and the root base, by x2.2

depending on the shape of the longitudinal variation of the influx and by x 2.5 depending on the value of the influx at the root base (Laporte *et al.*, 2013). These results showed the importance of characterizing and understanding the variability of the longitudinal root influx of Cd^{2+} .

Two main hypotheses have been suggested to explain this longitudinal variation (Laporte *et al.* 2013). First, a higher transporter density or activity at the root tip, which is consistent with the longitudinal profile of sugar concentration in roots (Jones 1998), could result in an enhanced absorption. Secondly, the development of apoplastic barriers in the endodermis and in the exodermis, *i.e.* the Casparian band and the suberin lamellae, are known to restrict the apoplastic diffusion of ions and the subsequent internalisation into the symplasm (Cholewa 2000; Enstone *et al.* 2002; Ferguson and Clarkson 1976; Lehmann *et al.* 2000). Consequently, the acropetal maturation of these barriers may limit the apoplastic route of Cd^{2+} and the subsequent internalization, resulting in a greater influx at the root tip where the barriers are not or incompletely differentiated (Lux *et al.* 2011; Redjala *et al.* 2011).

The development of the apoplastic barriers is strongly influenced by the root environment (Enstone *et al.* 2002) and particularly the growth substrate. Hence, in soil or aeroponics, mature endodermis and exodermis are located closer to the root apex than in hydroponics and this was correlated to a decrease in Cd^{2+} uptake in maize (Redjala *et al.* 2011). The more frequent occurrence of mature apoplastic barriers in aeroponics and soil can be seen as a strategy to limit water and ions losses from the root tissues as well as the result of a slower elongation rates (Enstone *et al.*, 2002). Based on these results, the longitudinal profile of Cd^{2+} influx in sunflower roots is expected to be impacted by the growth substrate, with lower influx in sand culture as compared to hydroponics (*Hypothesis 1*).

In sunflower as in many other root systems, the elongation rate of lateral roots declines with time and also depends on the order and position of the lateral roots as a result of source-sink relationships governing photoassimilate allocation (Aguirrezabal *et al.* 1994). This differential partitioning of energy could in turn have significant consequences on the Cd^{2+} influx, which is expected to be more important in fast growing roots receiving relatively more energy. On the other hand, because the differentiation of apoplastic barriers starts behind the root tip, the degree of maturation of these barriers along the root axis increases more or less

rapidly with the distance from the root tip, depending on the rate of differentiation relatively to the elongation rate. Hence, the faster the root elongates, the longer the zone of immature apoplastic barriers (Perumalla et al. 1990), the lower the expected decrease in Cd^{2+} influx along the root axis. Combining the influence of energy availability and of the dynamics of apoplastic barriers maturation on Cd^{2+} influx, it can be hypothesized that relatively fast growing roots should have a higher Cd^{2+} influx that decreases less with the distance from the root tip (*Hypothesis 2*). Similarly, the Cd^{2+} influx should also be lower for second order lateral roots as compared to first order ones in agreement with their lower elongation rates (*Hypothesis 3*) evidenced elsewhere Aguirrezabal et al. (1994). This could explain the overestimation of Cd^{2+} uptake by second order lateral roots when it was simulated by taking the first order lateral roots influx (Laporte et al. 2013).

Therefore, this study aimed at testing these three hypotheses to better characterise the variability of longitudinal profile of Cd^{2+} influx along sunflower roots for further modelling the uptake of the metal by the whole root system. For these purpose, Cd^{2+} influx was mapped in first and second order lateral roots sampled from plants grown either in hydroponics or in sand cultures.

Materials and methods

Plant cultivation

Seeds of sunflower (*Helianthus annuus* L. c.v. ES BIBA) were germinated on wet paper in Petri dishes in the dark at 26°C for 72 h.

The seedlings were cultivated either in nutrient solution or in quartz sand. For the cultures in nutrient solution, the seedling were transferred into hydroponics containers containing 2 L of bubbled $\frac{1}{4}$ strength (for macro elements) Hoagland nutrient solution (Hoagland and Arnon 1950) adjusted at pH 6.7. The hydroponics devices were covered with aluminium foils to limit light diffusion into the root compartment. One third of the nutrient solution was automatically renewed every day by supplying fresh solution at the bottom of the container and by overflowing of the excess. For the sand cultures, quartz sand was first washed with deionised

water and moistened with $\frac{1}{4}$ strength Hoagland nutrient solution, adjusted at pH 6.7 before filling flat rhizoboxes that had the following height x width x thickness dimensions for the root compartment: 49 x 28 x 1.6 cm. The germinated seeds were placed 1 cm depth below the upper sand surface. The transparent front sides of the rhizoboxes were also covered with aluminium foils to limit light diffusion into the root compartment. Fresh nutrient solution was daily added at the same rate as for hydroponic devices, the excess being drained at the bottom of the rhizoboxes.

All seedlings were grown in a greenhouse with the air temperature maintained within the 20-35°C range. Plants with 9-14 leaves were used for the experiments (about 30 days or 380 growing degree days after germination, 6 degree basis).

Mapping of the longitudinal variation in ^{109}Cd influx in first and second order lateral roots grown either in hydroponics or in sand substrate

This experiment aimed at characterising and comparing the longitudinal variation of ^{109}Cd influx along the first and second order lateral roots grown either in hydroponics or in sand.

For each plant grown in nutrient solution and in sand ($n = 4$ for each substrate), eight first order lateral roots were selected for the exposition to ^{109}Cd the day after. For hydroponics cultures, the selected roots were isolated from the bulk root mass by individually surrounding them with a plastic 'sock', opened at both ends to allow the bubbling of the nutrient solution. These individuals were still attached to the taproot and still bathed with the rest of the root system. Regarding the sand cultures, the rhizobox front covers were carefully removed and the root systems were gently washed with nutrient solution before also selecting eight first order lateral roots per plant. The root systems and the selected roots isolated in the plastic socks were transferred into nutrient solution till the day after. The roots were chosen so to have variable lengths of the apical unbranched zone as an indication of their age and elongation rates. Long apical unbranched zone was assumed to correspond to young fast growing roots.

The protocol for mapping the Cd^{2+} influx in individual roots was that of Laporte *et al.* (2013). Briefly, for each plant, the eight first order lateral roots previously identified (see above) and still attached to the taproot were exposed by pairs to four different Cd concentrations (*i. e.* 5, 75, 120, 200 nM Cd as $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$). Pairs of roots were first acclimated for 20 min in 300 ml of an aerated solution (5 mM MES, 0.2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) containing unlabelled Cd at one of the four Cd tested concentrations. The air temperature was 20°C and the plants were exposed to light ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photosynthetically active radiations at the top of the plant). Thereafter, the pair of roots were transferred for 20 min in another solution with the same composition but labelled with ^{109}Cd . The Cd activity of the labelling solutions was determined by liquid scintillation counting of a 0.2 ml aliquot and the total Cd of the solution was quantified by atomic absorption spectrometry. The Cd^{2+} activity in all solutions represented 94% of the total Cd (speciation modelling with Visual MINTEQ 3.0). At the end of the exposure, the roots were transferred into two successive 300 ml desorption baths at 2°C for 5 min each (5 mM MES, 5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 50 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) (Buckley *et al.* 2010).

Each first order lateral roots was detached from the taproot and divided into six segments according to the pattern of Figure 17. Two second order lateral roots per first order lateral root were subsampled at two distances from the root tip in order to have a relatively young and mature root since the emergence of lateral roots is acropetal. The two second order lateral roots were themselves divided into three or four root segments depending on their total length (Figure 17).

All root samples were scanned by using a double light scanner to avoid shadows (EPSON EXPRESSION 10000XL), and the images were analysed by using Winrhizo software (Winrhizo pro V.2005a) to determine the root length and diameter. Each root segment was mineralized by wet digestion (nitric acid solution 75%+ perchloric acid solution 75 %, 1:1) at 60 °C, and the radioactivity was determined by liquid scintillation counting (TRI-CARB 2100TR, Packard). Assuming no isotopic discrimination for the root uptake of ^{109}Cd , the influx of Cd^{2+} for each root segment was calculated from the radioactivity measured in the root tissues and from the root length and diameter obtained from the scans considering roots as cylinders.

As previously tested (Laporte *et al.*, 2013), because the Cd concentrations used were low, the kinetics for the Cd^{2+} influx was fitted to a linear model (Nye 1973):

$$I = RP C_{\text{Cd}} \quad \text{Eq 9}$$

where I is the Cd^{2+} influx ($\text{nmol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$), C_{Cd} is the Cd concentration in the root bathing solution (nmol L^{-1}) and RP is the root absorbing power, *i.e.* the specific root influx capacity, for Cd^{2+} uptake ($\text{L cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

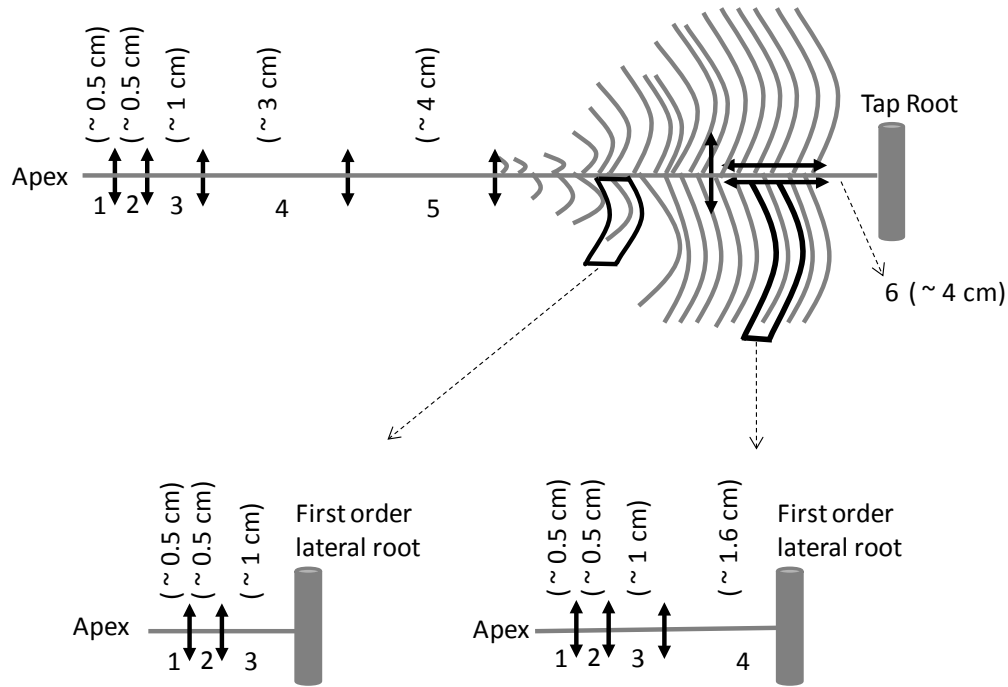


Figure 17. Schematic representation of root segment sampling for mapping ^{109}Cd influx in first and second order lateral roots of sunflower. *Double arrows* indicate cutting positions. A total of six segments were collected from the first order lateral roots. Segments 1 to 5 were corresponded to the unbranched zone, and segment 6 was a root axis segment in the branched zone close to the tap root. Young and mature second order lateral roots were divided into three and four segments, respectively

Statistical analysis

The root absorbing power was compared between hydroponics ($n = 4$) and sand cultures ($n=4$) and between first and second order lateral roots within a culture device and as a function of the axial position of the root segments. For the different statistical tests, the plants and the roots were considered as random factors in a mixed effect model. Significant differences between two consecutive segments were tested using backward contrasts. We used the statistical software ©R 2.13.1 R Development Core Team (2008) to perform all computations and statistical analyses. Mixed effect models were fitted by using the ‘nlme’ package version 3.1-101 (Pinheiro *et al.* 2012).

Results

Checking the linearity of the root Cd^{2+} influx as a function of Cd concentrations

Figure 18 shows typical Cd^{2+} influx exemplified by segment 2 of the first and second order lateral roots cultivated in hydroponics or in sand, plotted against the Cd concentrations of the exposure solutions. The R^2 of the linear relationships for first and second order lateral roots ranged from 0.19 to 0.67 for hydroponics, and from 0.29 to 0.97 for sand cultures. The low R^2 were due to outliers, which were kept in the analyses as there were no valid reasons to discard them. The residual variability was higher for hydroponics as compared to sand cultures. For all linear regressions, the residuals of the fits did not show any departure from the linear model (data not shown). Thus, the Cd^{2+} influx was further modelled by a linear relationship of the Cd concentration, with the root absorbing power (RP) being the slope (Eq 9).

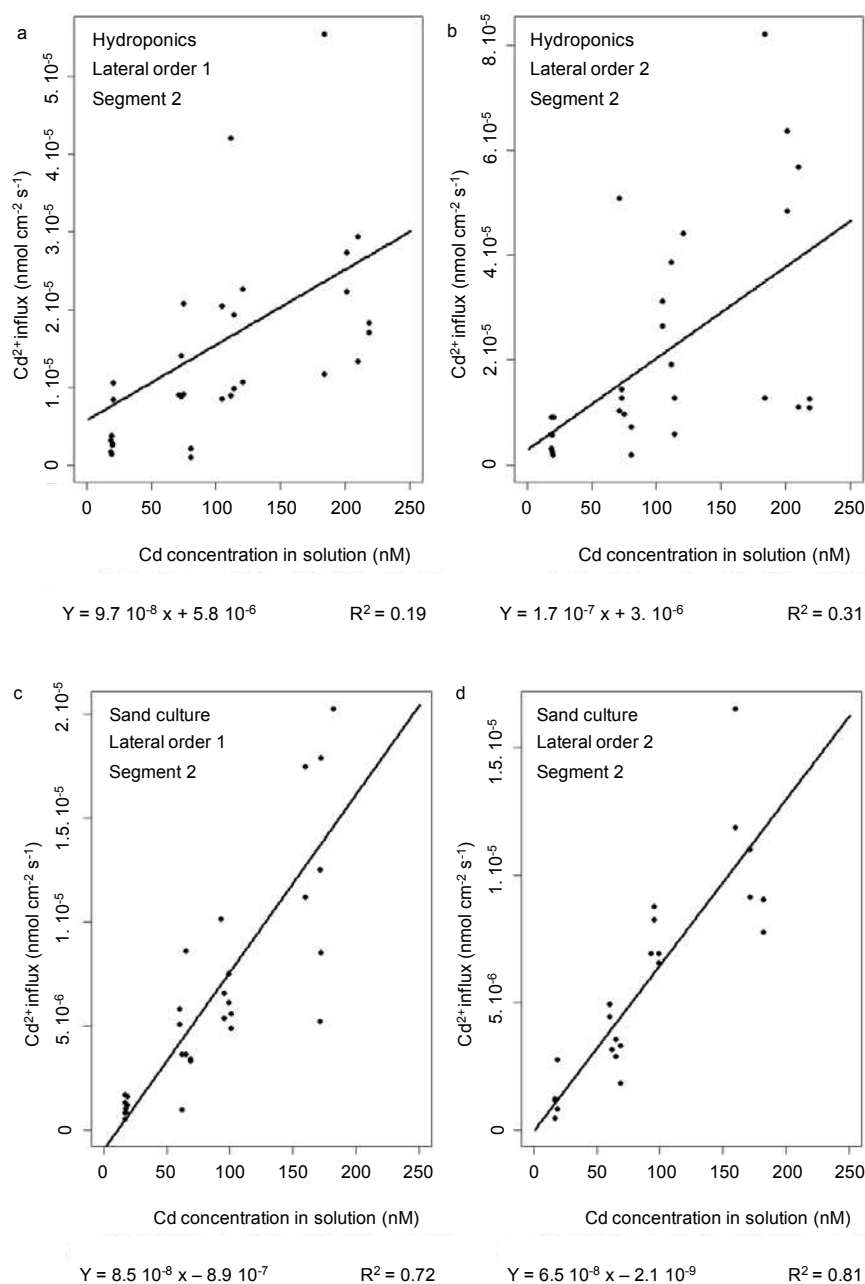


Figure 18. Influx of Cd²⁺ (nmol cm⁻² s⁻¹) in segment n°2 behind the root tip of the first and second order lateral roots of sunflower grown in hydroponics (a and b) or in sand (c and d) as function of Cd concentrations in the solution of exposure. *Lines, equations and R²* are for the linear regressions between the Cd²⁺ influx and the Cd concentrations.

Longitudinal variation of Cd^{2+} influx for first and second order lateral roots in hydroponics and sand cultures

Whatever the growth substrate (nutrient solution or sand), the root absorbing power for Cd^{2+} (RP) in first order lateral roots decreased significantly with the distance from the apex (Figure 19). For first order lateral roots, the average max/min ratios of RP were similar in hydroponics and in sand, 3.8 and 3.6 respectively. For young second order lateral roots, the shape of the RP profile in hydroponics was totally different from that observed for sand cultures (Figure 19). In hydroponics, the RP peaked at 0.5-1 cm from the apex while in sand the RP always decreased starting from the root apex. Regarding the mature second order lateral roots, the RP decreased exponentially by a factor of ~ 2.2 for both the hydroponics and the sand cultures (Figure 19). In hydroponics, the RP of mature second order lateral roots were clearly lower than that of first order lateral roots, which was less marked for sand cultures.

Effect of the growth substrate on the longitudinal variation of Cd^{2+} influx for first and second order lateral roots

The culture substrate significantly influenced the RP whatever the type of roots, with in average, RP in sand always lower than in hydroponics (Figure 19, Table 5). The differences in RP between the two substrates were less strong for the apical segment (segment 1) than for the two consecutive segments (segment 2 and segment 3) for first order lateral roots and young second order lateral roots. Moreover, for the first order lateral roots and for the segments further from the apex (segment 4 to 6), the differences in RP between the two substrates became less marked (but still significant). In total, this results in a change in the shape of the RP profile in sand with a steeper decrease from the apex (Figure 19). Hence, while in hydroponics the RP were stable around $1.6 \cdot 10^{-7} \text{ L cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ along the first 2 cm from the apex (the first three root segments) and further decreased to $4.3 \cdot 10^{-8} \text{ L cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ toward the root base, in sand, the decrease in RP was exponential starting from the root tip, from $1.0 \cdot 10^{-7}$ to $2.8 \cdot 10^{-8} \text{ L cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

For, the mature second order lateral roots, the differences in RP between sand and hydroponics slightly decreased (Table 5). Finally, the coefficient of variation of the RP due to the between roots variability (the random effect of the mixed effect model) was generally high for both the first and second order lateral roots regardless of the growth substrate (Figure 19).

Covariables influencing the longitudinal variations in Cd^{2+} influx for first and second order lateral roots

For first order lateral roots, the root absorbing power was independent of the length of the unbranched zone in sand (Table 6) while in hydroponics, the RP of the third segment located around 2 cm behind the apex was positively correlated with the length of the unbranched zone. For second order lateral roots, in sand, the RP was not depending on the root age but in hydroponics, the RP was greater at the middle of the young root (segment 3, Figure 17) as compared to mature individuals. So, the effect of the age on the RP was only evidenced for hydroponics.

In sand, second order lateral roots had RP a little lower than that of first order lateral roots in segments located behind the root tip (segments 2 and 3), whatever their age (Table 6). In hydroponics, only mature second order lateral roots had lower RP than first order lateral roots and for more distal segments (segments 3 and 4).

It is noteworthy that the apical segment (segment 1) was not impacted by the length of the unbranched zone, nor by the root age and order.

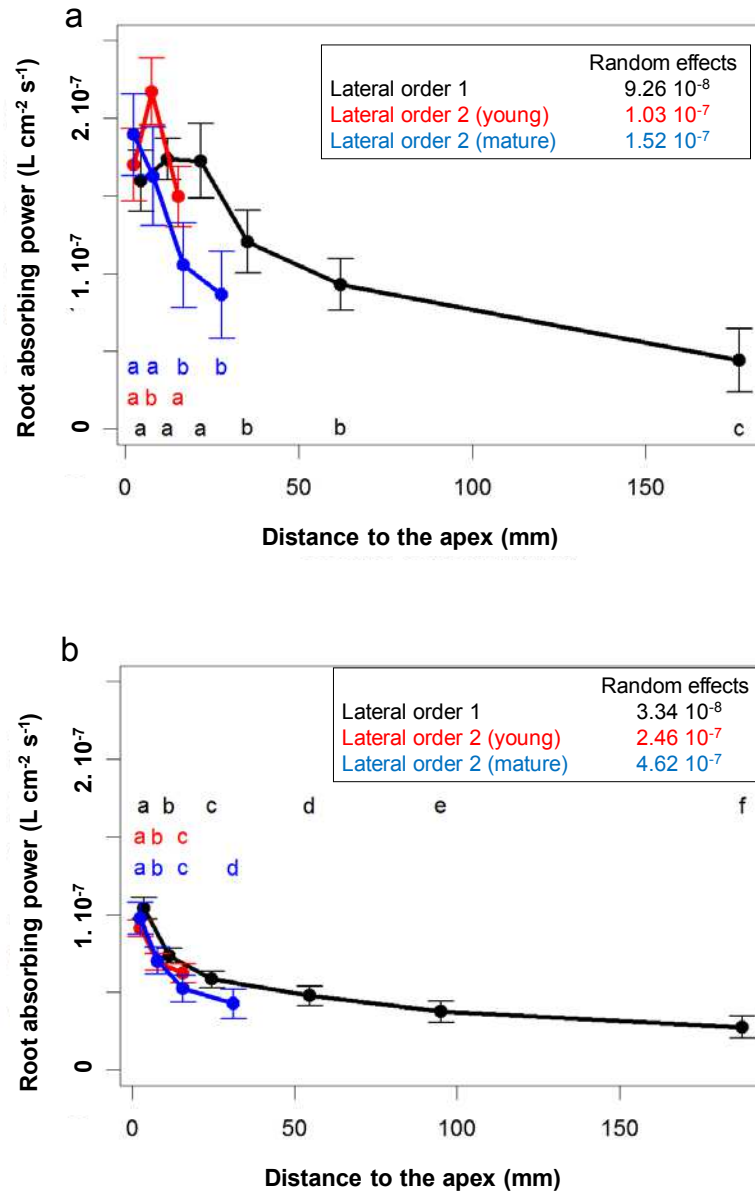


Figure 19. Axial profile of the root absorbing power (RP, $\text{L cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) for Cd^{2+} uptake in first and second order lateral roots of sunflower grown in hydroponics (a) or in sand (b). The root absorbing power RP is given by the model : $I = \text{RP } C_{\text{Cd}}$, where I is the influx of Cd^{2+} ($\text{nmol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) and C_{Cd} is the Cd concentration in the solution (nmol L^{-1}). *Points and lines* are the mean estimates, and the *vertical bars* are their standard errors. In boxes are presented the mean of the between roots variance (random effects) of all root segments for first and second order lateral roots, estimated from the mixed effect model ($n = 32$). *Letters* indicate significant differences between two neighboring segments at $p < 0.05$. *Black* is for first order lateral roots. *Red* is for young second order lateral roots. *Blue* is for mature second order lateral roots.

Table 5. Comparison of the root absorbing power of sunflower roots for Cd between sand and hydroponics cultures for the six root segments (Seg1 to Seg6) sampled starting from the root apex (seg1). *Numbers* are the differences between root absorbing power means for sand and hydroponics cultures, by root segment ($\times 10^{-8}$ L cm⁻² s⁻¹). *Stars* indicate the significance of the differences between sand and hydroponics cultures by root segment from the anova Fisher test: ns non significant, * p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001

		Seg1	Seg2	Seg3	Seg4	Seg5	Seg6
Differences in RP between sand and hydroponics	Lateral1	- 4.12 *	- 6.56 *	- 7.72 *	- 6.05 *	- 5.43 **	- 1.82 *
	Young lateral2	-5.47 *	-9.9 *	-7.93 **	-	-	-
	Mature lateral2	-6.66 *	-5.25 *	-4.13 **	-4.12 **	-	-

- : not applicable

Table 6. Effect of some covariables on the root absorbing power of sunflower roots for Cd for sand (S) and hydroponics (H) cultures and for the six root segments (Seg1 to Seg6) sampled starting from the root apex (seg1). *Stars* indicate the significance of the differences by root segment from the anova Fisher test : ns non significant, * p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001

		Seg1	Seg2	Seg3	Seg4	Seg5	Seg6
Slope of the relationship between RP and the length of the unbranched zone of lateral1 (seg1 to seg5)	H	ns	ns	1.07 *	ns	ns	ns
	S	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Difference in lateral2 RP, between young and mature	H	ns	ns	4.5 10 ⁻⁸ *	-	-	-
	S	ns	ns	ns	-	-	-
Difference in RP between young lateral2 and lateral1	H	ns	ns	ns	-	-	-
	S	ns	-2.0 10 ⁻⁸ **	ns	-	-	-
Difference in RP between mature lateral2 and lateral1	H	ns	ns	-4.4 10 ⁻⁸ *	-5.1 10 ⁻⁸ **	-	-
	S	ns	-2.0 10 ⁻⁸ *	-1.9 10 ⁻⁸ **	ns	-	-

- : not applicable

Discussion

Longitudinal variations of the Cd^{2+} influx in first and second order lateral roots of sunflower

Our results confirmed that for low Cd^{2+} concentrations, consistent with those found in agricultural soil solutions, in sunflower, the root influx of the free ion is proportional to its concentration in the solution (Figure 18, Eq. 9) (Laporte et al. 2013) with the slope being the so-called root absorbing power (RP) for Cd^{2+} (Nye 1973). Furthermore, the observations also confirmed for first order lateral roots, the longitudinal decrease of the RP starting from the apex as well as the mean value of the RP previously reported, *i.e.* around $1.6 \cdot 10^{-7} \text{ L cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ at the root tip and $5 \cdot 10^{-8} \text{ L cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ at the root basis (Laporte et al. 2013). In the present work, we showed that the longitudinal variation in RP for Cd^{2+} also stands for second order lateral roots, which is new and was never evidenced to our knowledge. There are at least two hypotheses reported in the literature to explain the longitudinal variations in Cd^{2+} influx along root axis. They have been detailed in the introduction and in Laporte *et al.* (2013) and are just reminded here: i) the stronger sugar concentration and metabolic activity at the root tip (Freixes et al. 2002; Jones 1998), which could stimulate the activity of the energy driven Cd^{2+} transporters, and ii) the acropetal maturation of apoplastic barriers, *i.e.* Casparian band and suberin lamellae of the endodermis and exodermis, which restrict the apoplastic route of Cd^{2+} uptake (Lux et al. 2011; Lux et al. 2004; Redjala et al. 2011). Because the longitudinal variations in RP can potentially significantly impact the total Cd^{2+} uptake depending on root architecture (Laporte *et al.*, 2013), we thereafter examined three hypotheses about the possible relationships between the longitudinal variations in RP on one hand and the root growth and environment on the other hand.

Hypothesis 1: the longitudinal variation of Cd^{2+} influx in sunflower roots is expected to depend on the growth substrate with lower influx and steeper decrease with the distance from the apex in sand cultures as compared to hydroponics

As expected, the culture medium had a strong effect on the RP and on its longitudinal profile (Figure 19, Table 5). Compared to hydroponics, sand culture conditions shifted toward the apex the location where the RP decreased steeply and additionally reduced its longitudinal

extension. This kind of observation has already been reported and is attributed to the accelerated maturation of apoplastic barriers as a mean to limit water loss in environments where water is relatively more limiting like in sand versus hydroponics (reviewed in Enstone *et al.*, 2002). For example, Redjala *et al.* (2011) found that in maize, the first barriers started to develop at ~0.8 cm from the apex in aeroponics, ~0.6 cm in soil as compared to ~2.8 cm in hydroponics (estimates calculated from the original article). In parallel, these authors found that the Cd^{2+} uptake was 1.7 higher in hydroponics than in aeroponics, with significantly more Cd in the root apoplast of roots grown in hydroponics. In our work, we also found that RP were higher in hydroponics than in sand culture in first order lateral roots, in average ~2.7 times (Figure 19). On the other hand, we found that the decrease in RP started between 1 and 2 cm from the apex (segment 3) in nutrient solution and between the apex and 0.5 cm in sand (segment 1, Figure 19) making these results consistent with the above-mentioned observations in maize. Hence, it can be hypothesized that the zone where RP was the most sensitive to the effect of the growth substrate was that where apoplastic barriers differentiated, *i.e* mainly segments 2 to 5.

As compared to hydroponics, sand did not result in important changes in the RP at the root base of first order lateral roots suggesting that when they are matured (at the root base), the apoplastic barriers are similar between the two growth substrates with probably little additional suberization in sand. Hence, because the RP started to decrease closer to the root tip in sand as compared to hydroponics, the overall mean RP was lower in the former situation than in the latter. Consequently, mean RP estimates for the whole root system commonly determined from nutrient solution experiments are likely to be overestimated as compared to sand and possibly soil conditions.

Hypothesis 2: Fast-growing and young roots should have relatively higher Cd^{2+} influx

We were not able to follow the individual growth rates nor the age of roots that were used to determine Cd^{2+} influx because of the technical difficulties to do so. We assumed that fast growing first order lateral roots were characterized by relatively long apical unbranched zone (segments 1 to 5) because the differentiation and emergence of second order lateral roots is

mainly related to thermal time and not to the elongation rate of the parent axis (Pagès *et al.*, 2012). Because the elongation rate declines with root age (Pellerin and Pages 1994), long unbranched zones also correspond to young roots and conversely. Hence, long apical unbranched zones were expected to have higher RP especially at the root tip, in relation to their higher growth rate and metabolic activity. Similarly, because the differentiation of apoplastic barriers is acropetal (less mature toward the root tip) and also mainly function of thermal time, the faster the root elongation rate, the further from the root tip the mature apoplastic barriers (Perumalla et al. 1990) and the expected decrease in RP.

In hydroponics, for first order lateral roots, it was indeed observed a positive correlation between RP of segment 3 and the length of the unbranched zone (Table 6, Figure 19). Segment 3 extending from 1 to 2 cm after the apex was likely to correspond to the zone where RP started to decrease in relation with the beginning of the apoplastic barriers differentiation (see discussion of *Hypothesis 1*). Segment 3 being always sampled at the same position from the root tip, its age and consequently the degree of maturity of the apoplastic barriers were strongly influenced by the elongation rates (Table 6), which may be an explanation why RP of segment 3 correlated to the length of the unbranched zone. The barriers in segments further from the root tip were likely much more matured and consequently less affected by the growth rate while apical segments may not have barriers yet possibly explaining why their RP were not affected by the length of the unbranched zone (Table 6). Hence, the age of a root segment in first order lateral roots impacted its ability to absorb Cd^{2+} . The same reasoning held for second order lateral roots: segments 2 and 3 were younger in young roots than in mature ones and therefore had higher RP (Figure 19 a).

In contrast, segment at the root tip had roughly the same age and probably no differentiated apoplastic barriers whatever the root type and consequently had a constant RP, unrelated to the length of the apical unbranched zone nor to the age of the roots (second order lateral roots) (Table 6). This suggests that the possible variations in the metabolic activity between roots with different growth rates or of different order were less important in controlling the RP than the age that determined the degree of maturation of the barriers. Hence, the longitudinal variations in the influx of Cd^{2+} is unlikely to be explained by the longitudinal profile of sugar concentration (Jones 1998) that fuels transporters required for

absorbing Cd^{2+} (Cataldo et al. 1983; Costa and Morel 1993; He et al. 2009; Tarradellas et al. 1997).

In sand, hypothesis 2 was not valid as no changes in RP were noticed in relation with the age of the roots or with the length of the unbranched zone. This was interpreted by the accelerated differentiation of apoplastic barriers in sand compared to hydroponics (see discussion of hypothesis 1).

Hypothesis 3: Second order lateral roots have lower Cd^{2+} influx than first order lateral roots

Whatever the age of the second order lateral roots, no differences in RP with the first order lateral roots were noticed for the apical segment (segment 1) (Figure 19, Table 6), although second order lateral roots are supposed to elongate less rapidly than the parent axis (Aguirrezabal 1993). This is an additional indication supporting that here the metabolic activity of the root segment was probably little responsible of the profile of the Cd^{2+} influx (see discussion of *hypothesis 2*). For distal segments, mature second order lateral roots had lower RP than first order lateral roots (Table 6, Figure 19 a). Again, this was interpreted by the age of the segment that was likely to determine the degree of differentiation of apoplastic barriers. Considering the lower elongation rates of second order lateral roots, their segments 2, 3 and 4 were much older than their respective in first order roots and therefore have lower Cd^{2+} influx. The RP profile of second order laterals is below that of first order laterals likely because at a given position, the age of the root segment is greater for second order roots and the barriers more matured. Consistently, segment 1, which had the same age had also the same RP whatever the root order. These lower RP of second order lateral roots were not accounted for when the uptake of Cd^{2+} by first order lateral roots with secondary branchings was numerically simulated (Laporte *et al.*, 2013) and indeed, the calculated uptake overestimated the experimental observations in hydroponics.

In sand cultures, because the RP decreased much more rapidly starting from the root tip, the differences in RP between the first and second order roots were strongly attenuated and in the end, very weak although significant. Because sand culture is more similar to soil conditions than hydroponics, our results suggest it would not be necessary to account for

differences in the profile of the root absorbing power between first and second order laterals when modelling the Cd^{2+} uptake from soil by a root system of sunflower with a root architecture. This does not mean that first and second order laterals have the same mean RP. Indeed, because second order laterals are shorter than first order laterals, the average RP for the whole root length is slightly greater for second order laterals than for first order ones (Figure 19). Thus, theoretically, the mean capacity of a root system to take up Cd^{2+} should increase with the number of secondary lateral roots. Whether variations in sunflower root systems architecture could be sufficient to make this effect significant remains to be determined.

Finally, it should also be considered that the between roots variability for the RP of a given root segment was important, in the same order of magnitude than the longitudinal variation of the Cd influx (Figure 19). The variability in the age of the first order lateral root that were chosen is a very probable explanation. Because the root segments were sampled at the same location from the root apex, the degree of differentiation of their apoplastic barrier is strongly linked to the age of the roots. However, the RP of segment 1, which was assumed to have little apoplastic barriers were also highly variable between plants suggesting the Cd influx might also be controlled by genetic differences between individual plants (transporter more or less expressed).

Conclusions

Our work confirmed the longitudinal variation of Cd^{2+} influx in sunflower first order lateral roots and demonstrated that this variation also exists in the second order roots, *i.e.* stronger influx at the root tip. The results suggested that the shape of the RP is likely to be related to the profile of apoplastic barrier maturation: strong RP in fast elongating and young root segments and lower RP in sand versus hydroponics.

In sand, which is likely to be more realistic of soil conditions than hydroponics, there were no strong evidence that the longitudinal profile of the RP differed between first and second

order laterals. However, for the whole root length, because second order laterals are shorter than the first order laterals, they have slightly higher mean influx. All these variations and differences in Cd^{2+} influx were exacerbated in hydroponics. Hence, whether a root system with more second order laterals, *i.e.* lower average root length, absorbs more Cd need to be tested for soil conditions.

Acknowledgements

This work was supported by the funding ANR 2011 CESA 008 01 and by a research grant from the Technical Center for Oilseed Crops and Industrial Hemp (CETIOM) and from the French National Institute for Agricultural Research (INRA). The authors are grateful to S. Bussière, C. Coriou, and S. Thunot for their helpful technical contribution.

CHAPITRE 4.
EXISTE-T-IL UNE VARIABILITE D'ACCUMULATION
DU Cd ENTRE CULTIVARS DE TOURNESOL ET
PEUT-ELLE ETRE ATTRIBUEE A DES DIFFERENCES
D'ARCHITECTURE RACINAIRE?

Chapitre 4. Existe-t-il une variabilité d'accumulation du Cd entre cultivars de tournesol et peut-elle être attribuée à des différences d'architecture racinaire?

Comme cela a été montré au Chapitre 3, la variation longitudinale d'influx du Cd^{2+} existe également chez les racines latérales d'ordre 2. Etant plus courte que les racines d'ordre 1, elles ont un influx moyen pour l'ensemble de la racine plus élevé par rapport aux racines d'ordre 1 ce qui pourrait impacter le prélèvement total de Cd par la plante suivant l'architecture racinaire dont les variations peuvent provenir de différences entre cultivars. Cette hypothèse a été testée dans cette dernière partie.

Nous avons examiné si différents cultivars de tournesol présentaient une variabilité de prélèvement du Cd et d'accumulation dans les parties aériennes. Nous avons cherché à savoir si cette éventuelle variabilité pouvait être reliée à une variabilité d'architecture racinaire. Les principaux résultats obtenus sont les suivants :

- Il existe bien une variabilité entre 14 cultivars de tournesol pour le prélèvement de Cd en hydroponie et pour la teneur dans les parties aériennes avec un facteur de variation voisin de 2.2
- Les différences d'absorption du Cd ne sont pas liées au nombre de racines, leur cause reste à comprendre
- Les différences de concentrations en Cd dans les parties aériennes sont liées à des différences de séquestration du Cd dans les racines

Ce travail fait l'objet d'un manuscrit à soumettre dans une revue en cours de sélection

Variability in Cd and Zn shoot concentration in 14 cultivars of sunflower (*Helianthus annuus* L.) as related to metal uptake and partitioning

Marie A. Laporte^{1,2}, Thibault Sterckeman³, Sylvie Dauguet⁴, Laurence Denaix^{1,2}, Christophe Nguyen^{1,2}.

¹ INRA, UMR1220 TCEM, 71 avenue Edouard Bourlaux CS 20032, F-33883 Villenave d'Ornon, France.

² Univ. Bordeaux, UMR1220 TCEM, Bordeaux Sciences Agro, F-33883 Villenave d'Ornon, France.

³ Université de Lorraine - INRA, Laboratoire Sols et Environnement, 2 avenue de la Forêt de Haye B.P. 172, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy cedex, France.

⁴ CETIOM, 11 rue Monge, Parc Industriel, 33600 PESSAC, France.

Corresponding author: INRA, UMR1220 TCEM, 71 avenue Edouard Bourlaux CS 20032, F-33883 Villenave d'Ornon, France. Christophe.Nguyen@bordeaux.inra.fr, tel : +33 557122507, fax : +33 557122515

Abstract

Aims- Cadmium (Cd) is a very toxic metal in soils, contaminating agricultural crops due to its absorption by roots. Among crops, sunflower (*Helianthus annuus* L.) accumulates relatively high amounts of Cd. This work examined the link between the variability in Cd and Zn in shoots of sunflower cultivars and the shoot growth, the metal uptake and partitioning aboveground. Particularly, we tested the hypothesis of a correlation between the root architecture and the metal uptake.

Methods- Fourteen cultivars of sunflower were cultivated in nutrient solution at 20 nM of $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ and 760 nM ZnSO_4 . The between-cultivar variability for the total Cd and Zn content in root and shoot biomass was determined at the 6-8 leaves stage and possible correlations with the biomass and root architecture were investigated.

Results- Cd and Zn concentrations in shoots differed between cultivars by a factor 2.3 and 2.2, respectively. Metal uptake was better positively correlated to shoot biomass than to root biomass and not to root architecture. The between cultivar differences for the metal concentration in shoots was explained by differences in uptake relatively to shoot growth and for Cd, by the partitioning of the metal between root and shoot.

Conclusions- This study provides two traits for guiding cultivar selection for field trials in the purpose of crop quality or of phytoextraction.

Keywords: Between cultivar variability, cadmium, partitioning, root architecture, sunflower, zinc

Introduction

Cadmium (Cd) is a metal that is extremely toxic for biological organisms, including human. It can accumulate in cultivated soils due to industrial pollutions or agricultural inputs, particularly Cd-contaminated phosphorus fertilizers. Exposure of human to Cd from food is an important issue and recently, the European Food Safety Authority (EFSA) has revised downward the weekly intake recommendation to $2.5 \mu\text{g Cd kg}^{-1}$ of body weight (b.w.) (EFSA, 2011). The new recommendation is nearly three times lower than the previous guidance value of $7 \mu\text{g Cd kg}^{-1}$ b.w established by the Food and Agriculture Organisation/World Health Organisation (FAO/WHO, 1972).

The Cd issue is of special importance in sunflower (*Helianthus annuus* L.) cropping for several reasons. On one hand, this species accumulates generally more Cd than other crops such as bread wheat or maize (Broadley *et al.*, 2001; Grant *et al.*, 2008). Consequently, the concentration of Cd in sunflower oil cakes used for feed can reach levels close to the regulation limit (Dauguet and Lacoste 2013). This is a significant concern in France as sunflower is an important crop for oil production with subsequent amounts of oil cakes used for animal feed. On the other hand, sunflower is also a good candidate for phytoextraction of Cd from polluted soils because it combines biomass production with a quite high accumulation of Cd for a non-hyperaccumulating species (Faessler *et al.*, 2010; Niu *et al.*, 2007; Vangronsveld *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2011).

Apart from the between-species genetic variability in Cd accumulation, it is now well established that accumulation can also differ between cultivars of a particular species (Grant *et al.*, 2008; Sugiyama *et al.*, 2011). For example, among cultivars cultivated at the same Cd exposure, the max:min ratio reported in the literature for Cd concentrations in the whole plant of wheat was 1.6 and ranged from 1.5 to 4.3 and from 2 to 2.3 in maize and soybean shoots respectively (Arao *et al.*, 2003; Farrell *et al.*, 2005; Florijn *et al.*, 1993; Sugiyama *et al.*, 2007). In sunflower, differences between cultivars for the Cd concentrations in roots, shoots, and seed oils have also already been reported with variation factors of 2, 1.3, and 3.6 respectively (Ansari *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2008).

Cd accumulation in plant biomass predominantly results from Cd^{2+} absorption by roots from the soil solution. The amount of Cd in a particular aboveground plant part also depends

on the exportation of the metal from the root system and on the further allocation to the aboveground organs. All these steps can potentially demonstrate between-cultivar variability. Indeed, the size and the architecture of the root system can fluctuate between cultivars, resulting in differences in Cd^{2+} uptake. In particular, some longitudinal variations in Cd^{2+} influx along individual roots have been reported in durum wheat and in sunflower, showing greater influx at the root tip (Farrell *et al.*, 2005; Laporte *et al.*, 2013). If this longitudinal variation in Cd^{2+} influx is a major factor controlling the metal uptake by the whole root system, then the total amount of Cd^{2+} taken up is expected to be positively correlated to the number of roots per total root length unit, *i.e.* the root branching index. Indeed, a root system with a high root branching index has relatively short roots and thus potentially greater Cd^{2+} influx as observed by Berkelaar and Hale (2000). Furthermore, the rate of Cd translocation aboveground was also found to be of crucial importance in determining the genetic differences in Cd accumulation in the edible plant part of different crops including durum wheat and rice grain (Chan and Hale, 2004; Harris and Taylor, 2004; Mori *et al.*, 2009; Uraguchi *et al.*, 2009). The HMA family proteins (Heavy Metal ATPase) involved in the xylem loading of heavy metals is assumed to play a key role in controlling Cd translocation aboveground (Rascio and Navari-Izzo, 2011) in addition to potential variability in detoxification mechanisms including sequestration in root vacuoles for example (Clemens *et al.*, 2002). On the other hand, in plant tissues, Cd and Zn can share the same transporters, including the ZIP proteins mediating the internalisation of these two metals into the root symplasm and the above-mentioned HMA proteins involved in the translocation to shoots (Clemens, 2001). Therefore, examining both Zn and Cd accumulation and partitioning is relevant as these two elements could interact.

This study had two objectives: i) to examine the between-cultivar variability in Cd and Zn accumulation aboveground in sunflower for Cd concentrations relevant to those found in agricultural soils, ii) to understand if the variability originates in differences for the uptake and/or for the translocation aboveground. One important hypothesis examined here was that the root system architecture could impact the total uptake of Cd^{2+} as explained previously.

Materials and methods

Design of the experiment

In order to investigate the intra-specific variability in Cd and Zn accumulation in sunflower (*Helianthus annuus* L.), 14 cultivars commonly cultivated in France were grown in greenhouse, in hydroponics with three replicates per cultivar. The cultivars were contrasted for their height, maturity precocity and seed size (Table 7). The experiment was repeated once at one-week interval.

Table 7. Characteristics of the fourteen cultivars of sunflower used in the study

Cultivars	Coding	Precocity	Seed size	Plant height
CULTIVAR 1	VAR 1	mid-late	medium	medium
CULTIVAR 2	VAR 2	late	medium	medium
CULTIVAR 3	VAR 3	mid-early	medium	short
CULTIVAR 4	VAR 4	mid-early	medium	tall
CULTIVAR 5	VAR 5	mid-early	medium	haute
CULTIVAR 6	VAR 6	early	medium	medium
CULTIVAR 7	VAR 7	mid-late	big	tall
CULTIVAR 8	VAR 8	early	big	medium
CULTIVAR 9	VAR 9	mid-late	medium	tall
CULTIVAR 10	VAR 10	mid-early	medium	tall
CULTIVAR 11	VAR 11	mid-early	medium	small
CULTIVAR 12	VAR 12	mid-late	medium	tall
CULTIVAR 13	VAR 13	mid-late	small	medium
CULTIVAR 14	VAR 14	mid-early	small	tall

Plant cultivation

Seeds were washed with deionised water and germinated in the dark at 26°C for 5 days in a sterilised glass jars containing a gel made of ¼ strength Hoagland nutrient solution (Hoagland and Arnon, 1950) with 0.3% w/w agar. The glass jars were then transferred to the greenhouse and left until the cotyledons were fully expanded (48 h). Thereafter, the seedlings were transplanted in 3 L plastic containers filled with 2.5 L of ¼ strength (for macronutrients) Hoagland nutrient solution with 20 nM Cd(NO₃)₂ and 760 nM ZnSO₄, at pH 6.5. The Cd²⁺ and Zn²⁺ activity were estimated at 97% and 97.4% of the total Cd and Zn, respectively (speciation modelling with Visual MINTEQ 3.0). The seedlings were gently maintained by a piece of synthetic foam inserted at the centre of a plastic cover that maintained the nutrient solution in the dark. The cover also included two inlets, one for bubbling of the solution and one to supply fresh solution at the following turnover rates: 8% day⁻¹ for the first week of cultivation, 25 % day⁻¹ until day 12 and 75% day⁻¹ until sampling. These rates were adjusted to maintain the solution pH, electric conductivity and dissolved oxygen stable, which was successfully achieved as indicated by monitoring these parameters for one plant per cultivar, once a week, by using a portable device (WTW Multi 3430 Multiparameter). The fresh solution was supplied by a tube dipping right to the bottom of the recipient while the excess of the solution overflowed by a drain ~2 cm below the cover. The air temperature was maintained within the range of 9 - 35°C. Plant sampling was performed when plants had 6 to 8 fully expanded leaves (21 days or 300 growing degree days, 6° basis).

Plants sampling and analyses

The intact root systems were first bathed for 1 min in a rinsing solution (5 mM MES and 0.1 mM Ca(NO₃)₂) at 2°C. Then, they were placed into two successive desorption baths (5 mM MES and 5 mM Ca(NO₃)₂) at 2°C for 5 min each, in order to eliminate the Cd sorbed onto the root apoplast (Buckley *et al.*, 2010). Then, the plants were divided into three parts: shoots including the leaves and the stem, the taproot and the lateral roots. Shoots were washed by two successive baths of ultrapure water. The taproot and a representative subsample of lateral roots (*i.e.* 20% of total dry matter) were scanned by using a double light scanner to avoid shadows (EPSON EXPRESSION 10000XL). The images were analysed with Winrhizo

software (Winrhizo pro V.2005a) to determine the root length, the average diameter and the number of apices for six intact first order laterals, allowing in this way to estimate the number of laterals by root length unit (the root branching index). The total root length, root surface area, and number of laterals for the whole root system were estimated from the subsamples on a dry mass basis.

All plant samples were freeze-dried and weighed. Only shoots were milled before wet digestion (Retsch PM 400). The whole roots and the taproot were pooled and digested. Cadmium and Zn concentrations in plant samples were determined by atomic absorption spectrometry (AAS) after wet digestion in nitric acid solution and hydrogen peroxide mixture. The total Cd and Zn accumulated in the plant biomass (μg Cd or Zn) were calculated as the amount of metal recovered in both shoots and roots. The partitioning coefficients of Cd and Zn to shoots were calculated as the ratio between the metals in shoots and the total plant metals (unitless).

Statistical analyses

We used a linear mixed effect model to study the effects of the block and of the cultivar (both random effects) on the dependent variables including the growth and root architecture variables, and on the Cd and Zn accumulation variables (concentration and amount of metals in plant compartments and partitioning coefficient of the metals from roots to shoots). Data were processed by using the statistical software ©R 2.13.1 (R Development Core Team, 2008). The mixed effect models were fitted by using the 'lme4' package version 0.999999-2. A principal component analysis (PCA) was used to study groups of correlations between the variables (R package FactoMineR, version 1.25). Analysis of covariance (ANCOVA) was used to test the effect of the cultivar on some linear relationships evidenced by the PCA.

Results

Variability in growth and Cd accumulation between 14 sunflower cultivars

The cultivar mean and associated confidence interval for the variables related to plant growth, root architecture and Cd+Zn accumulation are presented in Tables 8 and 9 while Figure 20 shows the partitioning of the variance following the cultivar, block and interaction * block effects.

Although shoot and root biomass were variable, no significant effect of the cultivar was evidenced, only a block effect was significant. It is noteworthy that the root:shoot biomass ratio was very stable. The root architecture was mainly governed by the cultivar effects, especially for the total root length, and the total root number. It has to be noticed that the root branching index showed no variations between cultivars and also between the two blocks. On the whole, there was no significant cultivar*block interaction for all variables, indicating these two effects were additive.

The variability in the Cd and Zn shoot concentrations was strongly governed by the cultivar effect and less by the block effect, particularly for Cd. The max:min ratio among cultivars was similar for Cd and Zn, *i.e.* 2.3 and 2.2, respectively (Figure 20 and Table 9). The cultivars classification according to Cd concentration in shoots was not similar to that based on Zn concentrations, except for *Cultivar 2*, which showed both the highest Cd and Zn accumulation in shoots. *Cultivar 9* and *Cultivar 1* were the cultivars accumulating the less Cd and *Cultivar 6* the cultivar that accumulated the less Zn.

Regarding the total amount of the metals in plants, the strong variability was equally governed by both the cultivar and the block effects. The variability of Cd and Zn partitioning coefficients to shoots mostly depended on cultivar and little on the block. The variability was moderate, not significant for Zn but significant for Cd. At the extremes, *Cultivar 9* translocated significantly less Cd to shoots than *Cultivar 7* (Table 9).

Table 8. Mean and standard deviation *between brackets* for the growth variables of 14 sunflower cultivars. *Letters* are the mean grouping by variable from the HSD Tukey test (p<0.05, n=6). Codes for the cultivars are given in Table 7

Cultivars	Plant biomass			Root system architecture			
	Shoot DM (g)	Root DM (g)	Root:Shoot	Length (cm)	Diameter (mm)	Root number	Root branching index (roots cm ⁻¹)
<i>Var 1</i>	2.44 (0.16) ^a	0.42 (0.03) ^a	0.18 (0.01) ^a	11478 (1154) ^{bc}	0.36 (0.02) ^a	7848 (1262) ^{ab}	0.53 (0.06) ^a
<i>Var 6</i>	2.15 (0.35) ^a	0.43 (0.08) ^a	0.20 (0.01) ^a	8730 (1145) ^{ac}	0.43 (0.03) ^a	6101 (669) ^{ab}	0.52 (0.03) ^a
<i>Var 3</i>	2.04 (0.23) ^a	0.40 (0.04) ^a	0.21 (0.03) ^a	10239 (832) ^{ac}	0.35 (0.01) ^a	6761 (801) ^{ab}	0.50 (0.06) ^a
<i>Var 7</i>	1.93 (0.30) ^a	0.40 (0.07) ^a	0.20 (0.01) ^a	8355 (975) ^{ac}	0.42 (0.04) ^a	6461 (577) ^{ab}	0.59 (0.04) ^a
<i>Var 2</i>	2.06 (0.14) ^a	0.48 (0.03) ^a	0.23 (0.01) ^a	10798 (1661) ^{ac}	0.44 (0.05) ^a	7242 (564) ^{ab}	0.64 (0.06) ^a
<i>Var 8</i>	1.84 (0.11) ^a	0.37 (0.02) ^a	0.20 (0.01) ^a	8956 (602) ^{ac}	0.40 (0.03) ^a	7356 (467) ^{ab}	0.65 (0.04) ^a
<i>Var 9</i>	2.58 (0.28) ^a	0.45 (0.05) ^a	0.18 (0.00) ^a	10712 (564) ^{ac}	0.39 (0.03) ^a	8582 (787) ^{ab}	0.66 (0.06) ^a
<i>Var 11</i>	2.28 (0.26) ^a	0.46 (0.04) ^a	0.23 (0.04) ^a	11365 (848) ^{bc}	0.34 (0.02) ^a	10523 (512) ^a	0.79 (0.08) ^a
<i>Var 10</i>	1.96 (0.26) ^a	0.42 (0.07) ^a	0.24 (0.05) ^a	8142 (1168) ^{ac}	0.44 (0.01) ^a	5526 (260) ^{ab}	0.53 (0.06) ^a
<i>Var 12</i>	1.77 (0.12) ^a	0.35 (0.03) ^a	0.20 (0.01) ^a	6357 (850) ^a	0.49 (0.06) ^a	6085 (1004) ^{ab}	0.69 (0.07) ^a
<i>Var 4</i>	1.82 (0.22) ^a	0.37 (0.06) ^a	0.20 (0.01) ^a	9248 (1046) ^{ac}	0.35 (0.04) ^a	7726 (2376) ^{ab}	0.83 (0.16) ^a
<i>Var 5</i>	2.55 (0.16) ^a	0.46 (0.03) ^a	0.18 (0.01) ^a	12825 (1003) ^c	0.38 (0.04) ^a	10306 (1411) ^{ab}	0.70 (0.11) ^a
<i>Var 13</i>	1.66 (0.34) ^a	0.36 (0.05) ^a	0.23 (0.02) ^a	6952 (1223) ^{ab}	0.46 (0.03) ^a	4962 (634) ^b	0.50 (0.04) ^a
<i>Var 14</i>	1.80 (0.12) ^a	0.40 (0.03) ^a	0.22 (0.01) ^a	12407 (502) ^c	0.33 (0.02) ^a	9628 (622) ^{ab}	0.65 (0.05) ^a

Table 9. Mean and standard deviation *between brackets* for the variables related to Cd and Zn accumulation in 14 sunflower cultivars. *Letters* are the mean grouping by variable from the HSD Tukey test (p<0.05, n=6). Codes for the cultivars are given in Table 7

Cultivars	Cd concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$ DM)		Zn concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$ DM)		Cd total amount (μg)			Zn total amount (μg)		
	Shoot	Root	Shoot	Root	Shoot	Root	% shoot*	Shoot	Root	% shoot*
<i>Var 1</i>	0.28 (0.02) ^c	2.18 (0.20) ^{ab}	42.00 (2.39) ^{cde}	96.50 (1.78) ^a	0.67 (0.05) ^{ab}	1.49 (0.20) ^{ab}	32 (1.30) ^{bc}	101.48 (7.58) ^{ab}	66.19 (5.65) ^a	61 (0.90) ^a
<i>Var 6</i>	0.36 (0.02) ^{cde}	1.46 (0.25) ^{ab}	29.17 (1.05) ^f	50.83 (1.54) ^c	0.78 (0.14) ^{ab}	0.92 (0.19) ^{ab}	47 (2.69) ^{abc}	63.97 (12.14) ^b	32.41 (5.33) ^b	66 (1.37) ^a
<i>Var 3</i>	0.47 (0.03) ^{abcd}	1.92 (0.12) ^{ab}	39.00 (2.19) ^{cdef}	66.50 (4.40) ^{abc}	0.97 (0.14) ^{ab}	1.14 (0.10) ^{ab}	45 (3.44) ^{abc}	80.26 (11.36) ^{ab}	39.86 (4.16) ^{ab}	66 (3.77) ^a
<i>Var 7</i>	0.33 (0.03) ^{cde}	1.08 (0.09) ^b	34.50 (3.30) ^{def}	56.67 (3.26) ^{bc}	0.67 (0.13) ^{ab}	0.64 (0.12) ^b	50 (0.87) ^a	70.09 (15.47) ^{ab}	33.69 (6.37) ^b	66 (1.45) ^a
<i>Var 2</i>	0.63 (0.04) ^a	2.48 (0.29) ^a	65.33 (3.22) ^a	85.83 (4.81) ^{ab}	1.29 (0.11) ^a	1.81 (0.23) ^a	42 (2.10) ^{abc}	135.85 (13.75) ^a	62.58 (3.91) ^{ab}	68 (1.46) ^a
<i>Var 8</i>	0.30 (0.02) ^{de}	2.04 (0.21) ^{ab}	41.83 (1.70) ^{cde}	79.00 (4.49) ^{abc}	0.55 (0.06) ^b	1.13 (0.14) ^{ab}	33 (0.79) ^{abc}	77.68 (7.00) ^{ab}	43.66 (3.35) ^{ab}	64 (1.42) ^a
<i>Var 9</i>	0.28 (0.01) ^e	2.44 (0.36) ^a	46.50 (0.99) ^{cd}	82.33 (10.48) ^{abc}	0.70 (0.07) ^{ab}	1.90 (0.46) ^a	29 (2.32) ^c	120.70 (14.34) ^{ab}	60.33 (7.72) ^{ab}	66 (2.26) ^a
<i>Var 11</i>	0.42 (0.01) ^{bcde}	1.62 (0.16) ^{ab}	49.00 (1.46) ^{bc}	73.17 (5.96) ^{abc}	0.96 (0.13) ^{ab}	1.20 (0.13) ^{ab}	44 (4.66) ^{abc}	113.20 (15.45) ^{ab}	54.50 (5.65) ^{ab}	66 (3.72) ^a
<i>Var 10</i>	0.55 (0.03) ^{ab}	1.97 (0.09) ^{ab}	38.50 (0.72) ^{cdef}	53.33 (6.23) ^{bc}	1.09 (0.17) ^{ab}	1.25 (0.14) ^{ab}	46 (5.51) ^{abc}	75.68 (10.47) ^{ab}	36.86 (8.92) ^{ab}	68 (6.53) ^a
<i>Var 12</i>	0.39 (0.04) ^{bcde}	1.80 (0.30) ^{ab}	44.17 (3.18) ^{cde}	67.83 (5.64) ^{abc}	0.70 (0.10) ^{ab}	1.04 (0.17) ^{ab}	41 (1.99) ^{abc}	79.13 (9.20) ^{ab}	39.77 (3.47) ^{ab}	66 (1.60) ^a
<i>Var 4</i>	0.31 (0.02) ^{cde}	1.68 (0.16) ^{ab}	33.83 (1.47) ^{ef}	80.67 (3.68) ^{abc}	0.55 (0.05) ^b	0.82 (0.09) ^{ab}	40 (0.80) ^{abc}	60.98 (6.13) ^b	39.93 (4.74) ^{ab}	60 (1.49) ^a
<i>Var 5</i>	0.48 (0.03) ^{abc}	1.92 (0.19) ^{ab}	41.83 (3.74) ^{cde}	65.33 (9.63) ^{abc}	1.23 (0.11) ^{ab}	1.38 (0.22) ^{ab}	48 (1.52) ^{ab}	106.42 (10.74) ^{ab}	46.52 (7.65) ^{ab}	70 (2.06) ^a
<i>Var 13</i>	0.55 (0.02) ^{ab}	2.01 (0.22) ^{ab}	45.17 (1.22) ^{cde}	75.50 (7.52) ^{abc}	0.91 (0.18) ^{ab}	1.09 (0.12) ^{ab}	44 (2.94) ^{abc}	74.48 (14.86) ^{ab}	40.56 (3.47) ^{ab}	63 (2.32) ^a
<i>Var 14</i>	0.60 (0.04) ^a	1.93 (0.22) ^{ab}	60.50 (2.51) ^{ab}	97.17 (3.40) ^a	1.07 (0.11) ^{ab}	1.19 (0.21) ^{ab}	49 (2.02) ^{ab}	109.10 (9.37) ^{ab}	58.58 (5.11) ^{ab}	65 (0.54) ^a

* amount of Cd or Zn in shoots in % of total Cd or Zn recovered in (root+shoot) biomass

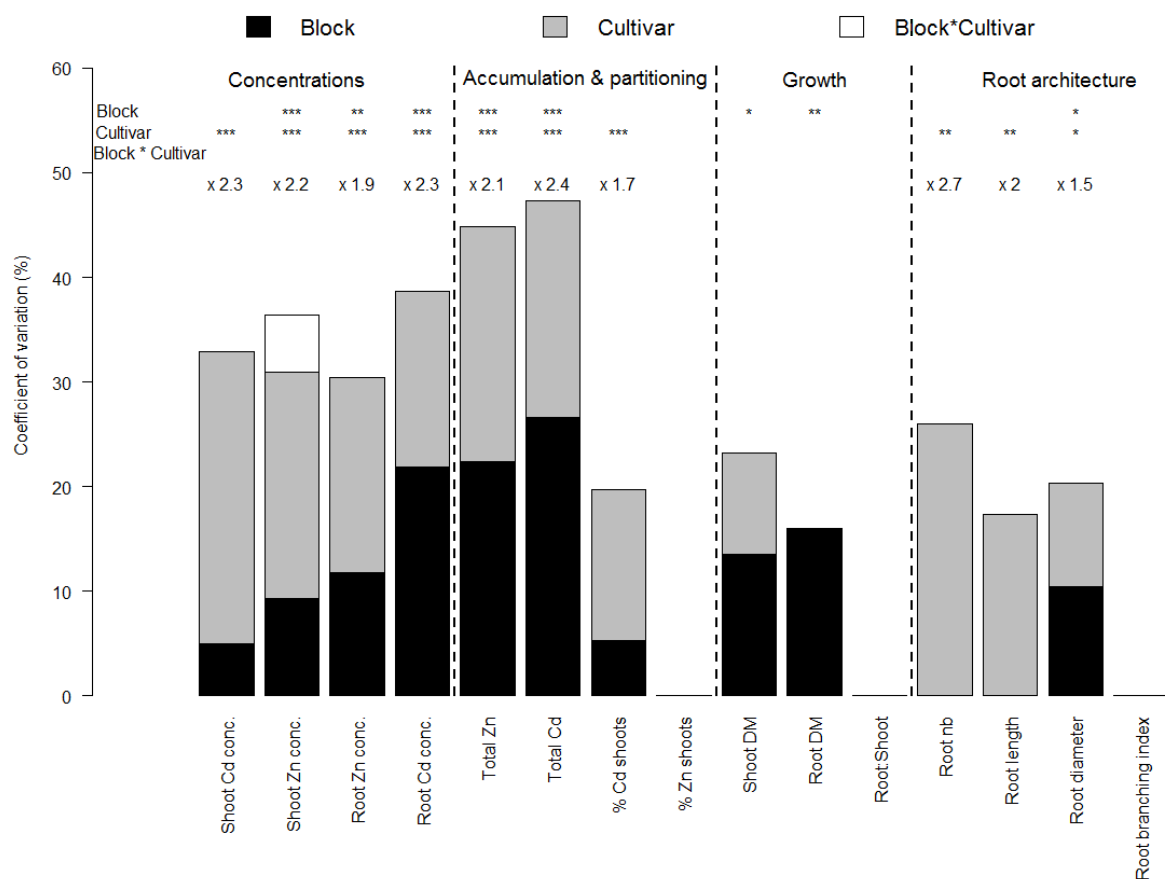


Figure 20. Coefficient of variation of variables related to plant growth and to Cd and Zn accumulation for 14 sunflower cultivars grown in hydroponics at 20 nM Cd and 760 nM Zn. The experiment was repeated once in time (two blocks). A mixed effect model was used to partition the cultivar, block and cultivars*block random effects. The significance of the effects are coded as follows: no code= not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. The factor of variation of each variable (max/min) is indicated above the bars. The variables are the Cd and Zn concentrations in shoots and roots (Shoot Cd Conc., Shoot Zn Conc., Root Cd Conc., Root Zn Conc.), the total amount of Cd and Zn recovered in plant biomass (Total Cd, Total Zn), the % of total Cd and Zn recovered in shoots (%Cd shoots, %Zn shoots), the dry weight of shoots and roots (Shoot DM, Root DM), the root:shoot biomass ratio (Root:Shoot), the total number of laterals (Root nb), the total root length (Root length), the number of laterals per root length unit (Root branching index), and the average root diameter (Root diameter)

Correlations between variables

The variables related to growth and to Cd and Zn accumulation were analysed by a principal component analysis (PCA). Three components summarized 76% of the total variance (Figure 21). The first dimension is associated with both the plant growth and total metal accumulation since the variables with the highest loads were the root and shoot biomass ($\cos^2 = 0.61$ and $\cos^2 = 0.75$, respectively) and the total amount of Cd and Zn accumulated ($\cos^2 = 0.76$ and $\cos^2 = 0.83$, respectively). The total Cd and Zn were more correlated with the shoot biomass ($r = 0.65$ and $r = 0.71$, respectively) than with root biomass ($r = 0.60$ and $r = 0.63$, respectively) or with the root length ($r = 0.37$ and $r = 0.48$, respectively).

The second dimension is fully associated with some root system architecture characteristics: the average root system diameter ($\cos^2 = 0.58$), total number of roots ($\cos^2 = 0.65$) and number of laterals per root length *i.e.* the branching index ($\cos^2 = 0.54$). It can be noticed the more numerous the roots are, the thinner the roots, as shown by the negative correlation between the root diameter and the number of roots.

The third dimension is associated with the partitioning coefficient of Zn to shoots ($\cos^2 = 0.66$) and with the root:shoot ratio ($\cos^2 = 0.53$). The correlation between these two variables derived from few high leverage points and was not significant after they were discarded ($r = 0.62$, $p = 0.09$). The correlation of the root:shoot ratio with the partitioning coefficient of Cd was also not significant ($r = -0.30$, $p = 0.54$).

The shoot Cd and Zn concentrations added as supplementary variables were correlated with the sixth component ($\cos^2 = 0.60$ and $\cos^2 = 0.52$, respectively, not shown), and consequently, were not strongly associated with any previous explanatory variables since the highest load was for the total Cd in plant ($\cos^2 = 0.12$) and the shoot biomass ($\cos^2 = 0.13$). The plant height, seed size and precocity classification (Table 7) added as supplementary variables were not strongly correlated with the sixth component ($\cos^2 < 0.3$) and so with shoot Cd or Zn concentrations.

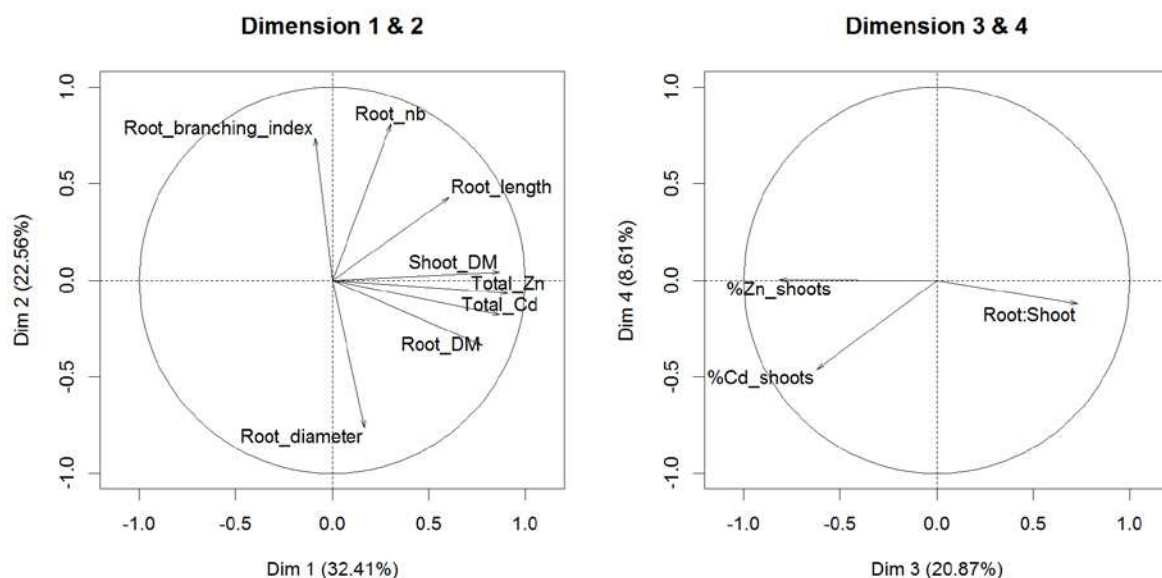


Figure 21. Principal component analysis on variables related to plant growth and to Cd and Zn accumulation for 14 sunflower cultivars grown in hydroponics at 20 nM Cd and 760 nM Zn. The variables are the total amount of Cd and Zn recovered in plant biomass (Total Cd, Total Zn), the % of total Cd and Zn recovered in shoots (%Cd shoots, %Zn shoots), the dry weight of shoots and roots (Shoot DM, Root DM), the root:shoot biomass ratio (Root:Shoot), the total number of laterals (Root nb), the total root length (Root length), the number of laterals per root length unit (Root branching index), and the average root diameter (Root diameter)

The Cd and Zn concentrations in shoots (Shoot Cd Conc., Shoot Zn Conc.) were added as quantitative supplementary variables and the plant height, precocity and the size of seed classification as qualitative supplementary variables. These variables were not correlated with the first four dimensions presented (84 % of the total variance) and therefore are not presented here.

Relationship between total Cd and Zn accumulation and shoot growth

In order to understand the between-cultivar variability for the Cd and Zn concentrations in shoots, the link between the total Cd and Zn in plant and the shoot biomass was investigated more thoroughly. Figure 22 showed that there was a highly significant overall linear relationship between the total Cd and Zn accumulated in the whole plant and the shoot biomass ($R^2=0.42$ for Cd and $R^2=0.50$ for Zn, $p<0.001$ for both metals). The relationships were less good with the root biomass ($R^2=0.36$ for Cd and $R^2=0.39$ for Zn) and with the root surface area ($R^2=0.34$ for Cd and $R^2=0.41$ for Zn). By cultivar, the slope of the relationship

between the total Cd and Zn in plant and the shoot biomass was significant in most of the cases (not shown). This means that the relationship also stands within cultivars. There were significant important differences for the intercept (coefficient of variation of 293% and 122% for Cd and Zn, respectively), indicating differences in the average total metal accumulation between cultivars for the same shoot biomass. Moreover, for Cd, there were also significant differences for the slopes between cultivars, which means different capacities among cultivars for taking up Cd relatively to the shoot growth. For Zn, the cultivar influences on slopes was not significant (parallel lines between cultivars).

Grouping of cultivars depending on the Cd and Zn concentrations in shoots

Figure 23 shows the Cd and Zn concentrations in shoots by cultivar and depending on the total Cd or Zn accumulation in the whole plant (root + shoot biomass) and on the coefficient of metal partitioning to shoots. For Cd, the highest shoot Cd concentrations were found in cultivars having both high Cd accumulation and high partitioning to shoots, which suggests two plant traits to act on in order to potentially manipulate shoot Cd concentration. By contrasts for Zn, the pattern was quite different since as compared to the total accumulation of Zn, the partitioning coefficient was relatively less important in determining the shoot concentration in Zn.

For Cd, the more extreme cultivars were *Cultivar 8* with a low total Cd uptake and root to shoot translocation, *Cultivar 7* with a low total Cd accumulation but a high root to shoot Cd translocation, *Cultivar 9* with a high accumulation and a low root to shoot Cd translocation, and *Cultivar 2* having a high total Cd uptake. Regarding the total accumulation, the extreme cultivars for Zn were similar to those for Cd: *Cultivar 2*, *Cultivar 9* were also strong Zn accumulator whereas *Cultivar 4* and *Cultivar 6* accumulated the less.

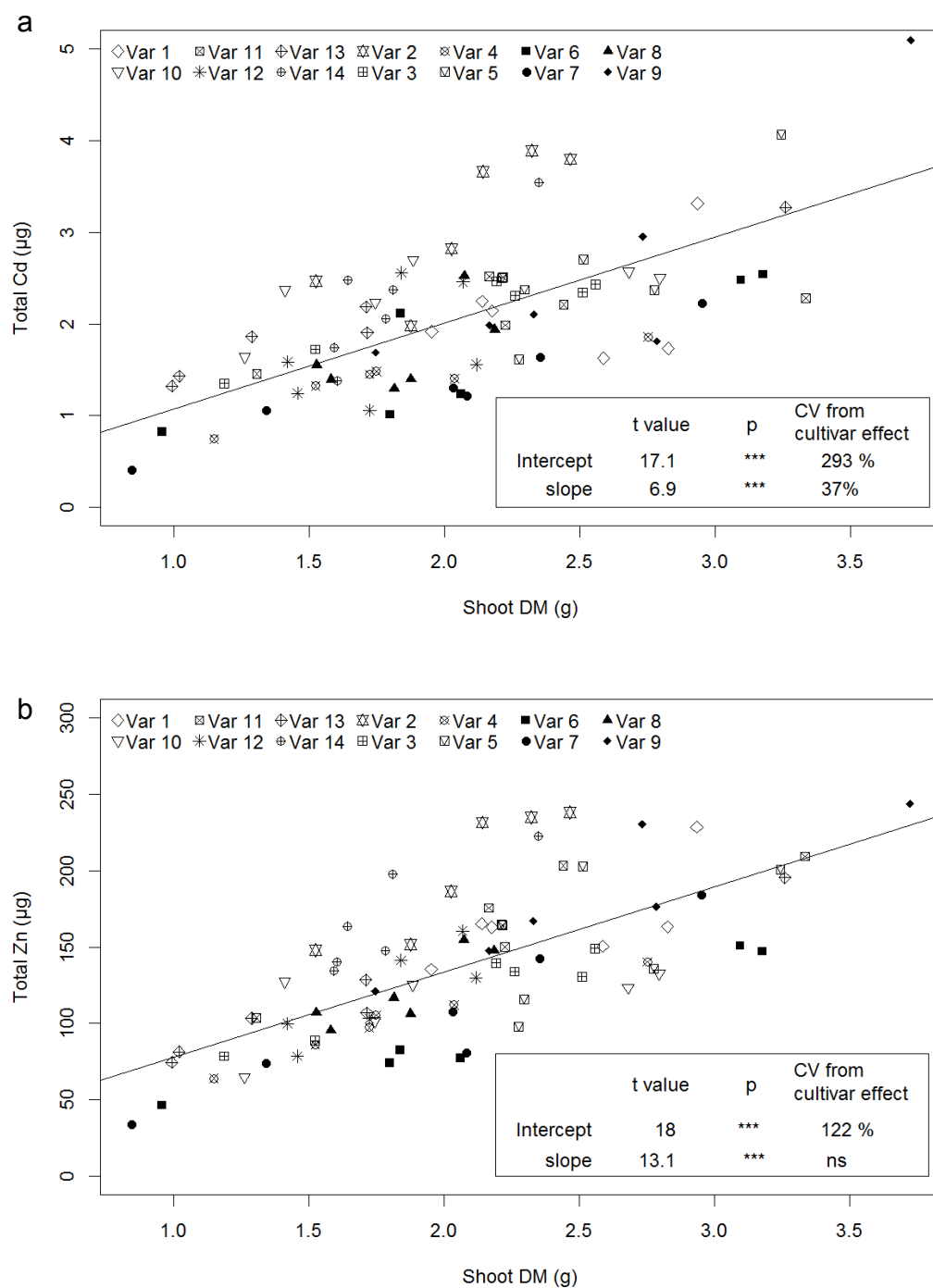


Figure 22. Relationships between the shoot biomass and the total Cd (a) and Zn (b) accumulation in plant for fourteen sunflower cultivars (*different plotting symbols*). The inset presents some statistics of the analysis of covariance from a mixed effect model with the cultivar as a random factor and the shoot biomass as a fixed effect: for the intercept and the slope, the t value and associated p value (*** $p < 0.001$) as well as the coefficients of variation due to the cultivar effect ('CV from cultivar effect') are given

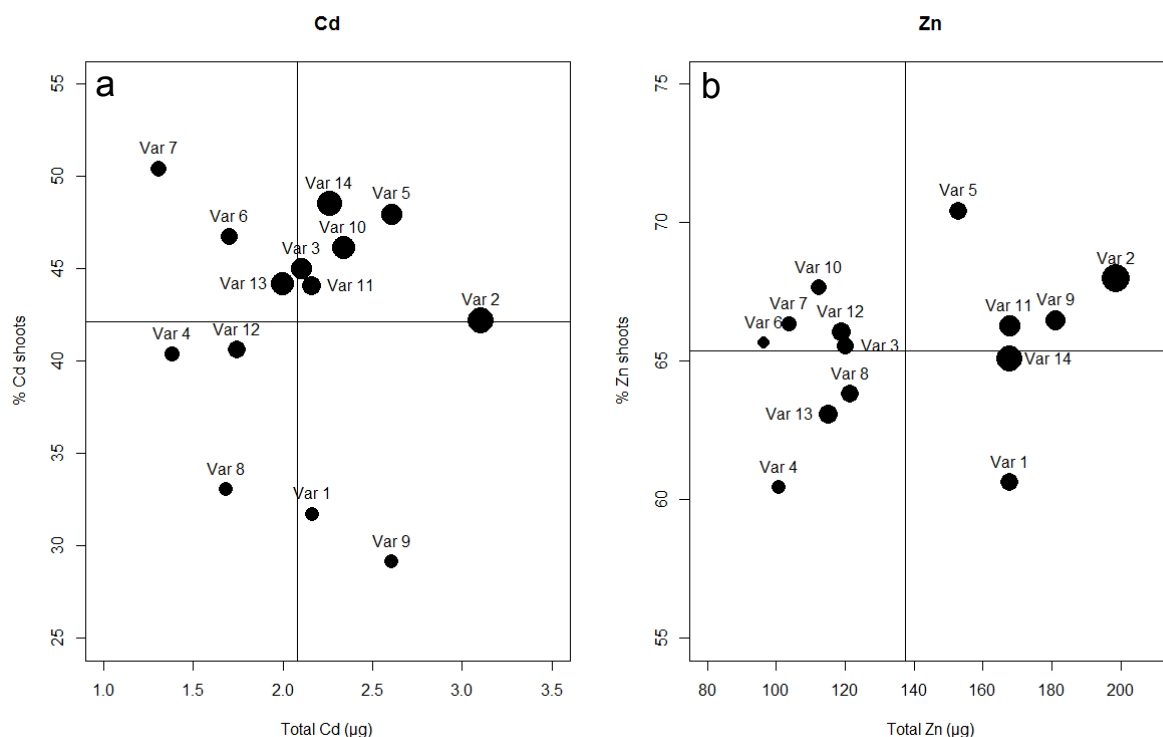


Figure 23. Bubble plots of the Cd (a) or Zn (b) concentration in shoots depending on the % of total Cd or Zn recovered in shoots (% Cd shoots, % Zn shoots, respectively) and on the total Cd or Zn accumulated in the whole plant (root+shoot biomass). *The size of the points are proportional to the Cd or Zn concentrations in shoots. Horizontal and vertical lines are the means for the fourteen cultivars (n=6)*

Correlations between Cd and Zn

There was a strong relationship between Cd and Zn for the total uptake ($R^2=0.71$, $p<0.001$), and to a less extent for the partitioning of the metal to shoots ($R^2=0.34$, $p<0.001$) (Figure 24) and for the shoot concentrations ($R^2=0.37$, $p<0.001$, not shown). There were important differences between cultivars for the accumulation of Cd at a given Zn accumulation as indicated by the coefficient of variation of the intercept. By contrast, when the Zn accumulation increased, the increase in Cd accumulation was the same for all cultivars as indicated by the non-significant effect of the cultivar on the slope (parallel lines). The same

pattern was observed for the partitioning coefficient for Cd and Zn to shoots but the effects were less important.

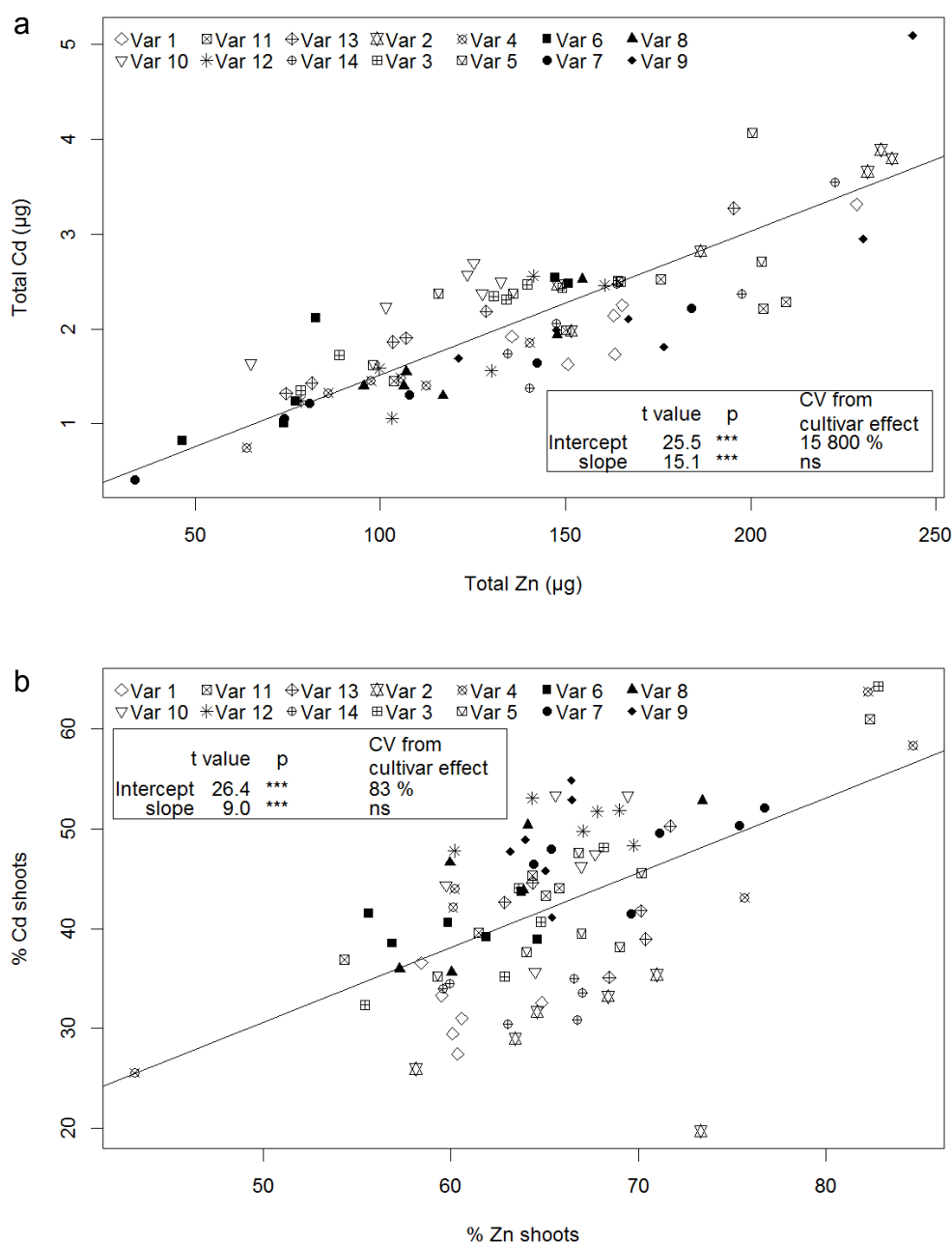


Figure 24. Linear relationships between Cd and Zn for the total metals in plant (a) and for the % of total Cd or Zn recovered in shoots (% Cd shoots, % Zn shoots, respectively) (b) for the 14 sunflower cultivars (different plotting symbols). *The inset* presents some statistics of the analysis of covariance from a mixed effect model with the cultivar as a random factor: for the intercept and the slope, the t value and associated p value (*** p<0.001) as well as the coefficients of variation due to the cultivar effect ('CV from cultivar effect') are given

Discussion

Variability in growth and Cd and Zn accumulation between 14 sunflower cultivars

There was a significant variability in the Cd and Zn concentrations in shoots between the cultivars tested in the present study (Table 9). Variability for Cd accumulation in sunflower has already been reported elsewhere for two hundred other cultivars grown in the field on four different soils (Li *et al.*, 1997). These authors found a 3.4 to 4.1 factor of variation between the cultivars for Cd in leaves. This is a little bit higher than the 2.3 factor observed here for shoots and not leaves, which may explain the difference between the two studies. The factor of variation for Cd in sunflower found here is similar to that reported in durum wheat grain, typically of 2 to 3 (Greger and Lofstedt, 2003; Li *et al.*, 1997; Perilli *et al.*, 2010; Selles *et al.*, 2003; Stolt *et al.*, 2006). For crops that accumulate more Cd, the factor of variation can reach higher value, *i.e.* 10 for flax seed (Li *et al.*, 1997).

The between-cultivar variability in shoot Cd concentration observed here from hydroponics cultures is potentially valuable information for screening cultivars having a low Cd in grain, provided there is a good correlation between the early accumulation of the metal in shoots and the concentration of the contaminant in the grain. This correlation has been already evidenced for two hundred sunflower cultivars (Li *et al.*, 1997) and has to be confirmed for the cultivars tested here and that are currently cultivated in order to make the short-term culture in hydroponics a valuable procedure for screening low grain Cd phenotypes in sunflower.

In the perspective of phytoextraction of soil Cd, the concentration of the contaminant in shoots is not necessarily the relevant criteria for screening phenotypes because the biomass production is also important. Actually, the total amount of Cd accumulated aboveground is much more appropriate and the x2.4 difference observed here between the extreme cultivars (Figure 20) shows that it is of interest to screen the variability in order to select those having a high potential of Cd phytoextraction, for example *Cultivar 2*, *Cultivar 5*, *Cultivar 10* or *Cultivar 14* (Figure 23).

In our work, the concentrations of Cd and Zn in shoots were predominantly depending on the cultivar (Figure 20) and were relatively little affected by the block effect, which was

elsewhere able to significantly impact growth in relation with variations of environmental conditions, in particular the mean temperature and light intensity in the greenhouse. This illustrates that the shoot concentrations for Cd and Zn are particularly regulated. This was more marked for Cd, probably because of its high toxicity.

Between-cultivars differences in shoot Cd and Zn concentrations are related to differences in metal uptake relatively to shoot growth

Considering the classical approach where the uptake of Cd and Zn follows a Michaelis kinetics (see the review of Lux *et al.*, 2011), the amount of each of these metals recovered in the whole plant biomass is expected to be correlated with the root biomass or surface area, which was actually observed. Because these variables were correlated to shoot biomass ($r=0.62$ and $r=0.55$, respectively), the relationship between the metal uptake and the shoot biomass was also expected. However, if this relationship was only the result of the correlation between the root and shoot biomass, the residual variance should have been higher because it cumulates two sources of errors: the correlation between the uptake and the root biomass and the correlation between the root and the shoot biomass. In contrary, the accumulation of Cd and Zn was better correlated with the shoot biomass than with root biomass, suggesting that shoots also physiologically might have also controlled the uptake of Cd and Zn in addition to the effect of the allometry between roots and shoots. Indeed, shoots provide the energy required to maintain the electrochemical gradient necessary to the internalisation of the metals (Cataldo *et al.*, 1983; Hart *et al.*, 2002; Lux *et al.*, 2011), probably by a common transporter as supported by the strong correlation between the total Cd and Zn uptake (Figure 24). This could be the ZIP transporters family (Zinc regulated transporter/Iron regulated transporter – like Protein) involved in Zn^{2+} uptake (Clemens *et al.*, 2002). The possible link between shoot biomass and the uptake of the metals is consistent with the observed strong influence of the environment (block effect) on the uptake as variations in temperature and light intensity may have modulated photosynthesis and therefore, the amount of energy allocated to roots (strong block effect on both shoots and roots growth). Finally, new shoot biomass is also a sink for Zn and consequently, also for Cd as a competitor. Hence, in a modelling approach, the uptake of Cd^{2+} and Zn^{2+} could be considered as a function of shoots growth as it is done for nitrogen

(Lemaire *et al.*, 2007). To the extreme, it might be formulated as a function of solely shoot growth. In this way, the uptake of the metals is implicitly link to root biomass due to its allometry with shoot biomass and additionally, a direct regulation of the uptake by shoots can also be accounted for.

The relationship between the shoot biomass and the metal uptake remained valid within cultivars with differences in the intercepts (and slopes for Cd) indicating that cultivars took up different amounts of Cd and Zn relatively to shoot biomass. Contrary to our hypothesis, the differences in total Cd and Zn uptake were not related to variations in the root system architecture, in particular the number of roots (Figure 21) in spite of a strong between-cultivar variability (Figure 20). The Cd and Zn uptakes were also not related to the average root diameter, which was recognized elsewhere as a driving factor for the uptake of many ions from the soil solution like phosphate, and calcium (Nwoke *et al.*, 2008; Nye, 1973). The branching index (number of laterals relatively to total root length) was expected to be positively correlated to the total metal uptake because a high branching index corresponds to short roots having a high mean influx resulting from the greater influx at the root tip (Farrell *et al.*, 2005; He *et al.*, 2011; Laporte *et al.*, 2013; Pineros *et al.*, 1998). The lack of effect of the branching index can hardly be interpreted because this variable was little variable (Table 8). Therefore, the between cultivar variability for the metal uptake being not explained by differences in root architecture, one possible explanation might be genetic differences in the numbers and/or affinity of Cd^{2+} and Zn^{2+} root transporters involved in the internalisation (Lombi *et al.*, 2002), as shown in alpine pennycress (He *et al.*, 2007; Lasat *et al.*, 1996). For example an over-expression of the ZIP genes has already been correlated with a greater Zn plant accumulation (Assuncao *et al.*, 2001; Pence *et al.*, 2000).

Between cultivar differences in shoot Cd concentration are related to differences in partitioning of the metals to shoot biomass

The partitioning of Cd differed significantly between cultivars and this was not explained by any of the covariables examined (Figure 21). Assuming that Cd is loaded into the xylem by HMAs transporters (Heavy Metal transporting ATPase), also involved in the loading of Zn

(He *et al.*, 2009; Rascio and Navari-Izzo, 2011), if the between cultivar differences in Cd partitioning to shoots was mainly related to differences in xylem loading, one would have expected a similar variability between cultivars for the partitioning of Zn and Cd, which was not observed, the allocation of Zn to shoots being much less variable than that of Cd (Table 9). Additionally, the Cd/Zn correlation for the partitioning was less strong than for the uptake (Figure 24). Therefore, it can be suggested that the variability between cultivars for the partitioning of Cd to shoots originated more likely in different capacities for sequestering the metal into root vacuoles or as chelates in the cytoplasm (Sugiyama *et al.*, 2007) as a mechanisms of detoxification. Consistent with this, the partitioning coefficients for Cd were lower than those of Zn as also found in rice where Zn partitioning coefficient was about nine to thirteen times higher than that of Cd (Homma and Hirata, 1984).

Relative importance of total uptake and partitioning aboveground in determining Cd and Zn concentrations in shoots

For Zn, the gradient of shoot concentrations followed the total uptake, showing that uptake was the main governing factor because of the relatively low variability in the partitioning coefficients (Figure 23). So, these results suggest there is little degree of freedom for increasing Zn concentration in shoots by selecting cultivars on their partitioning of the metal aboveground. *A contrario*, for Cd, the gradient of the shoot concentrations roughly followed the diagonal line (Figure 23), indicating that both a high metal uptake and a high translocation rate were generally necessary to have high Cd concentrations in shoots. This slightly differs from observations on other plants from the literature (Mori *et al.*, 2009; Uraguchi *et al.*, 2009; Farrell *et al.*, 2005) that showed that the regulation for Cd concentration in shoots mostly operated at the partitioning to shoots level and little at the root uptake level.

From our results it can be suggested that for managing Cd accumulation by sunflower, it is possible to select cultivars depending on both uptake and translocation, which, interestingly, as shown by the PCA (Figure 21), were uncorrelated. Then, in order to maximize the accumulation of the contaminant by the crop for phytoextraction purpose, cultivars having both a high uptake and translocation potential would be favoured: *Cultivar 14*, *Cultivar 5*,

Cultivar 10 and *Cultivar 2*. Conversely, for minimizing the accumulation for crop quality purpose (provided the correlation with the grain concentration is valid), cultivars having both a low uptake and a low translocation potential would be preferred: *Cultivar 8*, *Cultivar 1*, *Cultivar 4*.

Conclusions

This work showed significant between-cultivar differences in Cd and Zn concentrations in shoots of 14 genotypes of sunflower, which differed significantly by a factor around 2. As for some other plant species reported in the literature, we confirmed that the cultivar differences in Zn and Cd accumulation in shoots were in part due to differences in allocation aboveground. Our results demonstrated more specifically that the differences in the concentration of these metals in shoots were also significantly linked to differences in Cd and Zn uptake relatively to shoot growth. We also observed that these differences in uptake were not related to different root system architectures. Interestingly, across the genotypes, the uptake capacity and the partitioning aboveground were not correlated. Hence, for Cd, which showed greater variability in partitioning aboveground as compared to Zn, this provides two traits for guiding cultivar selection for field trials in the purpose of crop quality or of phytoextraction. Further studies are needed to check if short-term hydroponic culture is a valuable approach to screen sunflower phenotypes with respect to low grain Cd concentrations or high total Cd accumulation in above ground biomass for field applications.

Acknowledgements

This work was supported by the funding ANR 2011 CESA 008 01 and by a research grant from the Technical Center for Oilseed Crops and Industrial Hemp (CETIOM) and from the French National Institute for Agricultural Research (INRA). The authors are grateful to S. Bussière, C. Coriou and S. Thunot for their helpful technical contributions. They also greatly thank T. Sterckeman for his valuable comments on the manuscript.

CHAPITRE 5.

DISCUSSION GENERALE

Chapitre 5. Discussion générale: Modélisation du prélèvement du Cd par un système racinaire architecturé: comment décrire la fonction d'absorption du Cd^{2+} ?

Dans cette partie nous faisons la synthèse des résultats obtenus et tirons les conclusions par rapport aux approches possibles pour modéliser l'absorption du Cd par un système racinaire pour lequel l'architecture est décrite.

5.1 Regard critique sur les approches expérimentales de détermination de la capacité racinaire d'absorption du Cd^{2+}

Sur le plan de l'approche expérimentale, nos travaux aboutissent à la conclusion que la capacité d'absorption du Cd^{2+} déterminée à partir d'expérience en hydroponie est surestimée par rapport à celle obtenue sur sable, et donc probablement en sol en lien vraisemblable avec une moindre différenciation des barrières apoplasmiques en hydroponie (Chap. 3). D'autres travaux de la littérature montrent par ailleurs qu'en raison de la limitation de l'absorption par la diffusion de l'ion Cd^{2+} dans la solution nutritive, la constante Michaélienne K_m est surestimée (Degryse *et al.*, 2012). La 'root absorbing power' (RP) correspond au rapport $I_{\max}/K_m$ dans la situation où la concentration d'exposition est très faible. Cela signifie que la limitation imposée par la diffusion conduit à sous-estimer cette fois la RP. Les valeurs de la littérature sont donc à double titre à considérer avec prudence et il y a une réflexion à conduire sur la manière expérimentale de déterminer les paramètres de capacité d'absorption qui soient les moins biaisés possibles pour ensuite les utiliser dans les modèles de prélèvement par les plantes. Une possibilité serait l'utilisation de substrat de culture proche du sol pour assurer un développement réaliste des barrières apoplasmiques. Une fois excavé, le système racinaire ou une partie serait alors exposé à une solution cadmiée et marquée au ^{109}Cd comportant un ligand complexant (EDTA par exemple) qui tamponnerait la disponibilité de Cd^{2+} à la surface racinaire annulant de fait en grande partie la limitation du prélèvement par la diffusion.

5.2 Relation entre l'architecture du système racinaire et sa capacité à absorber le cadmium

Au cours de cette thèse, nous avons testé l'hypothèse de l'influence de l'architecture racinaire sur le prélèvement total en cadmium (Cd) du système racinaire du tournesol (*Helianthus annuus* L.). Cette hypothèse dérive d'études de la littérature qui ont montré un influx racinaire de Cd^{2+} plus important vers la partie apicale des racines individuelles de *Triticum aestivum*, *Noccaea caerulescens* (anciennement nommé Thlaspi), *Sueda salsa* et *Populus canescens* (Farrell *et al.*, 2005; He *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Pineros *et al.*, 1998). D'autres travaux à l'échelle du système racinaire chez le blé dur ont abouti à des résultats

cohérents avec le plus fort influx de Cd aux extrémités racinaires: la variété *Arcola* prélève plus de Cd que la variété *Kyle* et possède en parallèle plus de racines par unité de biomasse racinaire (Berkelaar and Hale, 2000). Pour autant, *Arcola* présente également une plus forte surface et biomasse racinaire. En conséquence, il est difficile de savoir à quoi attribuer la différence d'absorption. L'impact propre du nombre de racines lié à la variation longitudinale de l'influx n'est pas clair dans la littérature et a fait l'objet de ce travail de thèse. Notre hypothèse était que l'architecture racinaire, notamment le nombre de racines, pouvait influencer le prélèvement total en Cd^{2+} de la plante, indépendamment de l'effet sur la surface racinaire et ce, en augmentant la proportion des extrémités racinaires ayant une plus forte capacité de prélèvement du métal.

Pour tester cette hypothèse, la première étape de notre travail a été de démontrer et d'étudier la variabilité longitudinale de l'influx sur les racines de tournesol (Chap. 2 et 3). Nous avons montré que l'absorption du Cd qui suit théoriquement une cinétique Michaelienne (Hart *et al.*, 1998), peut être simplifiée par une relation linéaire pour les faibles concentrations en Cd^{2+} (<500 nM) qui dominant dans les sols agricoles. Dès lors l'influx d'internalisation racinaire du Cd^{2+} dans le symplasme ($\text{nmoles cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) est proportionnel à la concentration en Cd^{2+} et le coefficient de proportionnalité souvent dénommé par les anglo-saxons 'root absorbing power' (RP, $\text{L cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) rend compte de la capacité d'absorption du Cd par la racine indépendamment de sa surface et de la concentration d'exposition.

$$I = \text{RP} [\text{Cd}] \quad (\text{Eq. 11})$$

Avec I = Influx racinaire de Cd^{2+} ($\text{nmoles cm}^{-2} \text{s}^{-1}$), RP = root absorbing power ($\text{L cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) et $[\text{Cd}]$ = concentration en Cd^{2+} dans la solution (nmoles L^{-1})

A l'échelle de la racine individuelle, nous avons observé une variation longitudinale de l'influx de Cd^{2+} , la RP diminuant d'un facteur allant de 2.9 à 3.6 entre l'apex et la partie basale de la racine pour les latérales d'ordre un cultivées en hydroponie ou sur substrat solide (sable de quartz). La variation longitudinale de l'influx a été également montrée pour les racines latérales d'ordre deux. Cette variation longitudinale de l'influx pourrait être liée à une variation longitudinale de l'activité métabolique. En effet, sur les coupes transversales des racines de tournesol étudiées, la densité cytoplasmique est plus importante aux apex, pouvant

représenter une zone de plus forte activité métabolique. Cette hypothèse peut être étayée par la correspondance du profil longitudinal de la concentration en métabolites des racines de maïs (Jones, 1998) avec le profil de ces capacités d'absorption, comportant une zone de plus forte concentration en sucre aux apex correspondant à une zone de plus forte capacité d'absorption en Cd^{2+} (Figure 26). Cependant, nos observations portant sur des racines plus ou moins vieilles ont abouti à la conclusion que les variations longitudinales d'influx n'étaient vraisemblablement pas liée à la plus forte activité métabolique au niveau des apex racinaires plus riches en sucre dans les tissus racinaires (Jones, 1998) car la capacité d'absorption de l'apex n'était pas affecté ni par l'ordre, ni par l'âge de la racine, facteurs de diminution de l'énergie disponible aux apex racinaires (Aguirrezabal, 1993 ; Pellerin and Pagès, 1994).

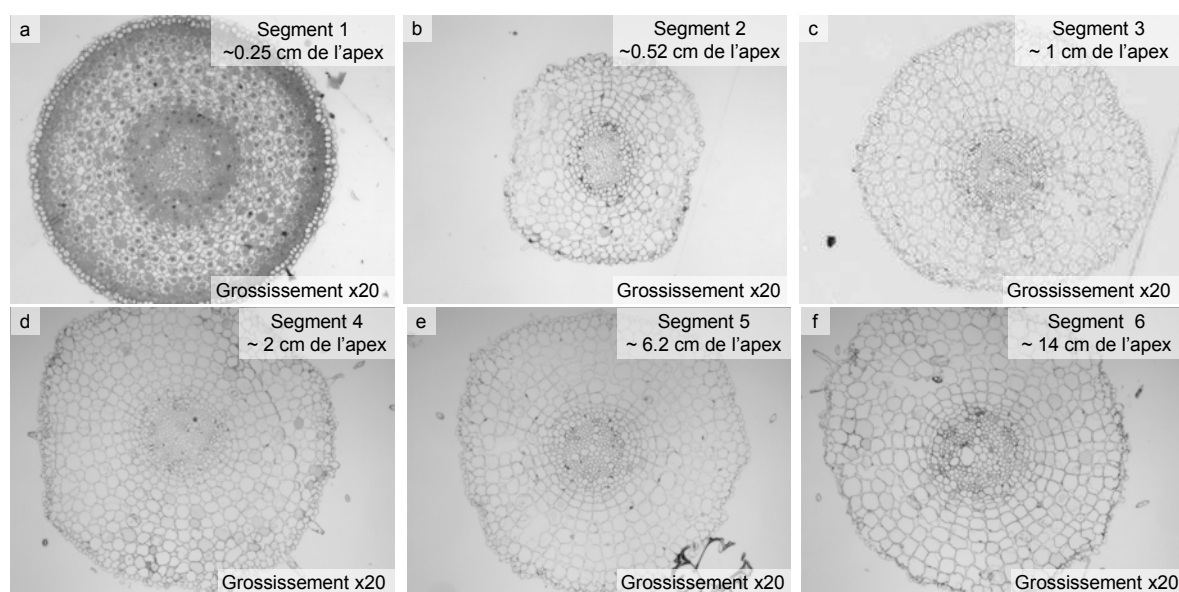


Figure 25. Coupes transversales de racines, latérales d'ordre 1 de tournesol échantillonnées à six positions derrières l'apex. Après fixation au glutaraldéhyde et osmium, puis inclusion en Epon, des coupes ont été échantillonnées sur six segments racinaires, de l'apex (segment 1) à la base racinaire (segment 6), sélectionnés d'après la méthode d'échantillonnage réalisée pour l'étude de la variation longitudinale de l'influx en Cd^{2+} (Chap. 2, Figure 10). Les coupes ont été observées au microscope photonique Axiophot

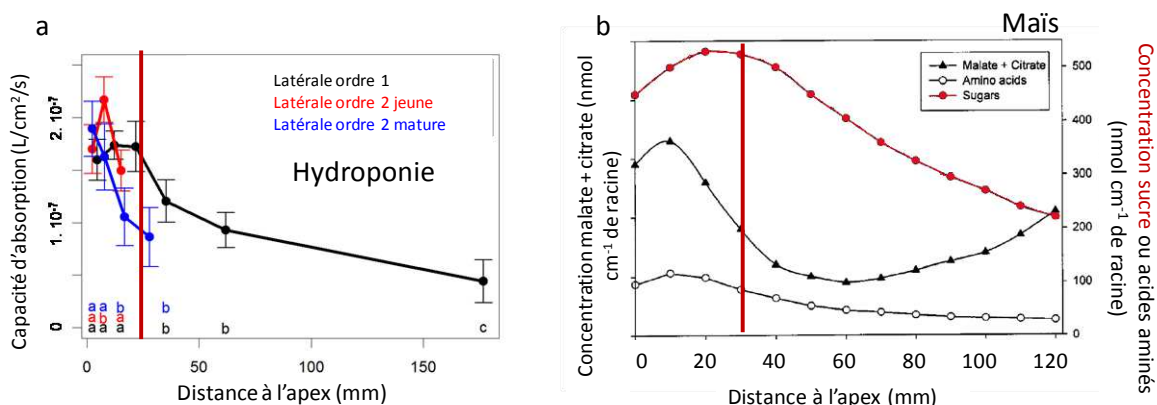


Figure 26. Correspondance des profils longitudinaux des capacités d'absorption racinaire chez le tournesol (a) et des concentrations racinaires des métabolites chez le maïs (b) (Jones, 1998). Les barres verticales rouges représentent les distances à l'apex du début des décroissances des capacités d'absorption et des concentrations des métabolites

Selon nous, ces gradients d'influx sont le plus vraisemblablement liés au développement des barrières apoplasmiques, les bandes de Caspary et lamelles de subérine qui se différencient au niveau de l'endoderme et de l'exoderme. Ces structures imperméables à la diffusion apoplasmique des ions (Cholewa, 2000; Ferguson and Clarkson, 1976; Lehmann *et al.*, 2000) entraînent donc une diminution de la surface effective d'internalisation symplasmique, réduisant par là même l'influx racinaire de Cd^{2+} . Pour différentes espèces végétales, le développement des barrières apoplasmiques a été supposé être responsable de différences d'accumulation du Cd^{2+} (Lux *et al.*, 2004; Redjala *et al.*, 2011). Le développement de ces barrières apoplasmiques étant initié en arrière de l'apex racinaire, celle-ci seraient absentes à l'apex, entraînant un influx de Cd^{2+} plus important que vers la base de la racine où elles seraient totalement différenciées. La variation longitudinale de l'influx refléterait donc le profil de différenciation progressive des barrières, en lien également avec l'âge et l'ordre de la racine. Cette hypothèse explicative pourrait être validée par des études histologiques consistant à observer au microscope après coloration spécifique, l'épaississement des parois cellulaires et les dépôts de subérine de l'endoderme et de

l'exoderme, comme cela a été fait chez d'autres espèces végétales (Lux *et al.*, 2004). Nous avons tenté de le faire mais ne sommes pas parvenus à maîtriser suffisamment le protocole pour obtenir des résultats concluant. Les photos de la Figure 25 montrent des coupes de racines effectuées à des distances croissantes de l'apex racinaire sans coloration spécifique car cette dernière n'était pas au point. On distingue clairement une densité cytoplasmique plus importante vers l'apex traduisant une activité métabolique accrue mais il est difficile de distinguer un épaississement des parois et les dépôts de subérine. Cependant, les profils longitudinaux de maturation des barrières apoplasmiques chez des racines de maïs poussées en hydroponie et sur sol (Redjala *et al.*, 2009), correspondent aux profils longitudinaux des capacités d'absorption ainsi qu'à leur variation liée aux milieu de culture (hydroponie / substrat sableux ~ sol), avec une zone où ces barrières sont absentes concordant à la zone de plus fort influx, et une deuxième zone principale concordante avec la zone de diminution de l'influx racinaire (Figure 27). Dans l'hypothèse où la maturation des barrières apoplasmiques est similaire chez le maïs et le tournesol, le développement de ces dernières semble donc être l'hypothèse la plus probable pouvant expliquer la variation longitudinale de l'influx.

En modélisant mathématiquement la variation longitudinale d'influx pour simuler l'absorption totale de Cd par un système racinaire en fonction de potentielles variations d'architecture suggérées par la littérature (Aguirrezabal, 1993), nous avons montré que l'absorption totale de Cd pouvait varier du simple à plus du double suivant que la zone de plus fort influx s'étendait plus ou moins loin de l'apex. Or le deuxième résultat majeur de nos travaux a été de montrer que lorsque les racines croissent sur un substrat solide (sable), la différence d'influx entre l'apex et la base de la racine est toujours aussi importante (rapport de ~x3.6) mais la zone apicale où l'influx est le plus fort se réduit fortement à par rapport à l'hydroponie : l'influx baisse de 50% sur ~6 cm de longueur pour l'hydroponie et seulement sur ~1.5 cm sur sable. Pour simplifier, considérons deux zones racinaires, l'une apicale de fort RP (RP⁺) d'une longueur 'x' et la seconde basale de plus faible RP (RP⁻) s'étendant sur une longueur (L-x), L étant la longueur totale de la racine. Nous pouvons donc calculer la RP moyenne de la racine :

$$RP_{\text{moy}} = [RP^+ x + RP^- (L-x)]/L \quad (\text{Eq. 12})$$

$$RP_{\text{moy}} = RP^- [ext RP^+ / RP^- + (1-ext)] \quad (\text{Eq. 13})$$

où $ext = x/L$ est l'extension de la zone à forte RP relativement à la longueur totale de la racine.

Pour une RP à la base de la racine donnée (RP^-), nous avons examiné comment variait la RP moyenne de la racine (RP_{moy}) en fonction de la zone d'extension et du rapport (RP^+ / RP^-). D'après nos résultats nous avons fait varier les rapports (RP^+ / RP^-) de 1 à 4 et ext de 0.01 à 0.5 ce qui signifie que la zone de fort influx peut couvrir de 1% à 50% de la longueur totale de la racine.

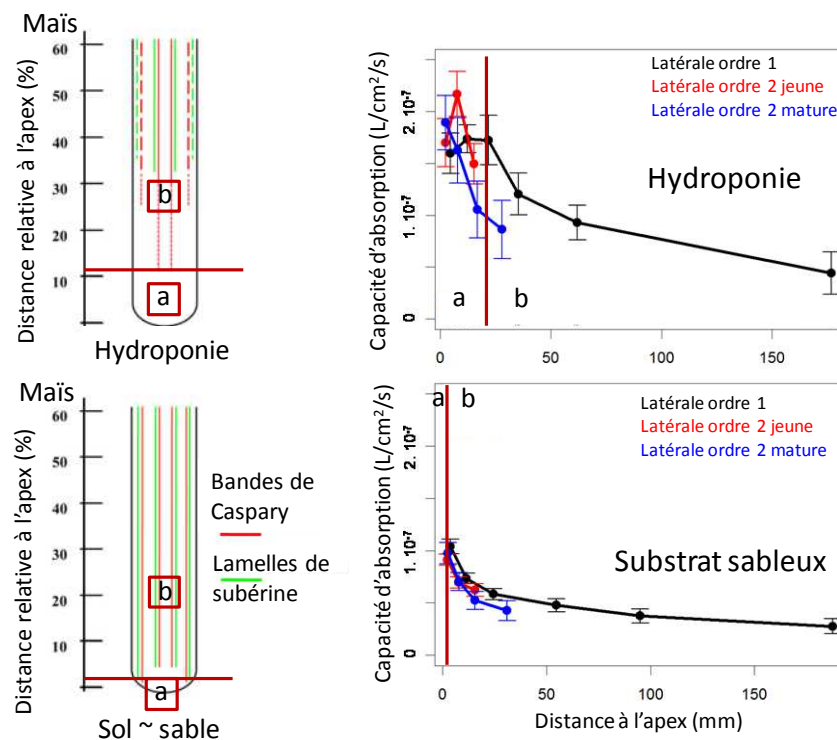


Figure 27. Correspondance des profils de maturation des barrières apoplasmiques chez des racines de maïs (gauche) (Redjala *et al.*, 2009), et des profils des capacités d'absorption chez les racines de tournesol (droite), en hydroponie et sur substrat solide (sable ~ sol). Les *barres rouges* déterminent la zone racinaire où les barrières apoplasmiques commencent à être matures selon les données recueillies chez les racines de maïs, donnant les deux zones racinaires hypothétiques de plus fort (a) et de plus faible (b) influx

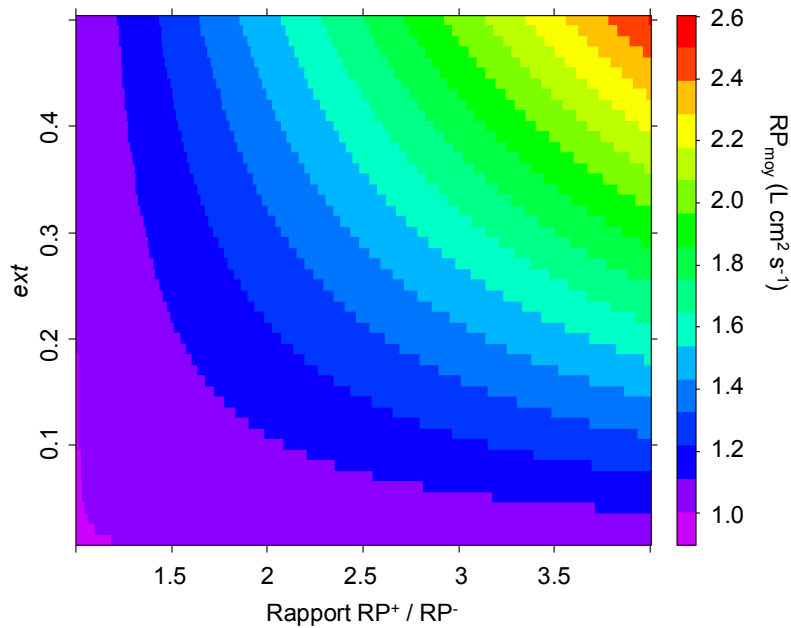


Figure 28. Impact calculé de la variation longitudinale de l'influx de Cd sur l'influx moyen (RP racinaire moyen) du métal à l'échelle de la racine individuelle. On considère qu'une racine se divise en deux zones ayant une capacité forte ou faible d'absorption du Cd. RP^+ / RP^- est le rapport capacité forte/capacité faible d'absorption et ext est la fraction de la longueur racinaire qui présente une forte capacité d'absorption. Le gradient de couleur présente la capacité moyenne d'absorption du Cd de la racine calculée en fonction de ext et du rapport RP^+ / RP^- . Elle est exprimée en multiple de la capacité faible (Eq. 13)

Nous voyons que pour les latérales d'ordre 1, en hydroponie où la zone de fort influx couvre en moyenne près de 30% de la longueur totale de la racine pour un rapport (RP^+ / RP^-) d'environ 1.6 (Chap. 2, Figure 13), la capacité moyenne d'absorption du Cd^{2+} (RP_{moy}) est 1.2 fois la RP de la zone basale alors qu'en sable, la zone de fort influx ne couvrant que 13% de la longueur totale de la racine, pour le même rapport (RP^+ / RP^-) de 1.6, la capacité moyenne d'absorption du Cd (RP_{moy}) est 1.1 fois la RP de base (Figure 28). D'après les travaux de Redjala *et al.* (2011), il est clair que le profil des cultures sur sable est plus proche de celui des conditions de sol que celui de l'hydroponie. Dès lors, il est attendu qu'en sol, la variation longitudinale d'influx ait un impact très limité sur l'absorption du Cd comparé à un influx supposé constant longitudinalement pour les latérales d'ordre 1. Cela montre que la variation longitudinale de l'influx a un impact faible sur la RP moyenne de la racine.

Pour les latérales d'ordre 2, plus courtes, la forte décroissance de l'influx porte sur près de la moitié de la longueur de la racine (*ext*~50%) et (RP^+/RP^*) est toujours voisin de 1.6. Les calculs (Figure 28) montre que l'influx moyen est au final assez peu sensible au profil : 1.2 fois l'influx de la partie basal (RP^*). Ces calculs montrent que la valeur de l'influx moyen de Cd^{2+} des racines d'ordre 1 et 2 est très modérément affecté par la variation longitudinal de l'influx. Faut il considérer cet effet à l'échelle du système racinaire entier, sachant que le nombre de racines peu varier selon les cultivars ou les conditions de cultures (cf synthèse bibliographique et Chap. 4) et amplifier d'autant le phénomène?

En comparant l'architecture racinaire et le prélèvement de Cd chez 14 cultivars de tournesol actuellement commercialisés en France (Chap. 4), nous avons observé des différences de nombre racines mais elles n'ont pas expliqué les différences d'absorption du Cd entre cultivars (Figure 29 a). Le prélèvement total de Cd^{2+} était bien corrélé avec la taille totale du système racinaire (Figure 29 b et c) mais cependant plus fortement avec la biomasse aérienne (Figure 29 c), ce qui suggère que ces dernières aient également contrôlé physiologiquement l'absorption du Cd^{2+} . Il semble donc que les variations longitudinales d'influx aient un effet de second ordre sur la capacité de prélèvement du Cd, derrière d'autres mécanismes probablement liés à la croissance des parties aériennes. Ceci est assez cohérent avec les calculs effectués plus haut.

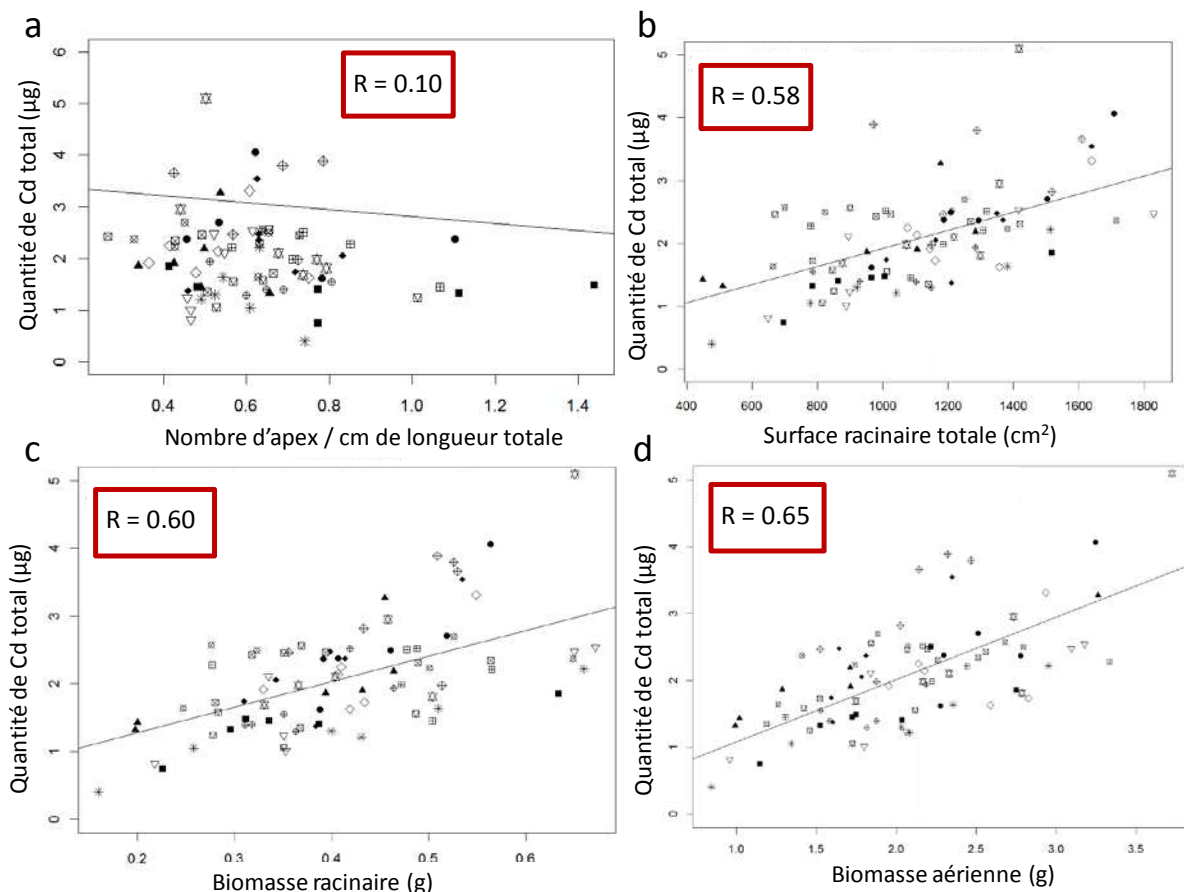


Figure 29. Corrélations entre la quantité de Cd total prélevée et le nombre d'apex (par unité de longueur totale, a), la surface racinaire (b), la biomasse racinaire (c), et la biomasse aérienne (d) pour la totalité des plantes appartenant aux 14 variétés de tournesol testées (différents symboles). Avec R , le coefficient de corrélation pour chacune des relations

En matière de modélisation du prélèvement du Cd par une plante de tournesol, nos résultats incitent donc à simplifier le système en considérant une capacité d'absorption uniforme le long des racines. Cette possibilité de simplification étayée par nos travaux est d'une importance significative car elle permet de s'affranchir de calculs très complexes pour prédire l'absorption du Cd^{2+} par un système racinaire dans un sol selon l'approche classique développée dans le modèle de Barber-Cushman (Cushman, 1984). En effet, dans ce type de modèle, la disponibilité de l'ion libre Cd^{2+} à la surface racinaire est régie par des gradients issus des interactions entre l'absorption racinaire, le transport par diffusion ou convection, la

sorption sur la phase solide voire la complexation en solution avec la matière organique soluble (Lin *et al.*, 2013). Or ces gradients sont généralement unidimensionnels, orientés perpendiculairement à la surface racinaire si l'absorption est uniforme. A ce niveau, le système se résout en une dimension. *A contrario*, si l'absorption est variable longitudinalement selon l'axe de la racine, il va se développer des gradients parallèles à la surface racinaire et le système doit se traiter en deux dimensions. En outre, nos résultats montrent que les capacités d'absorption des latérales d'ordre un et deux sont très proches pour les cultures en sables. Par conséquent, afin de simplifier la modélisation de l'absorption du Cd par un système racinaire en condition de sol, il pourrait être supposé que toutes les racines ont la même capacité d'absorption quel que soit leur ordre.

Il ne doit pas être conclu de nos travaux que l'architecture racinaire n'influe pas le prélèvement total de Cd^{2+} . Dans un système où la disponibilité de l'ion Cd^{2+} est uniforme, nous concluons que l'architecture racinaire impacte peu la capacité d'absorption par unité de surface moyenne du système racinaire (la 'root absorbing power' moyenne de la plante). Pour autant, une variabilité d'architecture racinaire peut affecter la surface totale qui augmente proportionnellement le prélèvement (Chap.4). En outre, il peut être pertinent de spatialiser en trois dimensions le prélèvement du Cd en raison de gradient horizontaux et/ou verticaux de disponibilité du métal, ou rendre compte de la compétition entre plante par exemple.

5.3 La capacité à absorber le Cd sous le contrôle d'autres déterminants physiologiques?

Pour toutes nos expérimentations, nous avons noté une forte variabilité individuelle (plante) des capacités d'absorption. Cette variabilité a pu être modélisée et donc différenciée de l'erreur résiduelle aléatoire (analyse des données par les modèle à effets mixtes). De manière assez répétable, nous avons constaté que cette variabilité inter-individus des capacités d'absorption était du même ordre de grandeur que la variabilité longitudinale. Ayant travaillé sur des racines individuelles et non sur la totalité du système racinaire, cela signifie que pour un cultivar donné la capacité d'absorption (RP) varie au sein du système racinaire et/ou entre plante. Une variabilité au sein du système racinaire est possible car même si nous avons sélectionné des racines les plus semblables possibles, elles ont pu différer pour l'âge dont on a

observé qu'il avait un effet sur la capacité de prélèvement (Chap. 3). Une variabilité entre plante d'un même cultivar est également envisageable si l'on se réfère à la relation entre le prélèvement et la biomasse aérienne obtenue lors de la comparaison de cultivars (Chap. 4). Comme cela a déjà été évoqué, il semble bien que la croissance des parties aériennes contrôle en partie le prélèvement de Cd et nous ne pouvons garantir que toutes les plantes avaient toutes les mêmes biomasses aériennes. Physiologiquement, il est compréhensible qu'un individu en forte croissance ait des besoins en éléments nutritifs plus importants, y compris notamment en Zn. Une variabilité de la croissance est donc cohérente avec une variabilité symétrique de l'activité des transporteur du Zn^{2+} qui assurent également l'internalisation du Cd^{2+} . Dans un modèle de prélèvement du Cd^{2+} , assujettir la capacité de d'absorption (RP) à la croissance aérienne semble donc pertinent. Enfin, comme le montrent les résultats, il y a une composante génétique qui explique que pour une même biomasse aérienne les cultivars ont des capacités variables d'absorption du Cd. L'ensemble de ces éléments peut expliquer la forte variance inter individus des capacités d'absorption du métal.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives

Nous concluons que malgré une variation longitudinale de la capacité d'absorption du Cd^{2+} à l'échelle individuelle des racines de tournesol, en condition les plus semblables au sol, cette variation devrait peu affecter la capacité moyenne d'absorption du système racinaire même si l'architecture varie sensiblement. Nous suggérons donc de considérer une capacité d'absorption longitudinalement uniforme qui devra être déterminée avec le moins de biais expérimentaux pour être ensuite utilisée dans un modèle de prélèvement par une plante entière. Comme nous l'avons évoqué cette simplification est un enjeu majeur en termes de complexité de la modélisation du prélèvement par la plante. En outre, les capacités d'absorption entre les différents ordres de racines testées dans ce travail sont très proches et pourraient être considérées égales comme simplification supplémentaire. Ces hypothèses simplificatrices doivent être validées maintenant pour des plantes cultivées en sol. La difficulté consistera à faire varier l'architecture racinaire sans provoquer de confusion d'effets en impactant par ailleurs d'autres variables comme la phytodisponibilité du Cd dans le sol où la physiologie de la plante. On pourrait imaginer d'isoler des parties variables du système racinaire toujours attachés à la plante mais se développant dans de fines couches de terre qui seraient par la suite excavées pour être ponctuellement exposées à du Cd radioactif pour suivre sur du court terme l'absorption du traceur. A une échelle plus macroscopique une comparaison de cultivars cultivés en terre et en pots serait également une solution avec le risque que la variabilité génétique portant sur la capacité d'absorption couvre l'effet de la variabilité de l'architecture racinaire.

Enfin, les variables agronomiques d'intérêts sont la concentration en Cd de la graine (sécurité sanitaire) ou la quantité totale de Cd dans les parties aériennes (phytorémédiation). La modélisation du prélèvement à laquelle nos travaux se sont principalement attachés n'est que la première étape de la modélisation du transfert sol-plante (organe consommé) du Cd. Comme l'on montré nos résultats relatifs à la comparaison des cultivars, il y a des pistes de recherches à fort enjeux: comprendre le rôle des parties aériennes sur la régulation du prélèvement racinaire, explorer la diversité génétique portant sur la capacité d'absorption du métal et sur son exportation vers les parties aériennes. Sur ce point, nous avons montré

l'existence d'une variabilité génétique pour la teneur en Cd des parties aériennes. Des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer que le classement des cultivars effectué en hydroponie est cohérent avec ce qui serait observé au champ. Sachant que le substrat de culture peut influencer nombre de paramètres du prélèvement et différemment selon la variété, comme par exemple la surface de prélèvement ou le diamètre moyen racinaire, il serait important de vérifier la concordance du screening variétal effectué en hydroponie avec un effectué sur sol.

Enfin, la concentration des parties aériennes en Cd peut ne pas refléter la concentration en Cd des graines. En effet, bon nombres de mécanismes rentrent en ligne de compte pour la détermination de la concentration des graines comme le stockage dans les vacuoles des feuilles et la capacité de chargement du phloème. Par conséquent, des études supplémentaires sont nécessaires afin d'estimer la corrélation entre la concentration en Cd des parties aériennes, et celles des graines, et d'examiner à partir de quel stade végétatif cette corrélation est la meilleure. Ceci, afin de pouvoir effectuer des diagnostics précoces de la capacité de contamination des cultures par variété.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références

- Adhikari T, Rattan RK.** 2000. Modelling zinc uptake by rice crop using a Barber-Cushman approach. *Plant and Soil* **227**, 235-242.
- Adriano DC.** 2001. *Trace Elements in Terrestrial Environments : biochemistry, bioavailability, and risks of metals*. 2nd ed. New-York, USA.: Springer-Verlag.
- Aguirrezabal L.** 1993. *Modélisation de l'allongement et de la ramification du système racinaire du tournesol (Helianthus annuus L.). Effet du rayonnement intercepté et de la température*, 90 p. Thèse: Physiologie végétale: Clermont-Ferrand II, Clermont-Ferrand.
- Aguirrezabal LAN, Deleens E, Tardieu F.** 1994. Root Elongation Rate Is Accounted for by Intercepted Ppfd and Source-Sink Relations in-Field and Laboratory-Grown Sunflower. *Plant Cell and Environment* **17**, 443-450.
- Aguirrezabal LAN, Tardieu F.** 1996. An architectural analysis of the elongation of field-grown sunflower root systems. Elements for modelling the effects of temperature and intercepted radiation. *Journal of Experimental Botany* **47**, 411-420.
- Alameda D, Villar R.** 2012. Linking root traits to plant physiology and growth in *Fraxinus angustifolia* Vahl. seedlings under soil compaction conditions. *Environmental and Experimental Botany* **79**, 49-57.
- Almas AR, McBride MB, Singh BR.** 2000. Solubility and lability of cadmium and zinc in two soils treated with organic matter. *Soil Science* **165**, 250-259.
- Angadi SV, Entz MH.** 2002. Root system and water use patterns of different height sunflower cultivars. *Agronomy Journal* **94**, 136-145.
- Ansari R, Kazi TG, Jamali MK, Arain MB, Wagan MD, Jalbani N, Afridi HI, Shah AQ.** 2009. Variation in accumulation of heavy metals in different varieties of sunflower seed oil with the aid of multivariate technique. *Food Chemistry* **115**, 318-323.
- Arao T, Ae N, Sugiyama M, Takahashi M.** 2003. Genotypic differences in cadmium uptake and distribution in soybeans. *Plant and Soil* **251**, 247-253.
- Assuncao AGL, Martins PD, De Folter S, Vooijs R, Schat H, Aarts MGM.** 2001. Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell and Environment* **24**, 217-226.
- Aten CF, Gupta SK.** 1996. On heavy metals in soil; Rationalization of extractions by dilute salt solutions, comparison of the extracted concentrations with uptake by ryegrass and lettuce, and the possible influence of pyrophosphate on plant uptake. *Science of The Total Environment* **178**, 45-53.

- Baize D, Sterckeman T.** 2001. Of the necessity of knowledge of the natural pedo-geochemical background content in the evaluation of the contamination of soils by trace elements. *Science of The Total Environment* **264**, 127-139.
- Baize D, Deslais W, Saby N.** 2007. Teneurs en huit éléments traces (Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, Zn) dans les sols agricoles en France. Résultats d'une collecte de données à l'échelon national. Rapport final simplifié. In: ADEME, ed. Angers.
- Baker AJM.** 1987. Metal tolerance. *New Phytologist* **106**, 93-111.
- Barber SA.** 1995. *Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach*. 2nd ed.
- Baxter I, Hosmani P S, Rus A, Lahner B, Borevitz J O, Muthukumar B, Mickelbart M V, Schreiber L, Franke R B and Salt D E.** 2009. Root Suberin Forms an Extracellular Barrier That Affects Water Relations and Mineral Nutrition in Arabidopsis. *Plos Genetics* **5**.
- Becel C, Vercambre G, Pages L.** 2012. Soil penetration resistance, a suitable soil property to account for variations in root elongation and branching. *Plant and Soil* **353**, 169-180.
- Bennie ATP.** 1991. Growth and Mechanical Impedance. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U, first ed, *Plant roots : the hidden half*, New-York: Marcel Dekker Inc.
- Berkelaar E, Hale B.** 2000. The relationship between root morphology and cadmium accumulation in seedlings of two durum wheat cultivars. *Canadian Journal of Botany- Revue Canadienne De Botanique* **78**, 381-387.
- Bisson M, Diderich R, Houeix N, Hulot C, Lacroix G, Lefevre JP, Leveque S, Magaud H, Morin A, Pepin G, Pichard A.** 2011. Cadmium et ses dérivés. INERIS - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques.
- Boominathan R, Doran PM.** 2003. Organic acid complexation, heavy metal distribution and the effect of ATPase inhibition in hairy roots of hyperaccumulator plant species. *Journal of Biotechnology* **101**, 131-146.
- Boruvka L, Kristoufkova S, Kozak J, HuanWei C.** 1997. Speciation of cadmium, lead and zinc in heavily polluted soils. *Rostlinna Vyroba* **43**, 187-192.
- Bowen GD.** 1991. Soil temperature, Root Growth, and Plant Function. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U, first ed, *Plant roots : the hidden half*, New-York: Marcel Dekker Inc.
- Broadley MR, Willey NJ, Wilkins JC, Baker AJM, Mead A, White PJ.** 2001. Phylogenetic variation in heavy metal accumulation in angiosperms. *New Phytologist* **152**, 9-27.
- Buckley WT, Buckley KE, Huang JZ.** 2010. Root cadmium desorption methods and their evaluation with compartmental modeling. *New Phytologist* **188**, 280-290.
- Burzynski M, Migocka M, Klobus G.** 2005. Cu and Cd transport in cucumber (*Cucumis sativus* L.) root plasma membranes. *Plant Science* **168**, 1609-1614.

- Cannon WA.** 1949. A Tentative Classification of Root Systems. *Ecology* **30**, 542-548.
- Cataldo DA, Garland TR, Wildung RE.** 1983. Cadmium Uptake Kinetics in Intact Soybean Plants. *Plant Physiology* **73**, 844-848.
- CETIOM.** 2002. Tournesol: les techniques culturales, le contexte économique. Grignon: CETIOM.
- Chan DY, Hale BA.** 2004. Differential accumulation of Cd in durum wheat cultivars: uptake and retranslocation as sources of variation. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2571-2579.
- Chang AC, Warneke JE, Page AL, Lund LJ.** 1984. Accumulation of heavy metals in sewage sludge treated soils. *Journal of Environmental Quality* **13**, 87-91.
- Charlton WA.** 1991. Lateral Root Initiation. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U, first ed, *Plant roots : the hidden half*, New-York: Marcel Dekker Inc.
- Chiang PN, Wang MK, Chiu CY, Chou SY.** 2006. Effects of cadmium amendments on low-molecular-weight organic acid exudates in rhizosphere soils of tobacco and sunflower. *Environmental Toxicology* **21**, 479-488.
- Cholewa EM.** 2000. Calcium transport and delivery to the xylem in onion (*Allium cepa* L.) roots, 158.
- Clarke BB, Brennan E.** 1989. Differential cadmium accumulation and phytotoxicity in 16 tobacco cultivars. *Japca-the Journal of the Air & Waste Management Association* **39**, 1319-1322.
- Clemens S.** 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**, 475-486.
- Clemens S, Palmgren MG, Krämer U.** 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* **7**, 309-315.
- Clemens S, Aarts MGM, Thomine S, Verbruggen N.** 2013. Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends in Plant Science* **18**, 92-99.
- Corti Monzon G, Pinedo M, Lamattina L, de la Canal L.** 2012. Sunflower root growth regulation: the role of jasmonic acid and its relation with auxins. *Plant Growth Regulation* **66**, 129-136.
- Costa G, Morel JL.** 1993. Cadmium uptake by *Lupinus albus* (L) - Cadmium excretion, a possible mechanism of Cadmium tolerance. *Journal of Plant Nutrition* **16**, 1921-1929.
- Costa G, Morel JL.** 1994. Efficiency of H⁺-Atpase Activity on Cadmium Uptake by 4 Cultivars of Lettuce. *Journal of Plant Nutrition* **17**, 627-637.

- Curie C, Cassin G, Couch D, Divol F, Higuchi K, Le Jean M, Misson J, Schikora A, Czernic P, Mari S.** 2009. Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals of Botany* **103**, 1-11.
- Cushman JH.** 1984. Nutrient transport inside and outside the root rhizosphere - Generalized model. *Soil Science* **138**, 164-171.
- Custos J-M, Moyne C, Treillon T, Sterckeman T.** 2013. Contribution of dissociation of Cd complexes and direct absorption to cadmium root uptake. *Plant Soil* in press.
- DalCorso G, Farinati S, Maistri S and Furini A.** 2008. How plants cope with cadmium: Staking all on metabolism and gene expression. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**, 1268-1280.
- Dauguet S, Lacoste F.** 2013. Les enseignements de 7 années de plan de surveillance des oleagineux. *OCL* **20** (2), 119-123.
- de Dorlodot S, Forster B, Pages L, Price A, Tuberosa R, Draye X.** 2007. Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Trends in Plant Science* **12**, 474-481.
- Degryse F, Smolders E, Parker DR.** 2009. Partitioning of metals (Cd, Co, Cu, Ni, Pb, Zn) in soils: concepts, methodologies, prediction and applications - a review. *European Journal of Soil Science* **60**, 590-612.
- Degryse F, Shahbazi A, Verheyen L, Smolders E.** 2012. Diffusion Limitations in Root Uptake of Cadmium and Zinc, But Not Nickel, and Resulting Bias in the Michaelis Constant. *Plant Physiology* **160**, 1097-1109.
- De Smet I, Vanneste S, Inze D, Beeckman T.** 2006. Lateral root initiation or the birth of a new meristem. *Plant Molecular Biology* **60**, 871-887.
- Di Cagno R, Guidi L, Stefani A, Soldatini GF.** 1999. Effects of cadmium on growth of *Helianthus annuus* seedlings: physiological aspects. *New Phytologist* **144**, 65-71.
- Dong B, Rengel Z, Graham RD.** 1995. Root morphology of wheat genotypes differing in zinc efficiency. *Journal of Plant Nutrition* **18**, 2761-2773.
- Durmaz E, Coruh C, Dinler G, Grusak MA, Peleg Z, Saranga Y, Fahima T, Yazici A, Ozturk L, Cakmak I, Budak H.** 2011. Expression and Cellular Localization of ZIP1 Transporter Under Zinc Deficiency in Wild Emmer Wheat. *Plant Molecular Biology Reporter* **29**, 582-596.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM).** 2011. Statement on tolerable weekly intake for cadmium. *EFSA Journal* **9**, 1975 [1919pp.].
- Enstone DE, Peterson CA.** 1998. Effects of exposure to humid air on epidermal viability and suberin deposition in maize (*Zea mays* L.) roots. *Plant Cell and Environment* **21**, 837-844.

- Enstone DE, Peterson CA.** 2005. Suberin lamella development in maize seedling roots grown in aerated and stagnant conditions. *Plant Cell and Environment* **28**, 444-455.
- Enstone DE, Peterson CA, Ma FS.** 2002. Root endodermis and exodermis: Structure, function, and responses to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation* **21**, 335-351.
- Ennos AR, Crook MJ, Grimshaw C.** 1993. A comparative study of the anchorage systems of himalayan basalm *Impatiens glandulifera* and mature sunflower *Helianthus annuus*. *Journal of Experimental Botany* **44**, 133-146.
- Faessler E, Robinson BH, Stauffer W, Gupta SK, Papritz A, Schulin R.** 2010. Phytomanagement of metal-contaminated agricultural land using sunflower, maize and tobacco. *Agriculture Ecosystems & Environment* **136**, 49-58.
- FAO/WHO.** 1972. Evaluation of mercury, lead, cadmium and the food additives amaranth, diethylpyrocarbonate, and octyl gallate. *FAO Nutrition Meetings Report Series, No. 51A, 1972; WHO Food Additives Series, No. 4, 1972; FAS 4/NMRS 51A-JECFA* **16**, 249-253.
- Farrell RE, McArthur DFE, Van Rees KCJ.** 2005. Net Cd²⁺ flux at the root surface of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) cultivars in relation to cultivar differences in Cd accumulation. *Canadian Journal of Plant Science* **85**, 103-107.
- Ferguson IB, Clarkson DT.** 1976. Ion Uptake in Relation to Development of a Root Hypodermis. *New Phytologist* **77**, 11-14.
- Fiala R, Kenderesova L, Syshchykov DV, Martinka M, Repka V, Pavlovkin J, Ciamporova M.** 2013. Comparison of root growth and morphological responses to cadmium and nickel in two maize cultivars. *Modern Phytomorphology*, 131-137.
- Fitter AH.** 1991. Characteristics and Function of Root Systems. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U, first ed, *Plant roots : the hidden half*, New-York: Marcel Dekker Inc.
- Floriijn PJ, Nelemans JA, Vanbeusichem ML.** 1993. Evaluation of structural and physiological plant characteristics in relation to the distribution of cadmium in maize inbred lines. *Plant and Soil* **154**, 103-109.
- Freixes S, Thibaud MC, Tardieu F, Muller B.** 2002. Root elongation and branching is related to local hexose concentration in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell and Environment* **25**, 1357-1366.
- Fujimaki S, Suzui N, Ishioka NS, Kawachi N, Ito S, Chino M, Nakamura S-i.** 2010. Tracing Cadmium from Culture to Spikelet: Noninvasive Imaging and Quantitative Characterization of Absorption, Transport, and Accumulation of Cadmium in an Intact Rice Plant. *Plant Physiology* **152**, 1796-1806.
- Ghnaya T, Slama I, Messedi D, Grignon C, Ghorbel MH, Abdelly C.** 2007. Effects of Cd²⁺ on K⁺, Ca²⁺ and N uptake in two halophytes *Sesuvium portulacastrum* and *Mesembryanthemum crystallinum*: Consequences on growth. *Chemosphere* **67**, 72-79.

- Goodman AM, Ennos AR.** 1996. A comparative study of the response of the roots and shoots of sunflower and maize to mechanical stimulation. *Journal of Experimental Botany* **47**, 1499-1507.
- Goodman AM, Ennos AR.** 1997. The responses of field-grown sunflower and maize to mechanical support. *Annals of Botany* **79**, 703-711.
- Goodman AM, Ennos AR.** 1998. Responses of the root systems of sunflower and maize to unidirectional stem flexure. *Annals of Botany* **82**, 347-357.
- Goodman AM, Ennos AR.** 1999. The effects of soil bulk density on the morphology and anchorage mechanics of the root systems of sunflower and maize. *Annals of Botany* **83**, 293-302.
- Grant CA, Buckley WT, Bailey LD, Selles F.** 1998. Cadmium accumulation in crops. *Canadian Journal of Plant Science* **78**, 1-17.
- Grant CA, Clarke JM, Duguid S, Chaney RL.** 2008. Selection and breeding of plant cultivars to minimize cadmium accumulation. *Science of The Total Environment* **390**, 301-310.
- Greger M, Landberg T.** 2008. Role of rhizosphere mechanisms in Cd uptake by various wheat cultivars. *Plant and Soil* **312**, 195-205.
- Greger M, Lofstedt M.** 2003. Comparison of uptake and distribution of cadmium in different cultivars of bread and durum wheat. *Crop Science* **44**, 501-507.
- Guerinot ML.** 2000. The ZIP family of metal transporters. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1465**, 190-198.
- Gurpreet S, Agnihotri RK, Singh DK, Rajendra S.** 2013. Effect of Pb and Ni on root development and biomass production of Black gram (*Vigna mungo* L.): overcoming through exogenous nitrogen application. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences (IJACS)* **5**, 1410-1417.
- Hardiman RT, Jacoby B.** 1984. Absorption and translocation of Cd in bush beans (*Phaseolus vulgaris*). *Physiologia Plantarum* **61**, 670-674.
- Harris NS, Taylor GJ.** 2004. Cadmium uptake and translocation in seedlings of near isogenic lines of durum wheat that differ in grain cadmium accumulation. *BMC Plant Biology* **4**, (14 April 2004)-(2014 April 2004).
- Harrison-Murray RS, Clarkson DT.** 1973. Relationship between structural development and the absorption of ions by the root system of Cucurbita pepo. *Planta* **114**, 1-16.
- Hart JJ, Welch RM, Norvell WA, Kochian LV.** 2002. Transport interactions between cadmium and zinc in roots of bread and durum wheat seedlings. *Physiologia Plantarum* **116**, 73-78.

- Hart JJ, Welch RM, Norvell WA, Kochian LV.** 2006. Characterization of cadmium uptake, translocation and storage in near-isogenic lines of durum wheat that differ in grain cadmium concentration. *New Phytologist* **172**, 261-271.
- Hart JJ, Welch RM, Norvell WA, Sullivan LA, Kochian LV.** 1998. Characterization of cadmium binding, uptake, and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars. *Plant Physiology* **116**, 1413-1420.
- He JL, Qin JJ, Long LY, Ma YL, Li H, Li K, Jiang XN, Liu TX, Polle A, Liang ZS, Luo ZB.** 2011. Net cadmium flux and accumulation reveal tissue-specific oxidative stress and detoxification in *Populus x canescens*. *Physiologia Plantarum* **143**, 50-63.
- He JY, Ren YF, Wang FJ, Pan XB, Zhu C, Jiang DA.** 2009. Characterization of Cadmium Uptake and Translocation in a Cadmium-Sensitive Mutant of Rice (*Oryza sativa* L. ssp *japonica*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **57**, 299-306.
- He JY, Zhu C, Ren YF, Jiang DA, Sun ZX.** 2007. Root morphology and cadmium uptake kinetics of the cadmium-sensitive rice mutant. *Biologia Plantarum* **51**, 791-794.
- 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.
- Hoagland DR, Arnon DI.** 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California Agricultural Experiment Station* **347**, 1-32.
- Hodge A.** 2004. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytologist* **162**, 9-24.
- Homma Y, Hirata H.** 1984. Kinetics of Cadmium and Zinc-Absorption by Rice Seedling Roots. *Soil Science and Plant Nutrition* **30**, 527-532.
- IARC.** 1993. Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans - Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry Vol. 58. Lyon, France International Agency for Research on Cancer, 119-237.
- Ishikawa S, Suzui N, Ito-Tanabata S, Ishii S, Igura M, Abe T, Kuramata M, Kawachi N, Fujimaki S.** 2011. Real-time imaging and analysis of differences in cadmium dynamics in rice cultivars (*Oryza sativa*) using positron-emitting Cd-107 tracer. *BMC Plant Biology* **11**.
- Jiang XJ, Luo YM, Zhao QG, Baker AJM, Christie P, Wong MH.** 2003. Soil Cd availability to Indian mustard and environmental risk following EDTA addition to Cd-contaminated soil. *Chemosphere* **50**, 813-818.
- Jones DL.** 1998. Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant and Soil* **205**, 25-44.

- Jones KC, Symon CJ, Johnston AE.** 1987. Retrospective analysis of an archived soil collection. 2. Cadmium. *Science of The Total Environment* **67**, 75-89.
- Jungk A, Claassen N.** 1997. Ion diffusion in the soil-root system. In: Sparks DL, ed. *Advances in Agronomy, Vol 61*, Vol. 61, 53-110.
- Kafkafi U.** 1991. Root Growth Under Stress: Salinity. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U, first ed, *Plant roots : the hidden half*, New-York: Marcel Dekker Inc.
- Kannan S.** 1986. Physiology of foliar uptake of inorganic nutrients. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Plant Sciences* **96**, 457-470.
- Kaschl A, Romheld V, Chen Y.** 2002. Cadmium binding by fractions of dissolved organic matter and humic substances from municipal solid waste compost. *Journal of Environmental Quality* **31**, 1885-1892.
- Kim YY, Yang YY, Lee Y.** 2002. Pb and Cd uptake in rice roots. *Physiologia Plantarum* **116**, 368-372.
- Kopittke PM, Blamey FPC, Asher CJ, Menzies NW.** 2010. Trace metal phytotoxicity in solution culture: a review. *Journal of Experimental Botany* **61**, 945-954.
- Krishnamurti GSR, Huang PM, Kozak LM, Rostad HPW, Van Rees KCJ.** 1997. Distribution of cadmium in selected soil profiles of Saskatchewan, Canada: Speciation and availability. *Canadian Journal of Soil Science* **77**, 613-619.
- Laporte MA, Denaix L, Pagès L, Sterckeman T, Flénet F, Dauguet S, Nguyen C.** 2013. Longitudinal variation in cadmium influx in intact first order lateral roots of sunflower (*Helianthus annuus*. L). *Plant and Soil*, 1-15.
- Lasat MM, Baker AJM, Kochian LV.** 1996. Physiological characterization of root Zn^{2+} absorption and translocation to shoots in Zn hyperaccumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*. *Plant Physiology* **112**, 1715-1722.
- Lehmann H, Stelzer R, Holzamer S, Kunz U, Gierth M.** 2000. Analytical electron microscopical investigations on the apoplastic pathways of lanthanum transport in barley roots. *Planta* **211**, 816-822.
- Lemaire G, van Oosterom E, Sheehy J, Jeuffroy MH, Massignam A, Rossato L.** 2007. Is crop N demand more closely related to dry matter accumulation or leaf area expansion during vegetative growth? *Field Crops Research* **100**, 91-106.
- Li L, Liu X, Peijnenburg WJGM, Zhao J, Chen X, Yu J, Wu H.** 2012. Pathways of cadmium fluxes in the root of the halophyte *Suaeda salsa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **75**, 1-7.
- Li YM, Chaney RL, Schneiter AA, Miller JF, Elias EM, Hammond JJ.** 1997. Screening for low grain cadmium phenotypes in sunflower, durum wheat and flax. *Euphytica* **94**, 23-30.

- Li ZB, Shuman LM.** 1996. Heavy metal movement in metal-contaminated soil profiles. *Soil Science* **161**, 656-666.
- Lin Z, Schneider A, Sterckeman T, Nguyen C.** 2013. Ranking of factors influencing the root absorption of Cadmium in agricultural soils using a global sensitivity analysis of a mechanistic model. *Plant and Soil*, En révision.
- Lipiec J, Horn R, Pietrusiewicz J, Siczek A.** 2012. Effects of soil compaction on root elongation and anatomy of different cereal plant species. *Soil & Tillage Research* **121**, 74-81.
- Liu J, Li KQ, Xu JK, Liang JS, Lu XL, Yang JC, Zhu QS.** 2003. Interaction of Cd and five mineral nutrients for uptake and accumulation in different rice cultivars and genotypes. *Field Crops Research* **83**, 271-281.
- Loades KW, Bengough AG, Bransby MF, Hallett PD.** 2013. Biomechanics of nodal, seminal and lateral roots of barley: effects of diameter, waterlogging and mechanical impedance. *Plant and Soil* **370**, 407-418.
- Lombi E, Tearall KL, Howarth JR, Zhao FJ, Hawkesford MJ, McGrath SP.** 2002. Influence of iron status on cadmium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology* **128**, 1359-1367.
- Lopez de Andrade SA, Dias da Silveira AP, Jorge RA, de Abreu MF.** 2008. Cadmium accumulation in sunflower plants influenced by arbuscular mycorrhiza. *International Journal of Phytoremediation* **10**, 1-13.
- Lux A, Martinka M, Vaculík M, White PJ.** 2011. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *Journal of Experimental Botany* **62**, 21-37.
- Lux A, Sottnikova A, Opatrna J, Greger M.** 2004. Differences in structure of adventitious roots in *Salix* clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity. *Physiologia Plantarum* **120**, 537-545.
- Maksimovic I, Kastori R, Krstic L, Lukovic J.** 2007. Steady presence of cadmium and nickel affects root anatomy, accumulation and distribution of essential ions in maize seedlings. *Biologia Plantarum* **51**, 589-592.
- Marschner H.** 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. 2nd ed.
- McBride MB, Richards BK, Steenhuis T, Russo JJ, Sauve S.** 1997. Mobility and solubility of toxic metals and nutrients in soil fifteen years after sludge application. *Soil Science* **162**, 487-500.
- McCully ME.** 1999. Roots in soil: Unearthing the complexities of roots and their rhizospheres. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 695-+.

- McLaughlin MJ, Parker DR, Clarke JM.** 1999. Metals and micronutrients – food safety issues. *Field Crops Research* **60**, 143-163.
- McMichael BL, Quisenberry JE.** 1993. The Impact of the Soil Environment on the Growth of Root Systems. *Environmental and Experimental Botany* **33**, 53-61.
- Melchior W and Steudle E.** 1993. Water transport in onion (*Allium cepa* L) roots - Changes of axial and radial hydraulic conductivities during root development. *Plant Physiology* **101**, 1305-1315.
- Meyer CJ, Seago JL, Jr., Peterson CA.** 2009. Environmental effects on the maturation of the endodermis and multiseriate exodermis of *Iris germanica* roots. *Annals of Botany* **103**, 687-702.
- Miyamoto N, Steudle E, Hirasawa T, Lafitte R.** 2001. Hydraulic conductivity of rice roots. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1835-1846.
- Mori S, Uruguchi S, Ishikawa S, Arao T.** 2009. Xylem loading process is a critical factor in determining Cd accumulation in the shoots of *Solanum melongena* and *Solanum torvum*. *Environmental and Experimental Botany* **67**, 127-132.
- Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM.** 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters* **8**, 199-216.
- Niu Z-x, Sun L-n, Sun T-h, Li Y-s, Wang H.** 2007. Evaluation of phytoextracting cadmium and lead by sunflower, ricinus, alfalfa and mustard in hydroponic culture. *Journal of Environmental Sciences-China* **19**, 961-967.
- Nolan AL, Zhang H, McLaughlin MJ.** 2005. Prediction of zinc, cadmium, lead, and copper availability to wheat in contaminated soils using chemical speciation, diffusive gradients in thin films, extraction, and isotopic dilution techniques. *Journal of Environmental Quality* **34**, 496-507.
- Nwoke OC, Diels J, Abaidoo R, Nziguheba G, Merckx R.** 2008. Organic acids in the rhizosphere and root characteristics of soybean (*Glycine max*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) in relation to phosphorus uptake in poor savanna soils. *African Journal of Biotechnology* **7**, 3617-3624.
- Nye PH.** 1973. The relation between the radius of a root and its nutrient-absorbing power α . Some theoretical considerations. *Journal of Experimental Botany* **24**, 783-786.
- Otoole JC, Bland WL.** 1987. Genotypic variation in crop plant-root systems. *Advances in Agronomy* **41**, 91-145.
- Page V, Feller U.** 2005. Selective transport of zinc, manganese, nickel, cobalt and cadmium in the root system and transfer to the leaves in young wheat plants. *Annals of Botany* **96**, 425-434.

- Pages L, Pellerin S.** 1994. Evaluation of parameters describing the root system architecture of field-grown maize plants (*Zea mays* L.). 2. Density, length, and branching of first order lateral roots. *Plant and Soil* **164**, 169-176.
- Pages L, Vercambre G, Drouet JL, Lecompte F, Collet C, Le Bot J.** 2004. Root Typ: a generic model to depict and analyse the root system architecture. *Plant and Soil* **258**, 103-119.
- Pagès L, Moreau D, Sarlikioti V, Boukcim H, Nguyen C.** 2012. ArchiSimple: a Parsimonious Model of the Root System Architecture, in: Proceedings. Presented at the IEEE 4th International Symposium on Plant Growth Modeling, Simulation, Visualization and Applications ShangHai (China).
- Pellerin S, Pages L.** 1994. Evaluation of parameters describing the root system architecture of field-grown maize plants (*Zea mays* L.). 1. Elongation of seminal and nodal roots and extension of their branched zone. *Plant and Soil* **164**, 155-167.
- Pence NS, Larsen PB, Ebbs SD, Letham DLD, Lasat MM, Garvin DF, Eide D, Kochian LV.** 2000. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 4956-4960.
- Perilli P, Mitchell LG, Grant CA, Pisante M.** 2010. Cadmium concentration in durum wheat grain (*Triticum turgidum*) as influenced by nitrogen rate, seeding date and soil type. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **90**, 813-822.
- Perriguet J, Sterckeman T, Morel JL.** 2008. Effect of rhizosphere and plant-related factors on the cadmium uptake by maize (*Zea mays* L.). *Environmental and Experimental Botany* **63**, 333-341.
- Perumalla CJ, Peterson CA, Enstone DE.** 1990. A survey of angiosperm species to detect hypodermal Casparian bands.1. Roots with a uniseriate hypodermis and epidermis. *Botanical Journal of the Linnean Society* **103**, 93-112.
- Pineros MA, Shaff JE, Kochian LV.** 1998. Development, characterization, and application of a cadmium-selective microelectrode for the measurement of cadmium fluxes in roots of *Thlaspi* species and wheat. *Plant Physiology* **116**, 1393-1401.
- Pinheiro J, Douglas Bates, Saikat DebRoy, Deepayan Sarkar and the R Development Core Team.** 2012. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-105
- Pinto AP, Mota AM, de Varennes A, Pinto FC.** 2004. Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. *Science of The Total Environment* **326**, 239-247.
- Pitman MG.** 1977. Ion transport into xylem. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **28**, 71-88.

- Poschenrieder C, Tolra R, Barcelo J.** 2006. Can metals defend plants against biotic stress? *Trends in Plant Science* **11**, 288-295.
- Rascio N, Dallavecchia F, Ferretti M, Merlo L, Ghisi R.** 1993. Some effects of cadmium on maize plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **25**, 244-249.
- Rascio N, Navari-Izzo F.** 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science* **180**, 169-181.
- Rasmussen PE, Goulding KWT, Brown JR, Grace PR, Janzen HH, Korschens M.** 1998. Agroecosystem - Long-term agroecosystem experiments: Assessing agricultural sustainability and global change. *Science* **282**, 893-896.
- R Development Core Team.** 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Redjala T, Sterckeman T, Louis Morel J.** 2010. Determination of the different components of cadmium short-term uptake by roots. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **173**, 935-945.
- Redjala T, Sterckeman T, Morel JL.** 2009. Cadmium uptake by roots: Contribution of apoplast and of high- and low-affinity membrane transport systems. *Environmental and Experimental Botany* **67**, 235-242.
- Redjala T, Zelko I, Sterckeman T, Legue V, Lux A.** 2011. Relationship between root structure and root cadmium uptake in maize. *Environmental and Experimental Botany* **71**, 241-248.
- Robards AW, Jackson SM, Clarkson DT, Sanderson J.** 1973. The structure of barley roots in relation to the transport of ions into the stele. *Protoplasma* **77**, 291-311.
- Robert M.** 1995. Soil, an environmental interface. *Comptes Rendus de l'Academie d'Agriculture de France* **81**, 93-105.
- Rodda MS, Li G, Reid RJ.** 2011. The timing of grain Cd accumulation in rice plants: the relative importance of remobilisation within the plant and root Cd uptake post-flowering. *Plant and Soil* **347**, 105-114.
- Ross SM.** 1995. *Toxic Metals in Soil-Plant Systems*. Wiley, Chichester, Royaume-Uni.
- Rubio G, Sorgona A, Lynch JP.** 2004. Spatial mapping of phosphorus influx in bean root systems using digital autoradiography. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2269-2280.
- Sadras VO, Hall AJ, Trapani N, Vilella F.** 1989. Dynamics of Rooting and Root-Length - Leaf-Area Relationships as Affected by Plant-Population in Sunflower Crops. *Field Crops Research* **22**, 45-57.

- Salam AK, 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.
- Sauve S, Norvell WA, McBride M, Hendershot W.** 2000. Speciation and complexation of cadmium in extracted soil solutions. *Environmental Science & Technology* **34**, 291-296.
- Seiler GJ.** 1994. Primary and Lateral Root Elongation of Sunflower Seedlings. *Environmental and Experimental Botany* **34**, 409-418.
- Seiler GJ.** 1998. Influence of temperature on primary and lateral root growth of sunflower seedlings. *Environmental and Experimental Botany* **40**, 135-146.
- Seiler GJ.** 2008. Root growth of interspecific sunflower seedlings derived from wild perennial sunflower species. *Canadian Journal of Plant Science* **88**, 705-712.
- Selles F, Clarke JM, Zentner RP, Campbell CA.** 2003. Effects of source and placement of phosphorus on concentration of cadmium in the grain of two durum wheat cultivars. *Canadian Journal of Plant Science* **83**, 475-482.
- Shutsrirung A, Chromkaew Y, Pathom-Aree W, Choonluchanon S, Boonkerd N.** 2013. Diversity of endophytic actinomycetes in mandarin grown in northern Thailand, their phytohormone production potential and plant growth promoting activity. *Soil Science and Plant Nutrition* **59**, 322-330.
- Simon L.** 1998. Cadmium accumulation and distribution in sunflower plant. *Journal of Plant Nutrition* **21**, 341-352.
- Smolders E.** 2001. Cadmium uptake by plants. *International journal of occupational medicine and environmental health* **14**, 177-183.
- SOGREAH.** 2007. Bilan des flux de contaminants entrant sur les sols agricoles de France métropolitaine. Bilan qualitatif de la contamination par les éléments tracés métalliques et les composés tracés organiques et application quantitative pour les éléments traces métalliques (Rapport final). In: Ademe, ed.
- Sterckeman T, Perriguet J, Cael M, Schwartz C, Morel JL.** 2004. Applying a mechanistic model to cadmium uptake by *Zea mays* and *Thlaspi caerulescens*: Consequences for the assessment of the soil quantity and capacity factors. *Plant and Soil* **262**, 289-302.
- Stolt P, Asp H, Hultin S.** 2006. Genetic variation in wheat cadmium accumulation on soils with different cadmium concentrations. *Journal of Agronomy and Crop Science* **192**, 201-208.
- Strobel BW, Borggaard OK, Hansen HCB, Andersen MK, Raulund-Rasmussen K.** 2005. Dissolved organic carbon and decreasing pH mobilize cadmium and copper in soil. *European Journal of Soil Science* **56**, 189-196.

- Su D, Xing J, Jiao W, Wong W.** 2009. Cadmium uptake and speciation changes in the rhizosphere of cadmium accumulator and non-accumulator oilseed rape varieties. *Journal of Environmental Sciences* **21**, 1125-1128.
- Sugiyama M, Ae N, Arao T.** 2007. Role of roots in differences in seed cadmium concentration among soybean cultivars-proof by grafting experiment. *Plant and Soil* **295**, 1-11.
- Sugiyama M, Ae N, Hajika M.** 2011. Developing of a simple method for screening soybean seedling cadmium accumulation to select soybean genotypes with low seed cadmium. *Plant and Soil* **341**, 413-422.
- Sukumar P, Legue V, Vayssieres A, Martin F, Tuskan GA, Kalluri UC.** 2013. Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant-microorganism interactions. *Plant Cell and Environment* **36**, 909-919.
- Tanaka K, Fujimaki S, Fujiwara T, Yoneyama T, Hayashi H.** 2007. Quantitative estimation of the contribution of the phloem in cadmium transport to grains in rice plants (*Oryza sativa* L.). *Soil Science and Plant Nutrition* **53**, 72-77.
- Tarradellas J, Bitton G, Russel D.** 1997. *Soil Ecotoxicology*.
- Tatsumi J, Yamauchi A, Kono Y.** 1989. Fractal analysis of plant root systems. *Annals of Botany* **64**, 499-503.
- Thomine S, Wang R C, Ward J M, Crawford N M and Schroeder J I.** 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 4991-4996.
- Tremel-Schaub A, Feix I.** 2005. *Contamination des sols, Transferts des sols vers les plantes*.
- Uraguchi S, Mori S, Kuramata M, Kawasaki A, Arao T, Ishikawa S.** 2009. Root-to-shoot Cd translocation via the xylem is the major process determining shoot and grain cadmium accumulation in rice. *Journal of Experimental Botany* **60**, 2677-2688.
- Vaculik M, Konlechner C, Langer I, Adlassnig W, Puschenreiter M, Lux A, Hauser M-T.** 2012. Root anatomy and element distribution vary between two *Salix caprea* isolates with different Cd accumulation capacities. *Environmental Pollution* **163**, 117-126.
- Van der Vliet L, Peterson C, Hale B.** 2007. Cd accumulation in roots and shoots of durum wheat: the roles of transpiration rate and apoplastic bypass. *Journal of Experimental Botany* **58**, 2939-2947.
- Vangronsveld J, Herzig R, Weyens N, Boulet J, Adriaensen K, Ruttens A, Thewys T, Vassilev A, Meers E, Nehnevajova E, van der Lelie D, Mench M.** 2009. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research* **16**, 765-794.

- Verbruggen N, Hermans C and Schat H.** 2009. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist* **181**, 759-776.
- Waisel Y, and Eshel A.** 1991. Multifunctional behavior of Various Constituents of One Root System. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U, first ed, *Plant roots : the hidden half*, New-York: Marcel Dekker Inc.
- Wang P, Zhou DM, Peijnenburg W, Li LZ, Weng NY.** 2006. Evaluating mechanisms for plant-ion (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} or Ni^{2+}) interactions and their effectiveness on rhizotoxicity. *Plant and Soil* **334**, 277-288.
- Weaver JE.** 1926. *Root Development of Field Crops*.
- Weber M, Harada E, Vess C, von Roepenack-Lahaye E, Clemens S.** 2004. Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. *Plant Journal* **37**, 269-281.
- Xie YH, Hu QC, Hong JP, Zhang TQ.** 2013. Effects of Bacterial and Fungal Inoculants in a Loess Soil Amended with Various Phosphorus Sources on Pea Growth and Phosphorus Uptake. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **44**, 2008-2018.
- Yu W-C, Lee J-T, Tsai B-H.** 2011. Effects on Sunflower Growth Induced by Adding Different Soil Amendments to Cadmium-Contaminated Soil. In: Hu J, ed. *Advances in Biomedical Engineering*, 74-79.
- Zimmermann HM, Steudle E.** 1998. Apoplastic transport across young maize roots: effect of the exodermis. *Planta* **206**, 7-19.
- Zobel RW.** 1991. Genetic Control of Root Systems. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U, first ed, *Plant roots : the hidden half*, New-York: Marcel Dekker Inc.
- Zobel RW.** 1983. Midwest soybean rhizobotanical survey. *Soybean Genetics Newsletter* **10**, 96-101.
- Zou J, Xu P, Lu X, Jiang WS, Liu DH.** 2008. Accumulation of cadmium in three sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivars. *Pakistan Journal of Botany* **40**, 759-765.

Annexe
Article paru dans Plant and soil

Longitudinal variation in cadmium influx in intact first order lateral roots of sunflower (*Helianthus annuus*. L)

Marie A. Laporte · Laurence Denaix · Loïc Pagès ·
Thibault Sterckeman · Francis Flénet ·
Sylvie Danguet · Christophe Nguyen

Received: 1 February 2013 / Accepted: 30 April 2013 / Published online: 22 May 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract

Aims Contamination of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by cadmium (Cd) is a concern for food and feed safety as this species accumulates Cd to a greater extent than other crops. We examined the relationships between root architecture and Cd²⁺ uptake by roots. **Methods** We determined and mathematically modelled the longitudinal variation of Cd²⁺ influx in first order roots of sunflower grown in hydroponics by using short-term exposure to ¹⁰⁹Cd-labelled solutions (0.8 to 500 nM). Thereafter, by taking into account the longitudinal variation of the influx, we simulated the uptake of Cd²⁺ for 24 h by cohorts of roots characterised by various architectural characteristics.

Results Cd²⁺ influx at the root tip was on average 2.9 times that of the basal region close to the taproot. The simulations indicated that the total Cd²⁺ uptake by root cohorts mainly depends on 1/ the root diameter and the number of roots, 2/ the value of the Cd²⁺ influx at the basal region 3/ the stronger influx at the root tip.

Conclusion Considering a higher Cd²⁺ influx at the root tip may be important to understand the relationship between root architecture and Cd²⁺ uptake by the root system.

Keywords Cadmium · Influx · Longitudinal variation · Root architecture · Sunflower

Responsible Editor: Henk Schat.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11104-013-1756-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. A. Laporte · L. Denaix · C. Nguyen (✉)
INRA, UMR1220 TCEM,
71 avenue Edouard Bourlaux CS20032,
33882 Villenave d'Omon, France
e-mail: Christophe.Nguyen@bordeaux.inra.fr

M. A. Laporte · L. Denaix · C. Nguyen
Univ. Bordeaux, UMR1220 TCEM,
33882 Villenave d'Omon, France

L. Pagès
INRA - UR 1115 PSH, Domaine St Paul,
Site Agroparc, CS 40509,
84914 Avignon cedex 9, France

T. Sterckeman
Laboratoire Sols et Environnement,
Université de Lorraine - INRA,
2 avenue de la Forêt de Haye B.P. 172,
54505 Vandœuvre-lès-Nancy cedex, France

F. Flénet
CETIOM, 1 avenue Lucien Brétignères B.P. 4,
78850 Thiverval Grignon, France

S. Danguet
CETIOM, 11 rue Monge, Parc Industriel,
33600 Pessac, France

Introduction

Cadmium is a trace element naturally occurring in soils but due to anthropogenic inputs, mainly phosphate fertilizers (Adriano 2001), Cd tends to accumulate in agricultural soils (Rasmussen et al. 1998). Soil Cd^{2+} is absorbed by plant roots and partly transferred aboveground. Crop contamination by Cd is a serious concern for food and feed safety. This is particularly true for sunflower (*Helianthus annuus* L.), which is known to accumulate relatively high levels of Cd as compared to other crops such as maize (Grant et al. 2008) and especially in edible parts (Ansari et al. 2009). Although there might be a significant contribution of atmospheric fallout in some conditions, Cd found in crops mainly originates from the uptake by the root system (Smolders 2001). Therefore, understanding the uptake of Cd^{2+} by roots is particularly important, although it is not the only mechanism that determines the concentration of this contaminant in the edible parts. Indeed, availability of soil Cd^{2+} (McLaughlin et al. 1999) and metal partitioning between plant organs (Clemens et al. 2002) are also crucial.

It is generally recognized that Cd^{2+} uptake by roots is mediated by energy-driven transporters (Lux et al. 2011) and an apoplastic route has also been suggested (Redjala et al. 2009; Redjala et al. 2010). However, until now, no specific transporters have been identified for Cd^{2+} , which is assumed to enter the symplast by Zn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} transporters (Clemens 2001). By using specific microelectrodes, in *Triticum aestivum*, *Noccaea caerulea* (previously called *Thlaspi*), *Sueda salsa* and *Populus canescens*, Cd^{2+} influx was demonstrated to strongly decrease with the distance from the root apex (Pineros et al. 1998; Farrell et al. 2005; He et al. 2011; Li et al. 2012). This longitudinal variation in Cd^{2+} influx could result in higher Cd^{2+} uptake in strongly branched root systems, as it was observed in two wheat cultivars (Berkelaar and Hale 2000). In sunflower, to our knowledge, no such longitudinal variation in Cd^{2+} influx has been reported. Even the parameters for the Michaelis-Menten kinetics could not be found.

Therefore, this study had two objectives: first, to test the hypothesis of a longitudinal variation in Cd^{2+} influx along sunflower roots (*Helianthus annuus* L. c.v. ES BIBA), for Cd concentrations in the range commonly found in French agricultural soils; second,

to examine the consequence of a longitudinal variation in Cd^{2+} influx on the potential total Cd^{2+} uptake, depending on the variability in root architecture. For these purposes, Cd^{2+} influx was mapped in first order lateral roots that emerge from the taproot in sunflower by using short term exposure to the radioactive tracer ^{109}Cd . Modelling was used to simulate the Cd^{2+} uptake by the cohort of first order lateral roots of a virtual sunflower root system by combining the root properties for Cd^{2+} uptake with the variability in the cohort characteristics: number of roots, distribution of their length, average root diameter. Model analysis was performed to better understand the expected impact on Cd^{2+} uptake of the root characteristics, i.e. the longitudinal variation in Cd^{2+} influx on one hand, and the variability in root architecture on the other hand.

Materials and methods

Plant cultivation

Seeds of sunflower (*Helianthus annuus* L. c.v. ES BIBA) were germinated on wet paper in Petri dishes in the dark at 26 °C for 72 h. Then, the seedlings were transferred into hydroponics containers containing 2 L of 1/4 strength Hoagland nutrient solution (Hoagland and Arnon 1950) adjusted at pH 6.7 and aerated through air bubbling. The plants were grown in a greenhouse. The air temperature was maintained within the 20–35 °C range. The hydroponics containers were covered with aluminium foil to limit light diffusion into the root compartment. One third of the nutrient solution was automatically renewed every day by supplying fresh solution at the bottom of the container and by overflowing of the excess. Plants with 10–12 leaves were used for the experiments (28 days or 380 growing degree days after germination, 6° basis).

Longitudinal movement of ^{109}Cd during the exposure of first order lateral roots to labelled Cd (Experiment 1)

Mapping the longitudinal root influx of Cd^{2+} by using the radioisotope ^{109}Cd requires that the labelled Cd^{2+} absorbed by a given root segment does not significantly move longitudinally during the duration of labelling. Therefore, a preliminary experiment was conducted to check this. The experiment consisted in bathing a root segment in a 500 nM Cd solution labelled with

radioactive ^{109}Cd and in checking that no significant radioactivity was found in the adjacent root segments at the end of the exposure.

A single first order lateral root still attached to the plant was stretched out on a Parafilm™ foil and five stainless steel pins were placed perpendicularly to the root at 1 cm interval, either starting at the root tip or before the branching zone. Then, 40 μL -drops of a 500 nM Cd buffered solution (5 mM MES, 0.2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 500 nM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) were deposited on the junction between the root and the pins (Fig. 1). The Cd concentration in the solution was analysed by atomic absorption spectrometry (AAS). Speciation modelling by using Visual MINTEQ 3.0 software indicated that Cd^{2+} activity represented 94 % of Cd of the total Cd in solution. The solution spread over ~ 0.5 cm, leaving another 0.5 cm of “bare” root before the next drop. Only one of the five drops was labelled with ^{109}Cd (approximately 23 kBq per segment). In the root tip zone, the labelled solution was deposited at the root apex and was then followed by four unlabelled drops. In the basal zone, the labelled solution was the middle drop, surrounded by two unlabelled drops on every two sides (Fig. 1). The untreated root part was covered with a moist paper, checking it did not touch the drops. Air temperature was 20 °C and plants were exposed to light (500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photosynthetically active radiations at the top of the plant). The drops were left 5, 10, or 20 min before the solutions were withdrawn by pipetting and the five ~ 1 cm long root segments were

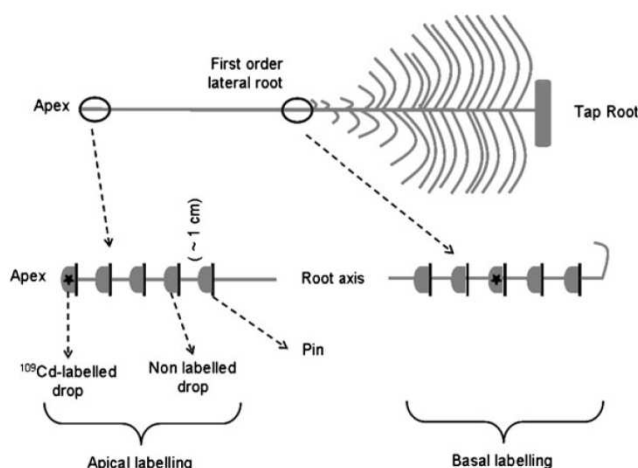
sampled by cutting the root. They were individually placed in two successive desorption baths (5 mM MES, 5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 50 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) at 2 °C for 5 min (Buckley et al. 2010). Each root segment was mineralized by wet digestion (nitric acid solution 75 % + perchloric acid solution 75 %, 1:1) at 60 °C, and the radioactivity was determined by liquid scintillation counting (TRI-CARB 2100TR, Packard).

There were six treatments (three durations for ^{109}Cd exposure $\times$ two regions of labelling) arranged in a completely randomized block design with one plant being one block. Hence, six individual roots from the same plant were selected to perform the treatments. There were eight plants. A three-way analysis of variance was used to test the effect of the block, duration and region of exposure to ^{109}Cd on the percentage of radioactivity exported from the labelled root segment.

Mapping of the longitudinal variation in ^{109}Cd influx in first order lateral roots of sunflower (Experiment 2)

This experiment aimed at characterising the longitudinal variation in ^{109}Cd influx along the first order lateral roots in sunflower. The whole root system of 28 intact plants were individually bathed for 20 min in 2 L of an aerated Cd-radiolabelled solution (5 mM MES, 0.2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) with Cd concentrations as $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ranging from 0.8 to 500 nM (radiolabelled with 0.18 to 5 MBq L^{-1} ^{109}Cd , respectively), the Cd^{2+} activity represented 94 % of the total Cd (speciation

Fig. 1 Schematic representation of the protocol for studying the axial transfer of ^{109}Cd in first order lateral roots of sunflower



modelling with Visual MINTEQ 3.0). The Cd concentrations in the solutions were determined by AAS before the experiment, and from the radioactivity remaining after root bathing, assuming that the specific activity of the solution did not change. The air temperature was 20 °C and the plants were exposed to light ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photosynthetically active radiations at the top of the plant). At the end of the exposure, the root system of each plant, still attached to aerial part, was immersed for 5 min into two successive 2 L desorption baths at 2 °C as previously described. One representative first order lateral root per plant was detached from the tap root and divided into seven root samples according to the pattern of Fig. 2. Second order lateral roots emerging from the same first order lateral root were pooled to make a unique sample. All root samples were scanned, by using a double light scanner to avoid shadows (EPSON EXPRESSION 10000XL), and the images were analysed by using Winrhizo software (Winrhizo pro V.2005a) to determine the root length and diameter. The root samples were digested by wet digestion to determine their radioactivity by liquid scintillation counting as described before.

Assuming no isotopic discrimination for the root uptake of ^{109}Cd , the influx of Cd^{2+} for each of the six root segments described in Fig. 2 was calculated from the radioactivity measured in the root tissues and from the root length and diameter obtained from the scans considering roots as cylinders.

For the Cd concentrations used, the simplification of Michaelis-Menten kinetics by a linear model was first checked (Nye 1973):

$$I = \text{RPCd} \quad (1)$$

where I is the Cd^{2+} influx ($\text{nmol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$), C_{Cd} is the Cd concentration in the root bathing solution (nmol L^{-1})

and RP is the root absorbing power, *i.e.* the root specific influx capacity, for Cd^{2+} uptake ($\text{L cm}^{-2} \text{s}^{-1}$). A linear mixed effect model was used to test the effect of the position of the segment (class variable) on the root absorbing power value (longitudinal data) for each root. This mixed effect model enabled to distinguish RP variations depending on the segment position (the fixed effects) from the random variation of RP profiles between plants (the random effects). We used backward contrast coding to test for significant differences between two subsequent segments.

Modelling of the root absorbing power for Cd^{2+} uptake by first order lateral roots

For root regions one to six of the first order lateral roots, three mathematical models were tested to describe the changes in RP as a function of the distance to the root apex:

$$\text{Model 1 : } \text{RP}_{(x)} = ae^{-bx} + ce^{-dx} \quad (2)$$

$$\text{Model 2 : } \text{RP}_{(x)} = ae^{-bx} + c \quad (3)$$

$$\text{Model 3 : } \text{RP}_{(x)} = ax^{-b} + c \quad (4)$$

where a , b , c , d are parameters estimated for each model and x is the distance between the root tip and the middle of the root segment (cm). The models were fitted by plant (longitudinal data) by using a non-linear mixed effect model so that the mean parameter estimates (fixed effects) could be separated from the between plant (root) variations (random effects). Models were compared by using the Bayesian information criteria that assesses goodness of fit while penalizing the model for the number of parameters.

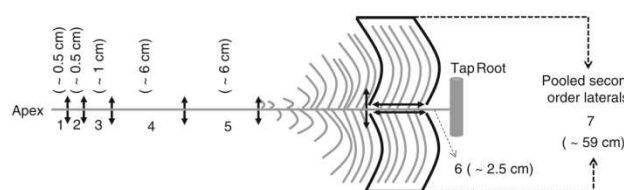


Fig. 2 Schematic representation of the root segment sampling pattern for mapping ^{109}Cd influx in first order lateral roots of sunflower. Double head arrows indicate cutting positions. A total of seven samples were collected per first order lateral root.

Samples 1 to 5 corresponded to the unbranched zone. Sample 6 was the root axis close to the tap root from which emerged the second order lateral roots pooled as sample 7

Simulation of Cd^{2+} uptake by the second order lateral roots

The objective was to test if the root absorbing power model established for the first order lateral roots was also valid for the second order lateral roots. Therefore, the uptake of Cd^{2+} by each cohort of the second order lateral roots (as those present in sample #7, Fig. 2) was simulated by using the 'best fit' root absorbing power model ($RP_{(x)} = ae^{-bx} + c$), parameterized for the first order lateral roots. The kinetics of Cd^{2+} influx by each second order lateral root is given by:

$$\frac{dQ_i}{dt} = \int_{x=0}^{x=L_i} (ae^{-bx} + c) \pi D_i C_{Cd} dx \quad (5)$$

where Q_i is the quantity of Cd^{2+} absorbed (nmol), t is time (s), x is the distance from the root apex (cm), a ($\text{L cm}^{-2} \text{s}^{-1}$), b (cm^{-1}) and c ($\text{L cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) are the parameters of the root absorbing power model, D_i (cm) and L_i (cm) are the average diameter and the length of the second order lateral root, and C_{Cd} is the Cd concentration (nmol L^{-1}).

If N is the total number of second order lateral roots sampled from a given first order lateral root (Fig. 2), the total Cd^{2+} absorbed (Q) by second order lateral roots is given by the sum on all roots of the integrated uptakes (over space and time of Eq. 5):

$$Q = \pi C_{Cd} t \sum_{i=1}^{i=N} D_i \left(cL_i + \frac{a}{b} (1 - e^{-bL_i}) \right) \quad (6)$$

where the exposure time $t=20$ min. Then, the simulated uptake of Cd^{2+} by the second order lateral root cohorts were compared to experimental observations.

Sensitivity analysis of the Cd^{2+} uptake model for first order lateral roots in sunflower

The aim of this study was to investigate the relative influence on the total Cd^{2+} uptake of the longitudinal variation in the root absorbing power on one hand, and of the architectural variability in first order lateral roots (number, average diameter, distribution of length) on the other hand. Additionally, we examined possible interactions between these variables. Therefore, we simulated

the Cd^{2+} uptake by cohorts of first order lateral roots exposed for 1 day to a constant Cd concentration of 20 nM. Second order lateral roots were not included in the model.

Each cohort of first order lateral roots differed for the total number of roots (N_r), for the root diameter (D), for the characteristics of the distribution (DL) of the individual root lengths L_i , and for the parameters of the root absorbing power model (a , b , c). Then, the total Cd^{2+} absorbed by a cohort of first order lateral roots is:

$$Q = \pi D C_{Cd} t \sum_{i=1}^{i=N_r} \left(cL_i + \frac{a}{b} (1 - e^{-bL_i}) \right) \quad (7)$$

Because the root absorbing power model $RP_{(x)} = ae^{-bx} + c$ has the constraint $a > c$, the parameter c and the difference $(a-c)$ (parameter a_c) were considered instead of combining independently parameters a and c . Table 1 shows the range for the six parameters that were tested in the sensitivity analysis.

The range for parameters a_c , c , and D were derived from our work (minimum and maximum of the observed values). For parameter b , which determines the curvature of the root absorbing power profile, the lower value corresponded to the minimum we observed and the upper value was chosen to simulate a stronger decrease in root absorbing power along 1 cm starting from the root tip, as observed by Pineros et al. (1998). For each cohort, the different L_i were randomly drawn from the same distribution of first order lateral root length DL_k . Four empirical distributions were tested ($1 \leq k \leq 4$), obtained from experimental observations on soil-grown sunflower plants at ten leaves growth stage (Aguirrezabal 1993). These observations were also used to set the range for the total number of first order lateral roots (N_r) in a cohort.

All variables and parameters were combined following a four level-full factorial design giving 4,096 simulations. Simulations were analysed by a six-way analysis of variance including all main effects and first order interactions.

Statistical and computation software

We used the statistical software R 2.13.1 R Development Core Team (2008)) to perform all computations and statistical analyses. Mixed effect models were fitted by using the 'nlme' package version 3.1-101 (Pinheiro et al. 2012).

Table 1 Values of the different parameters tested in the sensitivity analysis of the model that simulates the uptake of Cd^{2+} by first order lateral roots of sunflower by accounting for the longitudinal variation in the root absorbing power (See Eq. 7 in “Materials and Methods”)

Parameters names		Tested parameter values				
Root absorbing power parameters						
Shape parameter for the root absorbing power model	b (cm ⁻¹)	0.17	3.11	6.06	9	
Basal root absorbing power	c (L cm ⁻² s ⁻¹)	2.7 10 ⁻⁸	4.3 10 ⁻⁸	5.9 10 ⁻⁸	7.5 10 ⁻⁸	
(Apex-Basal) root absorbing power	a_c (L cm ⁻² s ⁻¹)	1. 10 ⁻⁹	1. 10 ⁻⁷	2. 10 ⁻⁷	3. 10 ⁻⁷	
Root architecture parameters						
Root diameter	D (cm)	0.04	0.08	0.11	0.15	
Distribution of lengths in first order lateral root cohorts	DL _k	DL ₁	DL ₂	DL ₃	DL ₄	
Mean –	(cm)	6.6 –	7.7 –	10.9 –	10.8 –	
Median–		2.8 –	2.8 –	3.6 –	4.2 –	
90th percentile		22.1	25.9	31.1	30.3	
Number of roots in first order lateral root cohorts	Nr	90	112	134	156	

Results

Longitudinal movement of ^{109}Cd during exposure and choice of the duration of exposure of first order lateral roots to labelled Cd (Experiment 1)

The radioactivity found in the four root segments that were not exposed to ^{109}Cd was significantly different from the background ($p < 0.05$, not shown). However, the maximal cumulative radioactivity found in these four segments adjacent to the labelled one was 4.7 % of the total recovered (Table 2), which corresponds to

5.5 % of the radioactivity found in the labelled root segment (not shown). On average, the radioactivity recovered in the segments that were not exposed to the tracer decreased with the distance to the labelled segment. This movement of ^{109}Cd to adjacent root segments did not significantly depend on the labelled position (apical or basal, $p = 0.24$) nor on the exposure time ($p = 0.09$) (Table 2).

The radioactivity recovered in the labelled root segments increased linearly with the exposure duration (Fig. 3). The slope of the relationship was significantly greater ($\times 2.9$) for the apical labelling than for

Table 2 Study of the axial movement of cadmium in first order lateral roots of sunflower. The root apex or a segment close to the branching zone was exposed for 5, 10 or 20 min to 500 nM

radiolabelled Cd. After desorption of non-absorbed Cd^{2+} , radioactivity was determined in the four root segments next to the labelled one

Labelling duration (min)	Labeled segments	Percent of the total radioactivity recovered					Total transferred (%)
		Segment#					
		1	2	3	4	5	
5	Apex	95.26	3.29	0.22	0.26	0.97	4.74 ^a
	Basal	0.34	0.84	98.26	0.25	0.31	1.74 ^a
10	Apex	98.17	0.47	0.27	0.63	0.46	1.83 ^a
	Basal	0.15	0.20	99.00	0.47	0.18	1.00 ^a
20	Apex	99.44	0.14	0.10	0.19	0.14	0.56 ^a
	Basal	0.06	0.14	98.74	0.96	0.10	1.26 ^a

Values indicate the percentages of the total radioactivity recovered. The bold values in grey cells correspond to the labelled segments. The last column corresponds to the total radioactivity recovered in the four unlabelled segments and the letter is the mean grouping for the column by HSD Tukey test at $p < 0.05$ ($n = 8$)

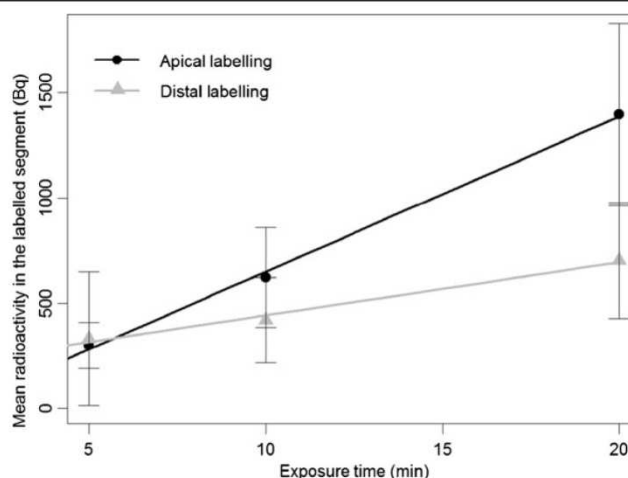


Fig. 3 Radioactivity recovered in ~1 cm root segments of sunflower first order lateral roots exposed to 500 nM ^{109}Cd (approximately 23 kBq per segment) for 5, 10 or 20 min. The labelling was performed at the apex (apical labelling) or at the region just before the branching zone (basal labelling). The lines are the linear relationships between the radioactivity recovered

and the time for the two labelling positions. Black line with circles represent mean radioactivity recovered for apical labelling ($y=73.9x-88.6$, $R^2=0.99$). Grey line with triangles represent mean radioactivity recovered for basal labelling ($y=25.3x+189.9$, $R^2=0.98$). Vertical bars are the standard deviation ($n=8$)

the basal labelling ($p<0.001$). For the 5 and 10 min exposure duration, the radioactivity recovered in the apical labelled segments was not significantly different from that found in the basal segments ($p=0.79$ and $p=0.09$, respectively, not shown). A significant difference between the apical and the basal ^{109}Cd uptake was only found for the 20 min exposure ($p=0.002$). Consequently, the 20 min exposure duration was chosen for mapping the Cd^{2+} influx by sunflower roots. This duration of exposure of roots to ^{109}Cd enables sufficient radioactivity to be absorbed so that the axial variability in Cd^{2+} root influx could be revealed whilst minimizing the axial movement of Cd^{2+} during the labelling.

Checking for the linear model for the kinetics of Cd^{2+} influx (Experiment 2)

After exposure of different first order lateral roots to radiolabelled Cd at varying Cd concentrations, we checked that whatever the root segment number (Fig. 2), the Cd^{2+} influx could be fitted by a linear relationship of the Cd concentration in the solution (Fig. 4). The R^2 ranged from 0.64 to 0.88 and the worst goodness of fit resulted from a large between-plant variability. The residuals of the fits did not show

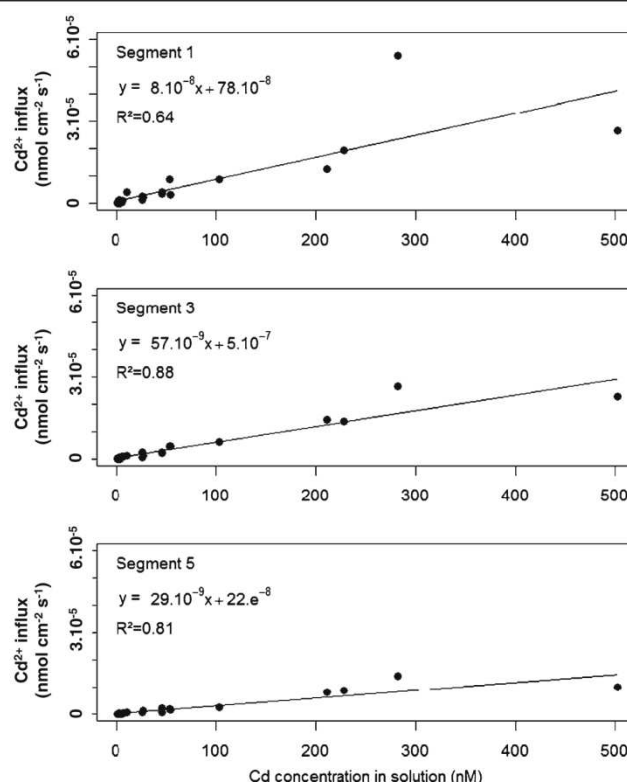
any departure from the linear model (data not shown). Consequently, the Cd^{2+} influx was further modelled by using a linear model of the Cd concentration, with the root absorbing power (RP) being the slope of the relationship (Eq. 1).

Mapping of the longitudinal variation in ^{109}Cd influx in first order lateral roots of sunflower (Experiment 2)

The root absorbing power for Cd^{2+} uptake in first order lateral roots decreased with the distance from the apex (Fig. 5). The decrease was steep close to the apex, and became less pronounced in the basal positions. The values did not change significantly between 12.5 and 25 cm. Hence, from the apex to 25 cm, the root absorbing power decreased by a factor of 2.9 on average (Fig. 5). The standard deviation of the root absorbing power due to the between-plant variability was high, especially for the root segments close to the root tip (grey line in Fig. 5). At this location, the variability in the root absorbing power due to plant effect was as large as the apex to root base longitudinal variation.

The Bayesian information criteria (BIC) of the three different mathematical models tested to fit the

Fig. 4 Influx of Cd^{2+} ($\text{nmol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) in three root segments of first order lateral roots of sunflower as a function of Cd concentration in the solution of exposure. The individual first order laterals were entirely exposed to radiolabelled solution at varying Cd concentrations (0.8 to 500 nM) for 20 min. After desorption, the roots were divided into different segments, the number of which refers to the position from the apex (see Fig. 2). The inset statistics are for the linear regression between the Cd^{2+} influx and the Cd concentration



axial profile were $-4,992$, $-4,999$, and $-4,875$ for Model 1 (Eq. 2), Model 2 (Eq. 3), and Model 3 (Eq. 4) respectively. So, the best one was Model 2 (Eq. 3), which explained 79 % of the longitudinal variation in the root absorbing power. The use of a mixed-effect model made it possible to determine the mean estimates for the model parameters (Fig. 5, Online Resource 1) while accounting for the random between plant variability (Fig. 5).

Simulation of Cd^{2+} uptake by second order lateral roots

The Cd^{2+} uptake of second order lateral roots was simulated by using Model 2 that was parameterized for the first order lateral roots (Eqs. 3 and 6). The actual Cd^{2+} uptake values were strongly correlated with the simulations (Fig. 6). The slope of the linear relationship (0.82) was significantly different from 1 ($p < 0.001$), indicating that the model tended to

overestimate the Cd^{2+} uptake by the second order lateral roots by 22 % on average.

Sensitivity analysis of the Cd^{2+} uptake model for first order lateral roots in sunflower

A full four level factorial design was used to assess the influence of the variables and parameters of the model that predicts Cd^{2+} uptake by first order lateral roots and that accounts for the longitudinal variation in the root absorbing power (Eq. 7).

The variance analysis of the simulated Cd^{2+} uptake indicates that main effects and first order interactions explain 83 % of the total variance. In detail, main effects strongly dominate and first order interactions are of little influence (Fig. 7). The most influential interaction $a_c \times b$ is related to parameters of the root absorbing power profile and contributes little to the total variance. The interactions between the root

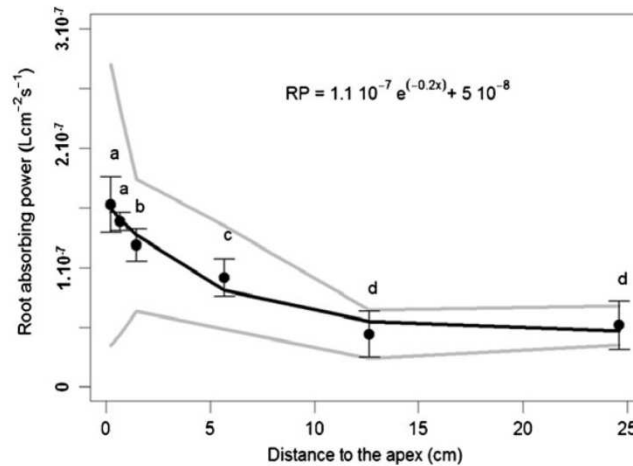


Fig. 5 Axial profile of the root absorbing power (RP, $L\text{ cm}^{-2}\text{ s}^{-1}$) for Cd^{2+} uptake in first order lateral roots of sunflower. The root absorbing power RP is given by the model: $I = RP\ C_{\text{Cd}}$, where I is the influx of Cd^{2+} ($\text{nmol cm}^{-2}\text{ s}^{-1}$) and C_{Cd} is the Cd concentration in the solution (nmol L^{-1}). The points are the mean estimates, the vertical bars are their standard errors,

the black line is the mean estimates fitted by the model $RP = ae^{-bx} + c$ ($RP = 1.1\ 10^{-7}e^{-0.2x} + 5\ 10^{-8}$, $R^2 = 0.79$), and the grey lines are the between-plant standard deviation (random effects estimated from the mixed effect model, $n = 28$). Letters indicate significant differences between two neighbouring segments at $p < 0.05$

absorbing power parameters and the root architectural variables (Table 1) are of little importance.

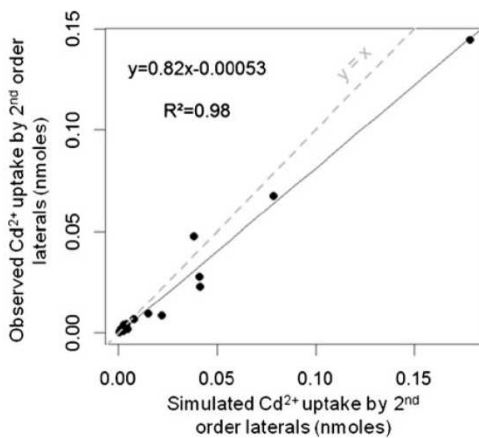


Fig. 6 Observed versus simulated values of Cd^{2+} uptake by second order lateral roots of sunflower. The simulated uptakes were calculated by using the model describing the axial profile of Cd^{2+} influx in first order lateral roots (see “Materials and Methods” for details). The full line is the observed vs simulated regression and the dotted line is the $y = x$ line

Most influential variables relate to both root architecture and to the longitudinal variation in the root absorbing power variable. Comparisons of the effect of variables on Cd^{2+} uptake shows that the most influential is the root diameter D ($\times 3.4$) followed by the basal root absorbing power c ($\times 2.5$), the curvature parameter of the root absorbing power profile b ($\times 2.2$), the number of roots N_r ($\times 1.8$), the distribution of their length DL ($\times 1.6$) and the variation in the root absorbing power between the root tip and the root base a_c ($\times 1.4$) (Fig. 8a, b, c, d, f, e). Because of its interaction with the parameter a_c (Fig. 7), the curvature parameter b has a non linear total effect. It is mainly influential in the range 0.17–3.11 (Fig. 8c) and it is all the more influential than the variation in the root absorbing power between the root tip and the root base a_c is strong (not shown).

Discussion

Longitudinal movement of ^{109}Cd during the exposure of first order lateral roots to labelled Cd

In the perspective of mapping the longitudinal variation in Cd^{2+} influx into sunflower roots supplied with

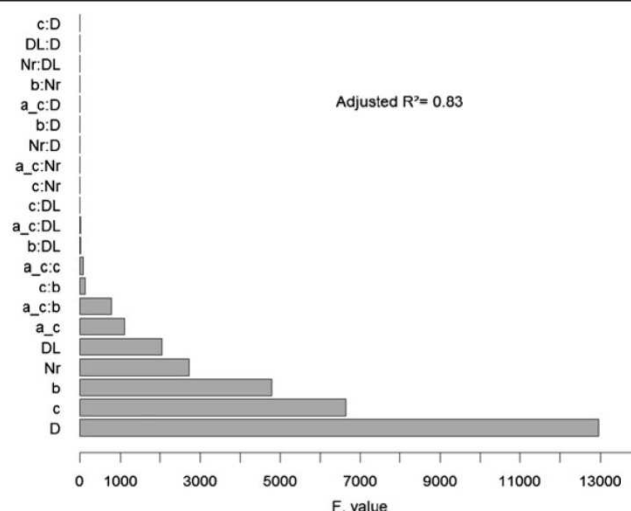


Fig. 7 Analysis of variance for the simulated uptake of Cd^{2+} by cohorts of first order lateral roots in sunflower. Simulations were calculated from the model that accounts for the longitudinal variation in the root absorbing power (see Eq. 7) and for 24 h exposure to 20 nM Cd. From the exponential + constant model for the root absorbing power ($\text{RP} = ae^{-bx} + c$), the parameter a_c

is the root absorbing power difference between the apex and the base of the root ($a_c = a - c$) and b is the shape parameter. Other variables are D , the root diameter, Nr , the number of roots in each cohort of first order lateral roots, and DL is the distribution of individual root lengths in the cohorts. Bars are the ordered Fisher's statistics for the main and first order interactions

^{109}Cd , it was important to check that the radioactivity found in the root segments mainly originates from the uptake and not from the longitudinal movement of the tracer during the exposure. When ^{109}Cd was locally supplied either at the root tip or before the branching zone of first order lateral roots, the radioactivity found in the root segments next to the labelled position was significantly different from the background counts, suggesting some longitudinal movement of ^{109}Cd . However, because no more than 5 % of the total absorbed radioactivity were recovered in the non-labelled regions (Table 2), the amount of Cd^{2+} that moved longitudinally was considered to be negligible as compared to the total absorbed up to 20 min time of exposure. Similarly, very little ^{32}P moved longitudinally in bean roots for labelling duration up to 30 min (Rubio et al. 2004). The very low longitudinal movement of Cd^{2+} we observed is also consistent with the 2.4 to 6.6 cm h^{-1} velocities of Cd^{2+} in xylem reported in rice by Fujimaki et al. (2010) and by Ishikawa et al. (2011). Finally, detoxification of Cd^{2+} by storage into vacuoles and interactions of Cd^{2+} with negative charges of xylem vessels are expected to further reduce its mobility (Clemens et al. 2002). Hence, we can

reasonably assume that during a 5 to 20 min exposure to ^{109}Cd , the longitudinal movement of the tracer is negligible and consequently, the radioactivity recovered in a root segment is representative of the amount of Cd^{2+} absorbed locally.

Mapping of the longitudinal variation in ^{109}Cd influx in first order lateral roots of sunflower

Whatever the position of the root segments, the influx of Cd^{2+} was proportional to the Cd concentrations in the exposure solutions (Fig. 4). In wheat, Berkelaar and Hale (2000) also observed a linear accumulation of Cd^{2+} in roots for Cd concentration in the solution increasing up to 391 nM. Hence, in this study and in our work, the theoretical Michaelis-Menten kinetics for the Cd^{2+} influx could be approximated by a linear relationship of the Cd concentration in the solution. Numerical simulations show that this approximation is valid if the Cd concentration in the solution is approximately below half of the value of the Michaelis-Menten constant (K_m). We have not been able to find K_m values for sunflower. The range for the K_m values reviewed by Lux et al. (2011) for non hyperaccumulators and for Cd

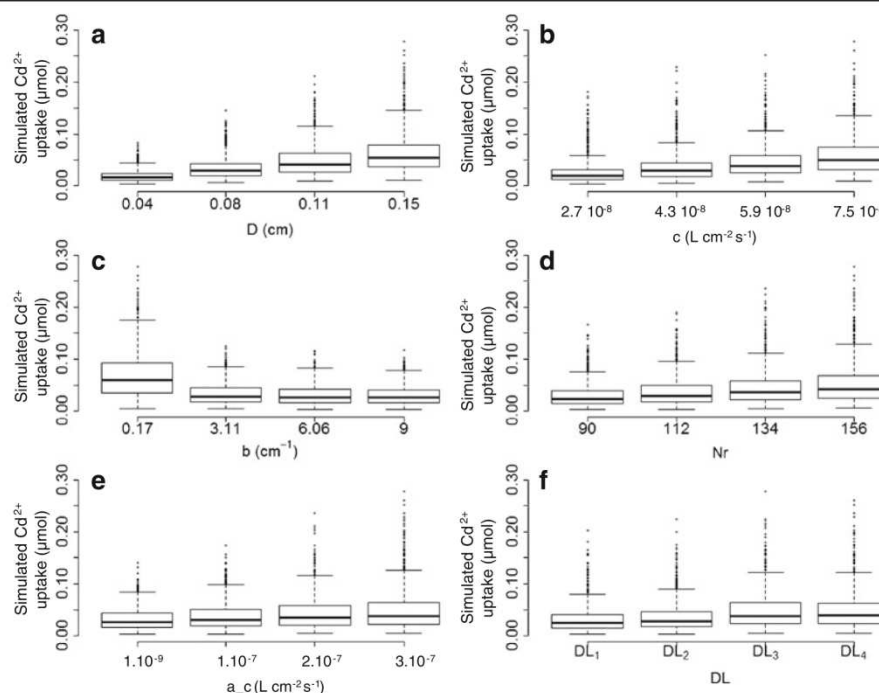


Fig. 8 Simulation of Cd^{2+} uptake (μmol) by sunflower first order lateral root cohorts exposed for 24 h to 20 nM Cd. Simulations were calculated from the model that accounts for the longitudinal variation in the root absorbing power (see Eq. 7). The *boxplots* present the effect of the different parameters of the model tested in the sensitivity analysis. Each boxplot (a, b, c, d, e, and f) corresponds to the distribution of the simulated values for the Cd^{2+} uptake when one parameter is

fixed (D, c, b, Nr, a_c, and DL respectively) and the others were allowed to vary. From the exponential + constant model of the root absorbing power ($\text{RP} = ae^{-bx} + c$), the parameter a_c is the root absorbing power difference between the apex and the base of the root ($a_c = a - c$) and b is the shape parameter. Other variables are D, the root diameter, Nr, the number of roots in each cohort of first order lateral roots, and DL is the distribution of individual root lengths in the cohorts

concentrations that are consistent with ours is 20–600 nM. Considering this, it is likely that most of the Cd concentrations tested here were low enough so that the influx could be approximated by a linear relationship.

The Cd^{2+} influx is higher at the root tip than at the basal root location. By using cadmium-selective microelectrodes, a longitudinal variation in Cd^{2+} influx has also been evidenced (He et al. 2011; Pinos et al. 1998; Li et al. 2012; Farrell et al. 2005). However the longitudinal profiles of Cd^{2+} influx derived from these previous works are hardly comparable with our results because the profiles derived from microelectrodes concentrated on the first millimetres starting at the root tip. Our work extended measurements further toward the root base, which is important in the

perspective of coupling Cd^{2+} influx with the root architecture. Hence, although there was not a great spatial resolution, our results report for the first time to our knowledge, an extended longitudinal profile for Cd^{2+} influx in sunflower first order lateral roots.

There may be several reasons for the longitudinal variation in Cd^{2+} influx. First, Cd^{2+} is assumed to be mainly absorbed by energy-driven transporters (Costa and Morel 1994; Hart et al. 1998; He et al. 2009), in particular those of Zn (Clemens 2001). So, a higher metal influx in the root tip region may reflect a higher activity of the transporters. The higher activity of Cd^{2+} transporters at the root tip is possible if these proteins are over-expressed. Changes in Cd^{2+} transporter expression has already been reported, in particular depending on plant nutrient status (Durmaz et al.

2011), or on plant genotype (He et al. 2007; Assuncao et al. 2001; Weber et al. 2004). The greater activity of Cd^{2+} transporters at the root tip also requires more energy in that part of roots, which is consistent with the longitudinal profile of sugar concentration in root tissue (Jones 1998).

Secondly, the longitudinal variation in Cd^{2+} influx can result from the development of apoplastic barriers, *i.e.* the Casparian bands and suberin lamellae in the endodermis and exodermis (Enstone et al. 2002). In the root region before endo- and exo-dermis differentiation, all cells can potentially internalize Cd^{2+} from the apoplast whereas when the endodermis and the exodermis are mature, Cd^{2+} internalization is likely to be mainly limited to epidermis and cortex cells because the Casparian bands and suberin lamellae restrict the apoplastic diffusion of ions (Ferguson and Clarkson 1976; Lehmann et al. 2000; Cholewa 2000; Enstone et al. 2002). Hence, the differentiation of apoplastic barriers have been assumed to be responsible for the variation in Cd accumulation in different species (Redjala et al. 2011; Lux et al. 2004). So, starting at the root apex, the development of the endodermis and then of the exodermis along with the deposition of suberin lamellae could explain that we observed a decrease in Cd^{2+} influx with the distance to the root tip in first order lateral root of sunflower. Because RP variation is likely to be linked to the differentiation of these specific structures, it could be more relevant to link the RP to the age of root segments rather than the distance from the apex.

The development of apoplastic barriers along the root is highly variable, in particular depending on the root environment. The lack of oxygen (Enstone and Peterson 2005), the elongation rate of the root (Perumalla et al. 1990), and the culture medium (Redjala et al. 2011), for example, could strongly affect the axial distribution of the apoplastic barriers and probably the longitudinal variation in Cd^{2+} influx. In maize particularly, Redjala et al. (2011) found that as compared to hydroponics, in soil conditions, the barriers developed much closer to the apex and they were more regular. The influence of environmental conditions on the differentiation of apoplastic barriers may contribute to explain the high between-plant variability we observed. In particular, although we tried to select comparable roots for mapping the Cd^{2+} influx, we could not assert all roots had the same age, elongation rate and possibly oxygen availability. Additionally, the decline in ion influx with

root age (Barber 1995) and the variability in plant energy status may have also influenced our observations.

The Cd^{2+} uptake by second order lateral roots simulated by using the root absorbing power model parameterized for first order lateral roots was linearly related to experimental observations, suggesting that a longitudinal variation in root absorbing power for Cd^{2+} uptake is likely to also exist in second order lateral roots. However, the simulation moderately overestimated actual values, which indicates that the root absorbing power should be specifically determined for second order lateral roots.

Sensitivity analysis of the Cd^{2+} uptake model for first order lateral roots in sunflower

The simulations of Cd^{2+} uptake for 24 h by first order lateral root cohorts exposed to 20 nM Cd and the subsequent analysis of variance of the results indicate that among the root architecture variables, the root diameter is the most influential followed by the number of roots in the cohorts. As indicated by Eq. 7, these variables increase linearly the Cd^{2+} uptake by increasing the root surface area. This is consistent with experimental observations from literature that showed the uptake of ions (for example Ca, and P) can be positively related to root diameter (Harrison-Murray and Clarkson 1973; Nwoke et al. 2008).

Among the parameter related to the longitudinal variation in Cd^{2+} influx, the most influential are the basal root absorbing power c and b , the parameter characterizing the shape of the longitudinal decrease in root absorbing power. The b parameter is mainly influential for values within the $0.17\text{--}3.11\text{ cm}^{-1}$ range, which corresponds to our observations for hydroponics cultures. Assuming the differentiation of apoplastic barriers are mainly responsible for the variation in Cd^{2+} influx (Redjala et al. 2011; Lux et al. 2004), in soil conditions, the high root absorbing power is expected to be restricted to a narrow region at the root tip because apoplastic barriers develop much more closer to the root apex than in hydroponic conditions (Redjala et al. 2011). Consequently, in soil conditions, the shape parameter b , should be much higher, in the $6\text{--}9\text{ cm}^{-1}$ range, where its influence is very low (Fig. 8c). We conclude that in soil conditions, the shape of the longitudinal pattern of the root absorbing power may not strongly influence the uptake of Cd^{2+} by cohorts of first order lateral roots.

Although the stronger influx at the root tip (parameter a_c) is not the most influential parameter, its variability makes the total uptake vary by 1.4 fold on average. Therefore, it may be important to consider this greater Cd^{2+} influx at the root tip when investigating the relationship between root architecture and uptake of Cd^{2+} by the root system.

The analysis of variance of the simulations shows that interactions are not very influential (Fig. 7). The longitudinal variation in root absorbing power governs the Cd^{2+} uptake by individual roots, independently of the root number and diameter and in that case, the lack of interactions can easily be understood. However, the longitudinal variation in root absorbing power influences differently the Cd^{2+} uptake by individual roots, depending on their length. Consequently, interactions between the root absorbing power parameters and the root length distribution (DL) were expected. We think that the four root length distributions we tested were not enough contrasted to exacerbate the interactions with the root absorbing power profile. This low variability in the root length distribution is likely to also explain why this variable had moderate influence on Cd^{2+} uptake, although root length has been demonstrated to have a strong effect on nutrient uptake (Dong et al. 1995; Hodge 2004) or on Cd^{2+} uptake (Berkelaar and Hale 2000). These root length distributions we tested were derived from observations on soil-grown sunflower, shaded or not and sown at different dates (Aguirrezabal 1993). In order to get a better insight into the interactions between the root architecture and the longitudinal variation in root Cd^{2+} influx, further observations are needed to characterize root architecture variability in sunflower, depending on growth conditions or on genotype.

Conclusion

Our work has highlighted that in sunflower first order lateral roots, Cd^{2+} influx decreased by 2.9 in average between the root tip and the root base. After combining this longitudinal variation in Cd^{2+} influx with architectural root variables (root diameter, number of roots and root length distribution), simulations indicated that the total Cd^{2+} uptake by first order lateral roots cohorts could vary by $\times 1.4$ depending on the difference in Cd^{2+} influx between the root tip and the base of the root. This is an important point to consider

when investigating how root architecture could impact the uptake of Cd^{2+} by the root system. Provided that additional data on the variability in root architecture in sunflower are available, this could be achieved by including the longitudinal variation in Cd^{2+} influx for all root orders in a generic root architecture model (Pagès et al. 2012) and by making a sensitivity analysis of the resulting model.

Acknowledgments This work was supported by the funding ANR 2011 CESA 008 01 and by a research grant from the Technical Center for Oilseed Crops and Industrial Hemp (CETIOM) and from the French National Institute for Agricultural Research (INRA). The authors are grateful to S. Bussière, C. Coriou and S. Thunot for their helpful technical contribution.

References

- Adriano DC (2001) Trace elements in terrestrial environments: biochemistry, bioavailability, and risks of metals, 2nd edn. Springer, New York
- Aguirrezabal L (1993) Modélisation de l'allongement et de la ramification du système racinaire du tournesol (*Helianthus annuus* L.). Effet du rayonnement intercepté et de la température. Blaise Pascal (Clermont-Ferrand II), Clermont-Ferrand
- Ansari R, Kazi TG, Jamali MK, Arain MB, Wagan MD, Jalbani N, Afridi HI, Shah AQ (2009) Variation in accumulation of heavy metals in different varieties of sunflower seed oil with the aid of multivariate technique. Food Chem 115(1):318–323. doi:10.1016/j.foodchem.2008.11.051
- Assuncao AGL, Martins PD, De Folter S, Vooijs R, Schat H, Aarts MGM (2001) Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Plant Cell Environ 24(2):217–226. doi:10.1046/j.1365-3040.2001.00666.x
- Barber SA (1995) Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach. Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach., vol Ed. 2
- Berkelaar E, Hale B (2000) The relationship between root morphology and cadmium accumulation in seedlings of two durum wheat cultivars. Can J Bot-Rev Can Bot 78(3):381–387
- Buckley WT, Buckley KE, Huang JZ (2010) Root cadmium desorption methods and their evaluation with compartmental modeling. New Phytol 188(1):280–290. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03354.x
- Cholewa EM (2000) Calcium transport and delivery to the xylem in onion (*Allium cepa* L.) roots.
- Clemens S (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. Planta 212(4):475–486. doi:10.1007/s004250000458
- Clemens S, Palmgren MG, Krämer U (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. Trends Plant Sci 7(7):309–315. doi:10.1016/s1360-1385(02)02295-1

- Costa G, Morel JL (1994) Efficiency of H⁺-atpase activity on cadmium uptake by 4 cultivars of lettuce. *J Plant Nutr* 17(4):627–637
- Dong B, Rengel Z, Graham RD (1995) Root morphology of wheat genotypes differing in zinc efficiency. *J Plant Nutr* 18(12):2761–2773. doi:10.1080/01904169509365098
- Durmaz E, Coruh C, Dinler G, Grusak MA, Peleg Z, Saranga Y, Fahima T, Yazici A, Ozturk L, Cakmak I, Budak H (2011) Expression and cellular localization of ZIP1 transporter under zinc deficiency in wild emmer wheat. *Plant Mol Biol Rep* 29(3):582–596. doi:10.1007/s11105-010-0264-3
- Enstone DE, Peterson CA (2005) Suberin lamella development in maize seedling roots grown in aerated and stagnant conditions. *Plant Cell Environ* 28(4):444–455
- Enstone DE, Peterson CA, Ma FS (2002) Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. *J Plant Growth Regul* 21(4):335–351. doi:10.1007/s00344-003-0002-2
- Farrell RE, McArthur DFE, Van Rees KCJ (2005) Net Cd²⁺ flux at the root surface of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) cultivars in relation to cultivar differences in Cd accumulation. *Can J Plant Sci* 85(1):103–107
- Ferguson IB, Clarkson DT (1976) Ion uptake in relation to development of a root hypodermis. *New Phytol* 77(1):11–14
- Fujimaki S, Suzui N, Ishioka NS, Kawachi N, Ito S, Chino M, Nakamura S-i (2010) Tracing cadmium from culture to spikelet: noninvasive imaging and quantitative characterization of absorption, transport, and accumulation of cadmium in an intact rice plant. *Plant Physiol* 152(4):1796–1806. doi:10.1104/pp.109.151035
- Grant CA, Clarke JM, Duguid S, Chaney RL (2008) Selection and breeding of plant cultivars to minimize cadmium accumulation. *Sci Total Environ* 390(2–3):301–310. doi:10.1016/j.scitotenv.2007.10.038
- Harrison-Murray RS, Clarkson DT (1973) Relationship between structural development and the absorption of ions by the root system of *Cucurbita pepo*. *Planta* 114(1):1–16. doi:10.1007/bf00390280
- Hart JJ, Welch RM, Norvell WA, Sullivan LA, Kochian LV (1998) Characterization of cadmium binding, uptake, and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars. *Plant Physiol* 116(4):1413–1420
- He JY, Zhu C, Ren YF, Jiang DA, Sun ZX (2007) Root morphology and cadmium uptake kinetics of the cadmium-sensitive rice mutant. *Biol Plant* 51(4):791–794. doi:10.1007/s10535-007-0162-1
- He JY, Ren YF, Wang FJ, Pan XB, Zhu C, Jiang DA (2009) Characterization of cadmium uptake and translocation in a cadmium-sensitive mutant of rice (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Arch Environ Contam Toxicol* 57(2):299–306. doi:10.1007/s00244-008-9273-8
- He JL, Qin JJ, Long LY, Ma YL, Li H, Li K, Jiang XN, Liu TX, Polle A, Liang ZS, Luo ZB (2011) Net cadmium flux and accumulation reveal tissue-specific oxidative stress and detoxification in *Populus x canescens*. *Physiol Plant* 143(1):50–63. doi:10.1111/j.1399-3054.2011.01487.x
- Hoagland DR, Aron DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *Circ Calif Agric Exp Station* 347:1–32
- Hodge A (2004) The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytol* 162(1):9–24. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01015.x
- Ishikawa S, Suzui N, Ito-Tanabata S, Ishii S, Igura M, Abe T, Kuramata M, Kawachi N, Fujimaki S (2011) Real-time imaging and analysis of differences in cadmium dynamics in rice cultivars (*Oryza sativa*) using positron-emitting Cd-107 tracer. *BMC Plant Biol* 11. doi:10.1186/1471-2229-11-172
- Jones DL (1998) Organic acids in the rhizosphere—a critical review. *Plant Soil* 205(1):25–44. doi:10.1023/a:1004356007312
- Lehmann H, Stelzer R, Holzamer S, Kunz U, Gierth M (2000) Analytical electron microscopical investigations on the apoplastic pathways of lanthanum transport in barley roots. *Planta* 211(6):816–822. doi:10.1007/s004250000346
- Li L, Liu X, Peijnenburg WJGM, Zhao J, Chen X, Yu J, Wu H (2012) Pathways of cadmium fluxes in the root of the halophyte *Suaeda salsa*. *Ecotoxicol Environ Saf* 75:1–7. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.09.007
- Lux A, Sotnikova A, Opatrna J, Greger M (2004) Differences in structure of adventitious roots in *Salix* clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity. *Physiol Plant* 120(4):537–545
- Lux A, Martinka M, Vaculik M, White PJ (2011) Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *J Exp Bot* 62(1):21–37. doi:10.1093/jxb/erq281
- McLaughlin MJ, Parker DR, Clarke JM (1999) Metals and micronutrients—food safety issues. *Field Crops Res* 60(1–2):143–163. doi:10.1016/s0378-4290(98)00137-3
- Nwoke OC, Diels J, Abaidoo R, Nziguheba G, Merckx R (2008) Organic acids in the rhizosphere and root characteristics of soybean (*Glycine max*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) in relation to phosphorus uptake in poor savanna soils. *Afr J Biotechnol* 7(20):3617–3624
- Nye PH (1973) The relation between the radius of a root and its nutrient-absorbing power alpha. Some theoretical considerations. *J Exp Bot* 24(82):783–786. doi:10.1093/jxb/24.5.783
- Page L, Moreau D, Sarlikioti V, Boukcim H, Nguyen C (2012) ArchiSimple: a Parsimonious Model of the Root System Architecture, in: Proceedings. Presented at the IEEE 4th International Symposium on Plant Growth Modeling, Simulation, Visualization and Applications Shanghai (China)
- Perumalla CJ, Peterson CA, Enstone DE (1990) A survey of angiosperm species to detect hypodermal Casparian bands. I. Roots with a uniseriate hypodermis and epidermis. *Bot J Linn Soc* 103(2):93–112. doi:10.1111/j.1095-8339.1990.tb00176.x
- Pineros MA, Shaff JE, Kochian LV (1998) Development, characterization, and application of a cadmium-selective micro-electrode for the measurement of cadmium fluxes in roots of *Thlaspi* species and wheat. *Plant Physiol* 116(4):1393–1401
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, the R Development Core Team (2012) nlme: linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-105
- R Development Core Team (2008) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>
- Rasmussen PE, Goulding KWT, Brown JR, Grace PR, Janzen HH, Korschens M (1998) Agroecosystem—long-term agroecosystem experiments: assessing agricultural sustainability and global change. *Science* 282(5390):893–896. doi:10.1126/science.282.5390.893

- Redjala T, Sterckeman T, Morel JL (2009) Cadmium uptake by roots: contribution of apoplast and of high- and low-affinity membrane transport systems. *Environ Exp Bot* 67(1):235–242. doi:10.1016/j.envexpbot.2009.05.012
- Redjala T, Sterckeman T, Louis Morel J (2010) Determination of the different components of cadmium short-term uptake by roots. *J Plant Nutr Soil Sci* 173(6):935–945. doi:10.1002/jpln.201000003
- Redjala T, Zelko I, Sterckeman T, Legue V, Lux A (2011) Relationship between root structure and root cadmium uptake in maize. *Environ Exp Bot* 71(2):241–248. doi:10.1016/j.envexpbot.2010.12.010
- Rubio G, Sorgona A, Lynch JP (2004) Spatial mapping of phosphorus influx in bean root systems using digital autoradiography. *J Exp Bot* 55(406):2269–2280. doi:10.1093/jxb/erh246
- Smolders E (2001) Cadmium uptake by plants. *Int J Occup Med Environ Health* 14(2):177–183
- Weber M, Harada E, Vess C, von Roepenack-Lahaye E, Clemens S (2004) Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. *Plant J* 37(2):269–281. doi:10.1046/j.1365-3113X.2003.01960.x

Abstract

Cadmium (Cd) is naturally occurring in soils that are also enriched by human activity. Cd contaminates food crops because of its absorption by plant roots. Because it is a toxic element for living organisms, its concentrations in food and feed plant products are subjected to regulatory limits. Therefore, it is necessary to understand the transfer of this metal from the soil to the edible plant part, especially for sunflower (*Helianthus annuus* L.), our model plant that can accumulate more Cd than other crop species. This study tested the hypothesis that the amount of Cd absorbed by sunflower was related to the root architecture. We characterized, at the individual roots level, a longitudinal variation of the influx of Cd^{2+} absorption in relation with the culture medium, the order and the age of roots. These variations were attributed to the development of apoplastic barriers (cellulose, lignin and suberin deposition) that restrict the absorption of Cd^{2+} into the cytosol. By simulation, it has been shown that these variations could theoretically impact the total absorption of Cd^{2+} in hydroponics depending on the root architecture while in solid substrate (sand) the impact was much more limited. Furthermore, a comparison of 14 sunflower cultivars showed that the variability in Cd concentrations in shoots was rather due to differences in absorption independent of root architecture and in variations in the root to shoot distribution. The longitudinal variation in the Cd root influx can then be considered of minor importance compared to the between cultivar variability in Cd uptake, the origin of which remains to be determined. In the perspective of modelling the total uptake of Cd in soil conditions, it could then be possible to assume a global mean influx of Cd independent of the root architecture.

Key words: Between cultivar variations, cadmium, isotopic tracer, longitudinal variation of influx, root architecture, sunflower