
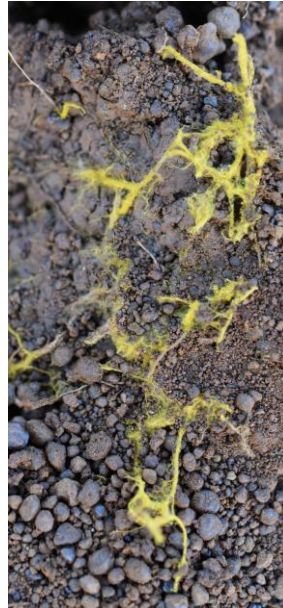


# Ressources microbiennes telluriques et réhabilitation des sols pollués par les métaux lourds (Phytostabilisation)

Marc DUCOUSSO : Chercheur en écologie microbienne au  **cirad**  
LA RECHERCHE AGRONOMIQUE  
POUR LE DÉVELOPPEMENT















?



# Comprendre le fonctionnement des écosystèmes naturellement riches en métaux lourds pour proposer des outils de réhabilitation des sols pollués

- 1- Caractérisation de la biodiversité
- 2- Organisation des groupes fonctionnels
- 3- Les interactions Plantes – Microorganismes
- 4- Fonctionnement génomique sous stress métallique

⇒ Propositions d'itinéraires techniques de réhabilitation

# 1 - Caractérisation de la biodiversité

## 1-1 : Descriptions de nouvelles espèces de champignons



# 1 - Caractérisation de la biodiversité

## 1-1 : Descriptions de nouvelles espèces de champignons

Eyssartier G., Ducouso M. (2014) – *Hymenopellis atroruginosa* sp. nov. un nouveau champignon xéruloïde de Nouvelle-Calédonie. *Bulletin de la Société Mycologique de France* 130(4):267-273.

Buyck B., Duhem B., Eyssartier G., Ducouso M. (2012) - *Podoserpula miranda* sp. nov. (Amylocorticiales, Basidiomycota) from New Caledonia. *Cryptogamie Mycologie* 33(4) : 453-461.

Eyssartier G., Ducouso M., Buyck B. (2010) - *Entoloma pseudomurrayi* sp. nov., un nouvel entolome jaune des forêts néo-calédoniennes de montagne à *Nothofagus*. *Cryptogamie, Mycologie*, 31(1):3-8.

Eyssartier G., Ducouso M., Buyck B. (2010) Agaricales nouveaux ou intéressants de Nouvelle-Calédonie. *Cryptogamie, Mycologie*, 31(1):329-339.

*Cryptogamie, Mycologie*, 2004, 25 (2): 115-125  
© 2004 Adac. Tous droits réservés



### ***Cantharellus garnierii* sp. nov., une nouvelle chanterelle des maquis miniers nickélicifères de Nouvelle-Calédonie**

Marc DUCOUSSO, Céline CONTESTO, Magalie COSSEGAL et Yves PRIN

LSTM, URM 1063 CIRAD/INRA/IRD Agro-M/UM2, TA 10/J  
F-34398 Montpellier Cedex 5, France.  
marc.ducouso@cirad.fr

Frédéric Rigault  
ENBIOPAC, Centre IRD de Nouméa, BP A5  
F-98848 Nouméa Cedex, Nouvelle Calédonie  
Frederic.Rigault@noumea.ird.fr

Guillaume Eyssartier  
19, avenue du petit Parc  
F-94300 Vincennes, France  
geyssartier@wanadoo.fr

# 1 - Caractérisation de la biodiversité

## 1-2 : Descriptions de nouvelles espèces de bactéries

Guentas L., Gensous S., Cavaloc Y., Ducouso M., Amir H., De Georges de Ledenon B., Moulin L., Jourand P. 2016. *Burkholderia novacaledonica* sp. nov. and *B. ultramafica* sp. nov. isolated from roots of *Costularia* spp. pioneer plants of ultramafic soils in New Caledonia. *Systematic and Applied Microbiology*, 39 (3) : p. 151-159.

# 2- Organisation des groupes fonctionnels

## 2-1 : Diversité des communautés bactériennes cultivables de la rhizosphère de *Costularia*

Des isolats bactériens de la rhizosphère de *Costularia arundinacea*, *C. nervosa* et *C. pubescens* prélevés dans 4 sites ont été caractérisés taxonomiquement et pour leurs capacités à solubiliser le phosphore, fixer l'azote de l'air et tolérer le nickel.

4 sites : Koniambo 1, Koniambo 2, Mont Dore, Plum

- isolement des bactéries du rhizoplan sur 3 espèces de *Costularia*

Culture en présence de [Ni] élevée

Capacité des cultures à solubiliser les phosphates

Mise en évidence d'une capacité réductrice d'acétylène

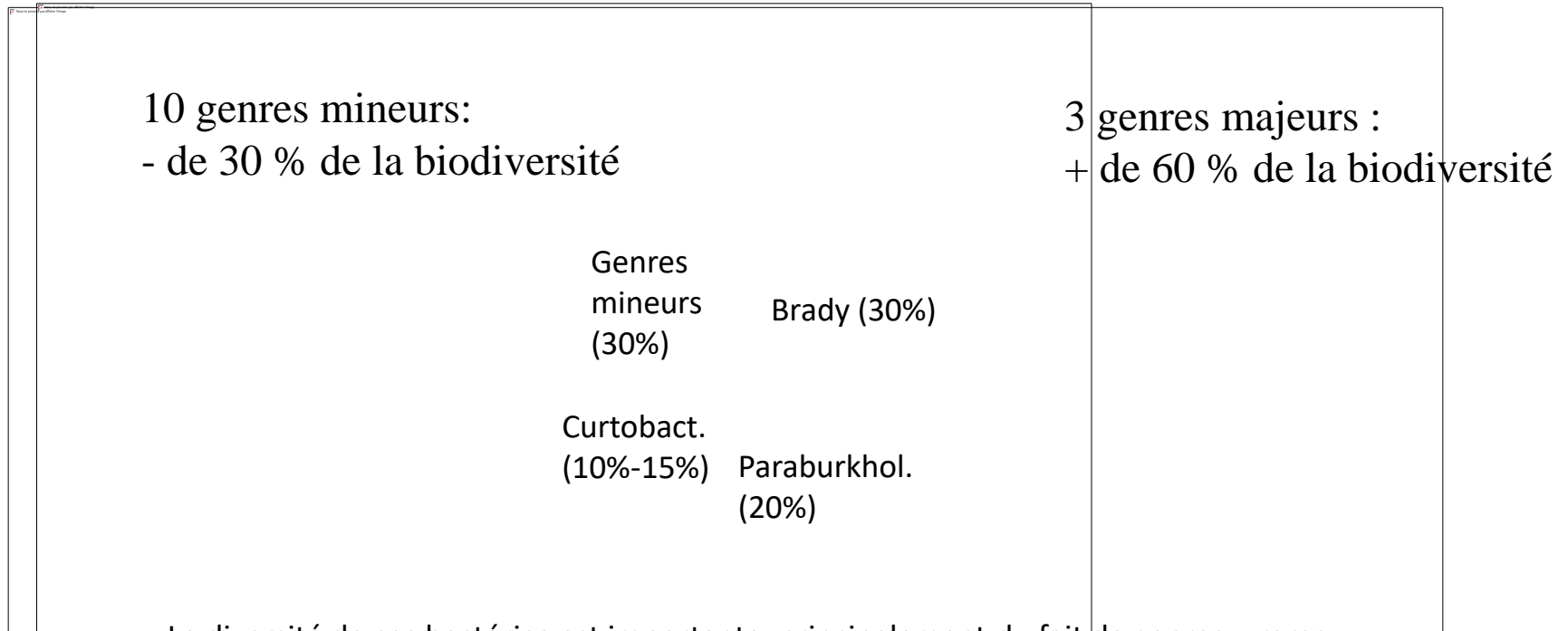
Séquençage partiel ADNr 16S des bactéries cultivées

Recherche *cnrE* et *nreB*, déterminants moléculaires de la tolérance au nickel



## 2-1 : Diversité des communautés bactériennes cultivables de la rhizosphère de *Costularia*

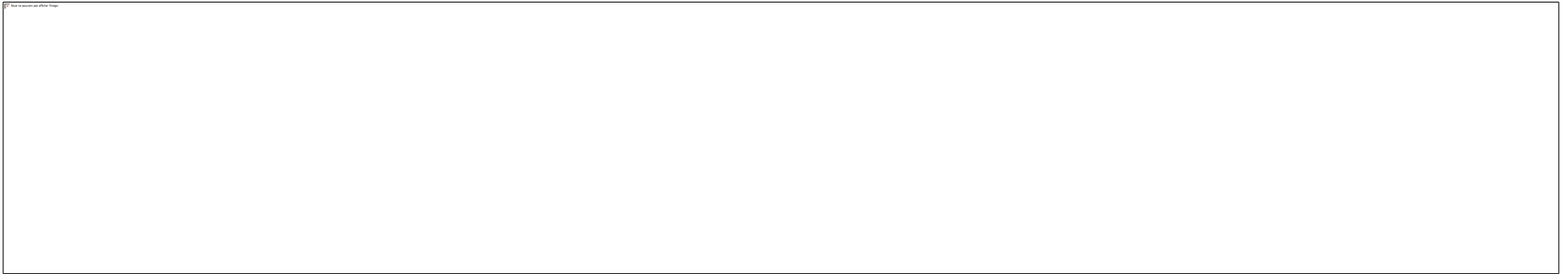
L'organisation taxonomique du cortège bactérien est structurée de façon similaire pour les 3 espèces de *Costularia* étudiées : *Bradyrhizobium* ( $\approx 30\%$ ), *Paraburkholderia* ( $\approx 20\%$ ), *Curtobacterium* ( $\approx 10-15\%$ ), autres genres (tous  $< 5\%$ ).



La diversité de ces bactéries est importante, principalement du fait de genres « rares »

## 2-1 : Diversité des communautés bactériennes cultivables de la rhizosphère de *Costularia*

Tolérance aux métaux : % de souches



Potentiels PGPR : % de souches



## 2-2 : Diversité et structure des communautés bactériennes et fongiques des groupements végétaux du massif de Koniambo, Nouvelle-Calédonie

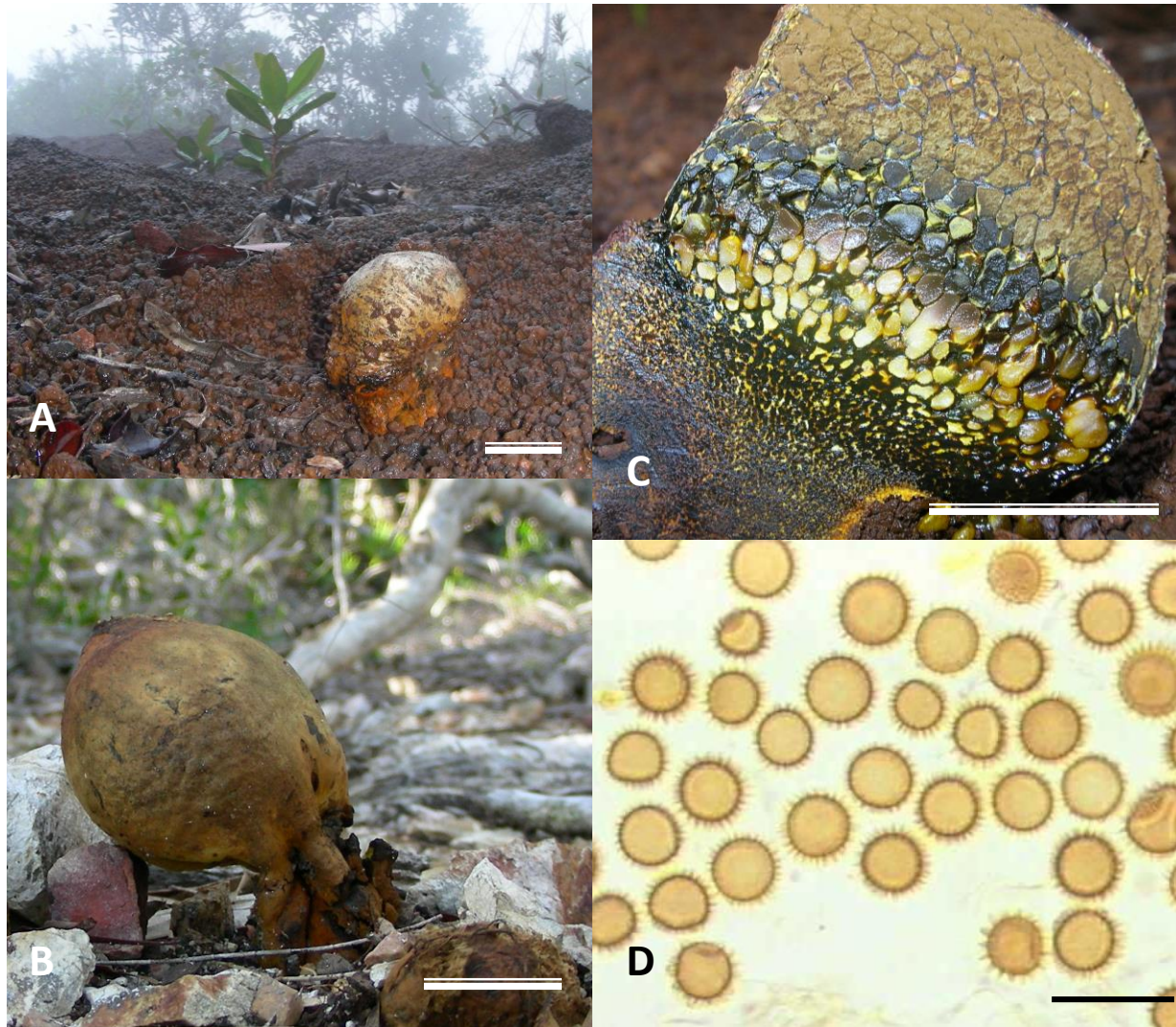
Bordez L., Jourand P., Ducouso M., Carriconde F., Cavaloc Y., Santini S., Claverie J.M., Wantiez L., Leveau A., Amir H. (2016) - Distribution patterns of microbial communities in ultramafic landscape: a metagenomic approach highlights the strong relationships between diversity and environmental traits". *Molecular Ecology* 25:2258-2272.



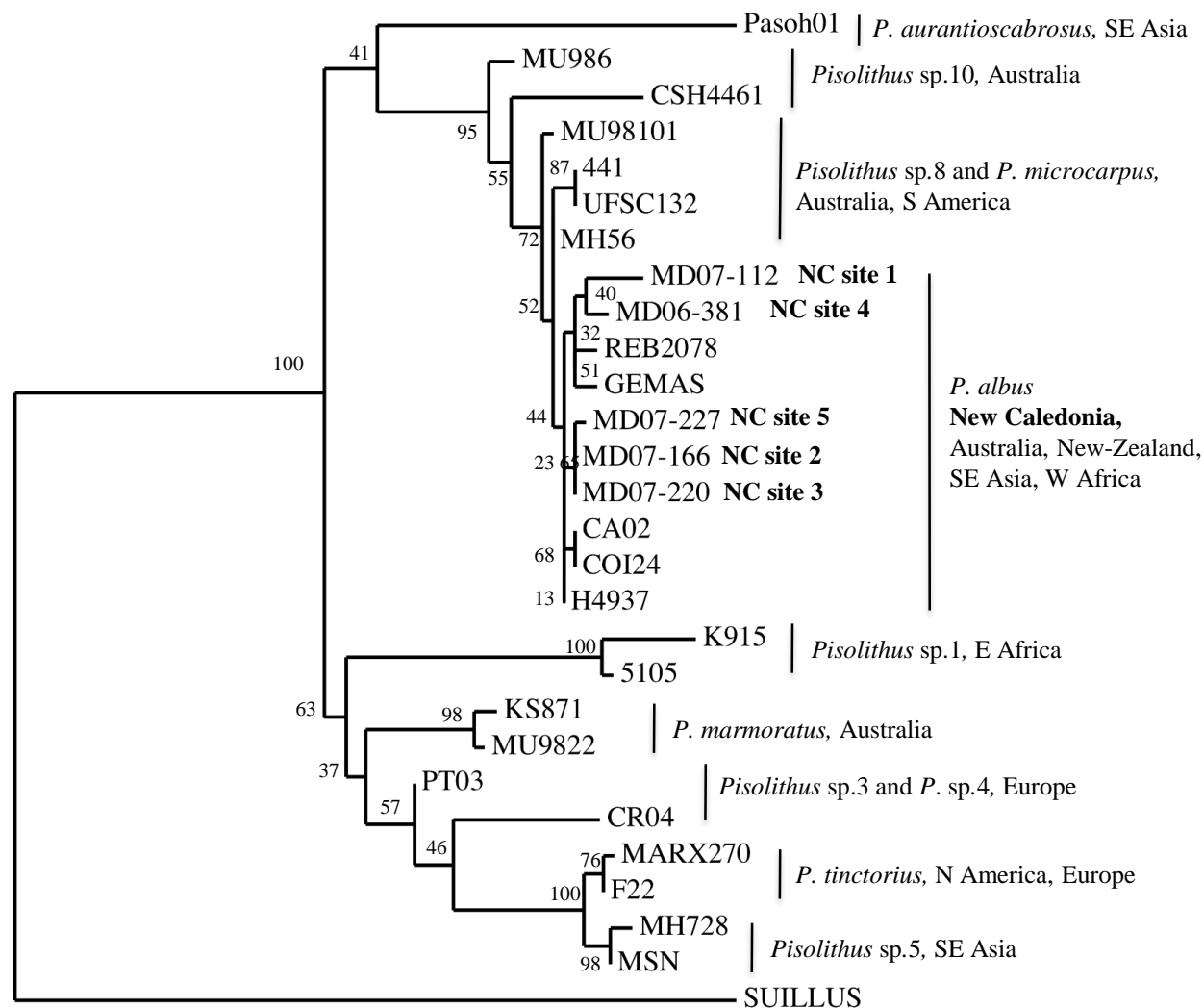
## 2-3 : Diversité et structure des populations de *Pisolithus albus* en Nouvelle-Calédonie



## 2-3 : Diversité et structure des populations de *Pisolithus albus* en Nouvelle-Calédonie



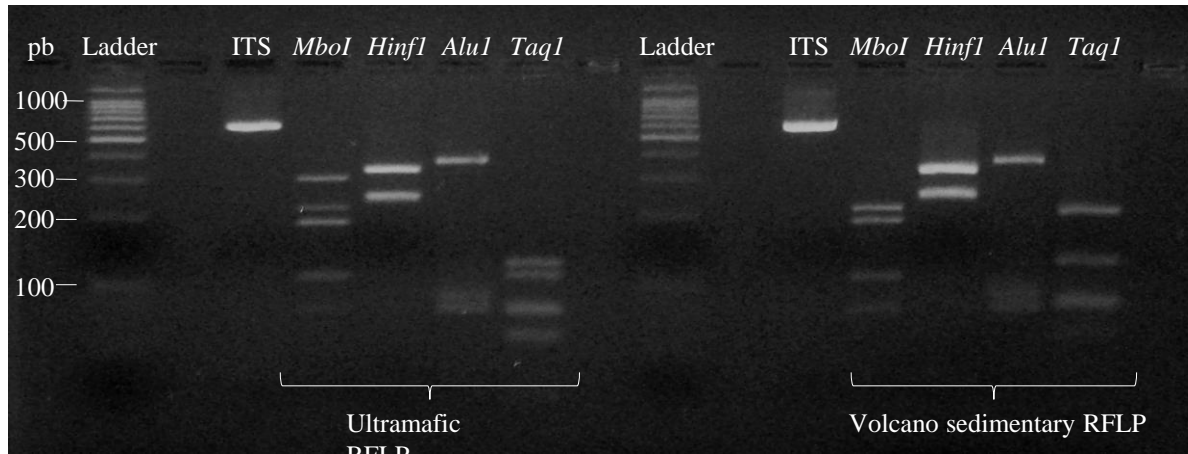
## 2-3 : Diversité et structure des populations de *Pisolithus albus* en Nouvelle-Calédonie



0.1

## 2-3 : Diversité et structure des populations de *Pisolithus albus* en Nouvelle-Calédonie

### Profil RFLP ITS



### Tolérance au Nickel

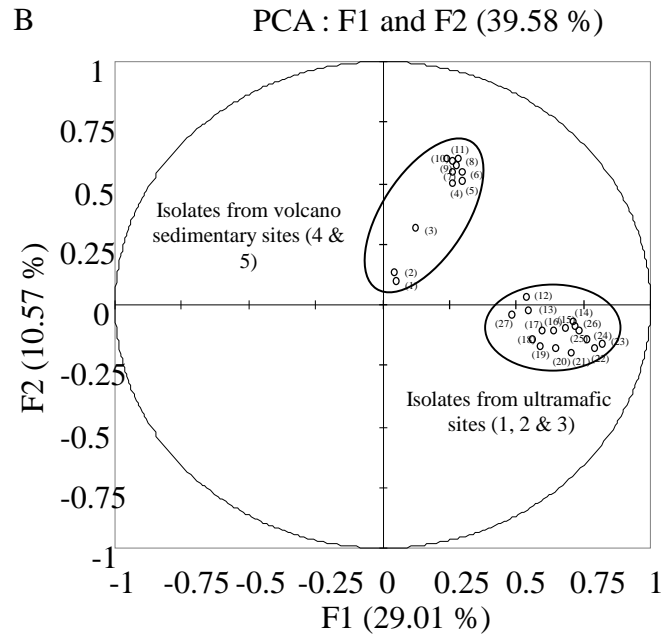
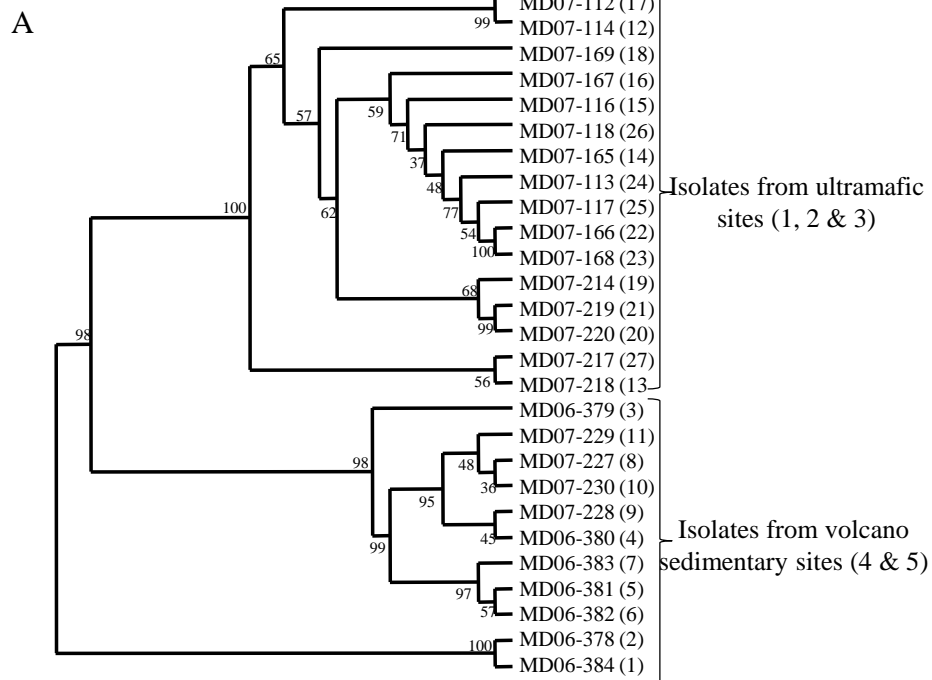
#### Sols Ultramafiques

55 % des échantillons tolérants au Ni avec  $EC_{50} = 575 \mu\text{M}$

45 % des échantillons sensibles au Ni avec  $EC_{50} = 37 \mu\text{M}$

#### Sols volcano-sédimentaires

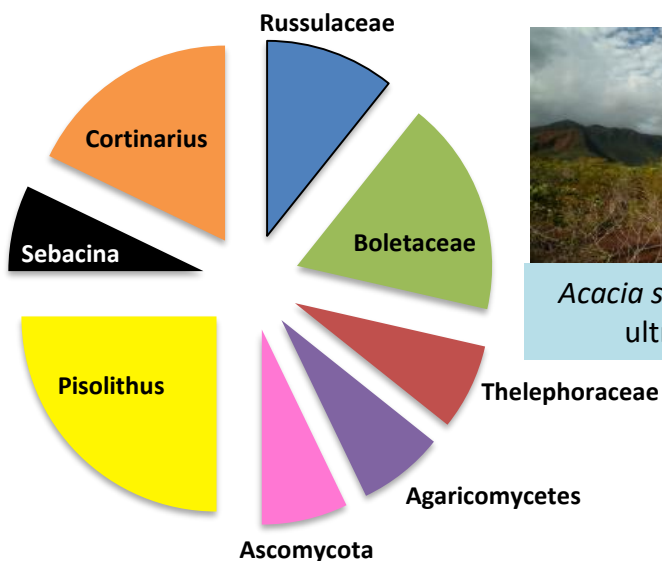
100 % des échantillons sensibles au Ni avec  $EC_{50} = 30 \mu\text{M}$



## 2-4 : Diversité et structure des populations de champignons ectomycorhiziens associées à *Acacia spirorbis*

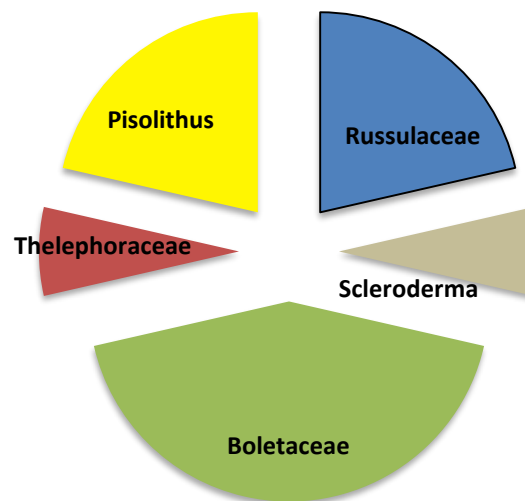
### PAND (sol ultrabasique)

D = 0,10



### PIND (sol volcano-sédimentaire)

D = 0,18



➔ **Des éléments communs** : les contraintes des sols ultrabasiques affectent peu la diversité

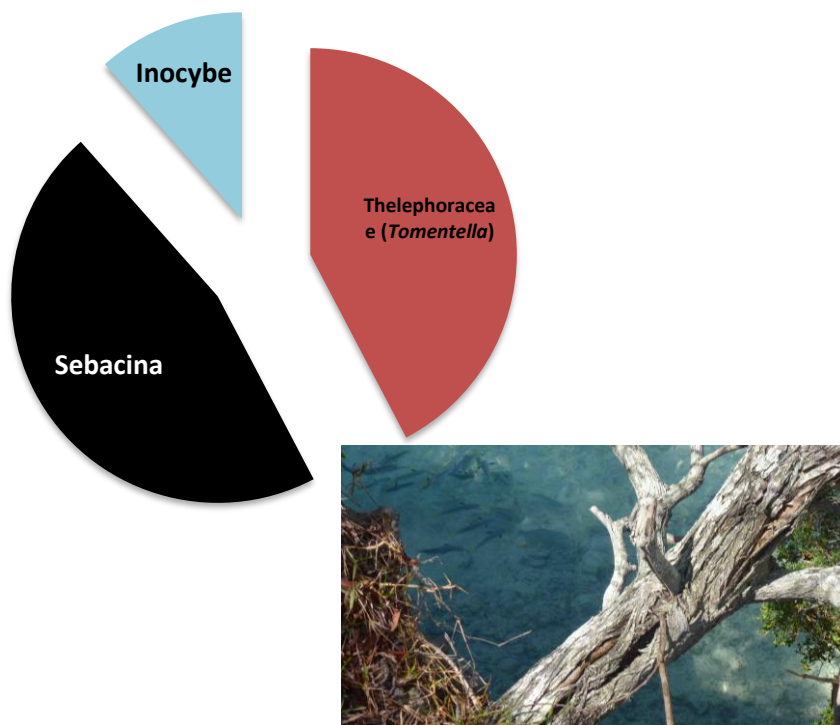
➔ Hypothèses : Structures en écotypes et variations adaptatives

## 2-4 : Diversité et structure des populations de champignons ectomycorhiziens associées à *Acacia spirorbis*

### • Diversité et type de sol

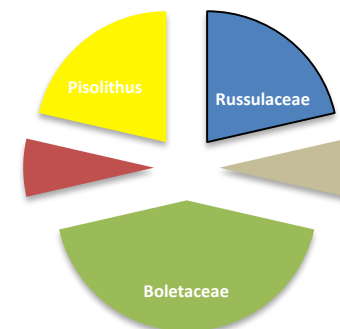
EAS (sol calcaire)

D = 0,38



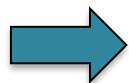
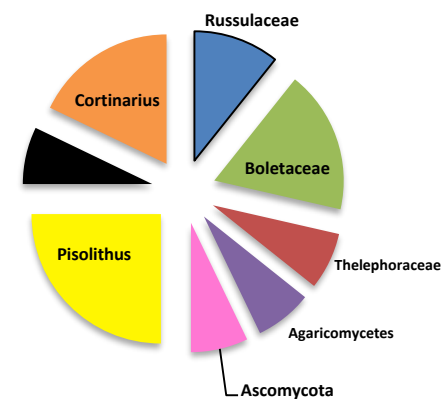
PIND (sol volcano-sédimentaire)

D = 0,18



PAND (sol ultrabasique)

D = 0,10



Diversité très différente et réduite sur sols calcaires

## 2-4 : Diversité et structure des populations de champignons ectomycorhiziens associées à *Tristaniopsis* spp.

Waseem M., **Ducousso M.**, Prin Y., Domergue O., Hannibal L., Majorel C., Jourand P., Galiana A. (2017) - Ectomycorrhizal fungal diversity associated with endemic *Tristaniopsis* spp. (Myrtaceae) in ultramafic and volcano-sedimentary soils in New Caledonia. *Mycorrhiza* 27(4):407-413. DOI: 10.1007/s00572-017-0761-4



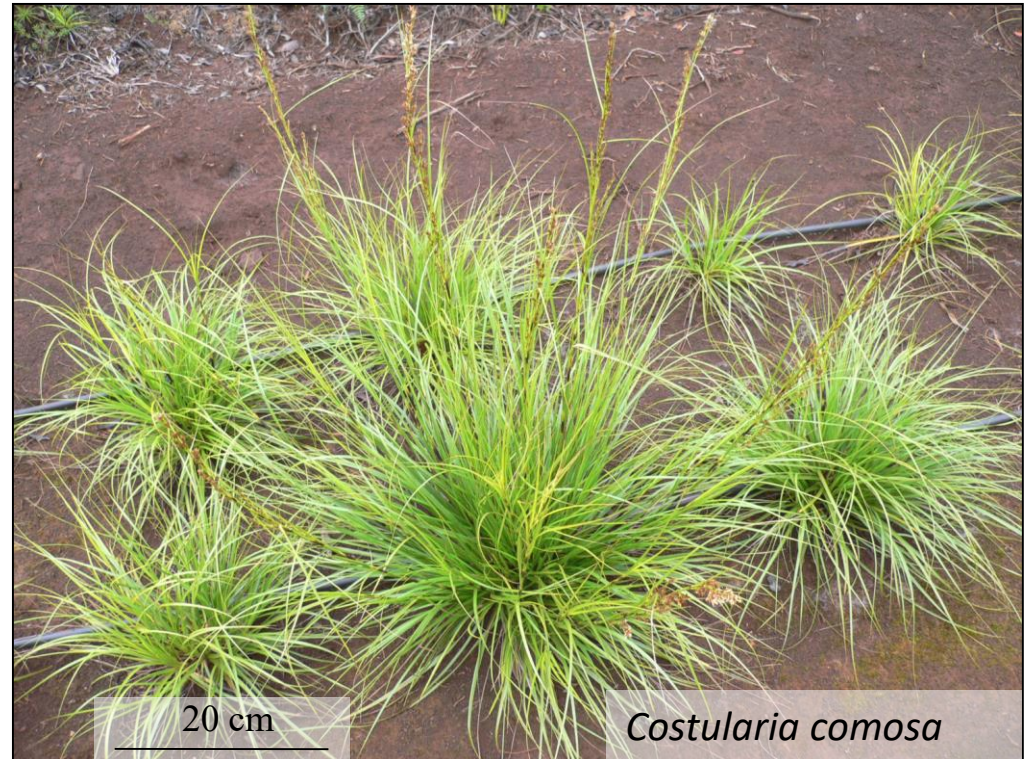
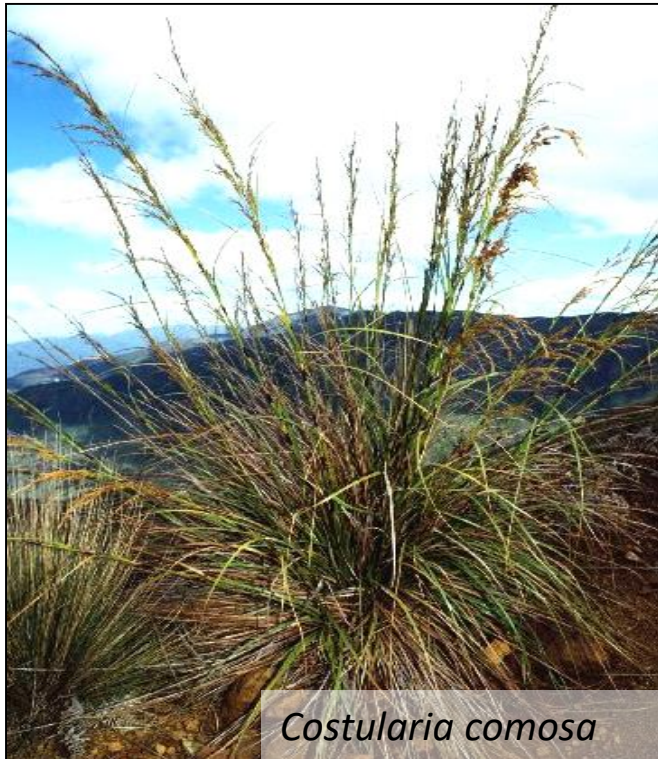
## 2-5 : Diversité et structure des populations de rhizobium associés à *Acacia spirorbis*

Travaux en cours dans le cadre de la thèse de Bryan VINCENT.  
Publication prévue pour début 2019.

# 3- Interactions Plantes - Microorganismes

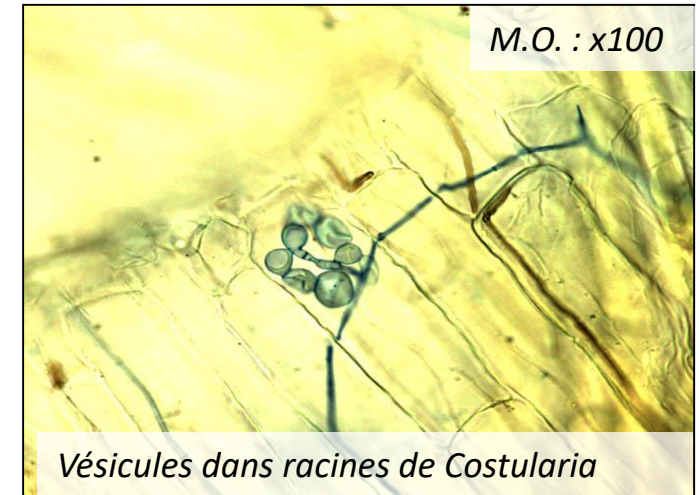
## 3-1 : Des Cypéracées capables d'établir et de tirer bénéfice de la symbiose mycorhizienne

- 5000 espèces, ubiquistes, 27 espèces endémiques de NC, *Costularia* genre majeur : 10 espèces endémiques des maquis miniers.



### 3-1 : Des Cypéracées capables d'établir et de tirer bénéfice de la symbiose mycorhizienne

- 9 espèces pionnières
- 4 sites d'études (maquis ligno-herbacés)  
Koniambo, Plum, Prony, Plaine des lacs
- Echantillonnage des fragments racinaires
- Coloration au bleu Trypan
- Calcul des taux de mycorhization
  - Fréquence de mycorhization  
$$F \% = \frac{\text{nbre de fragments mycorhizés}}{\text{nbre de fragments observés}}$$
  - Intensité de mycorhization  
$$M \% = \frac{\text{quantité moyenne de structures mycorhiziennes}}{\text{des fragments}}$$

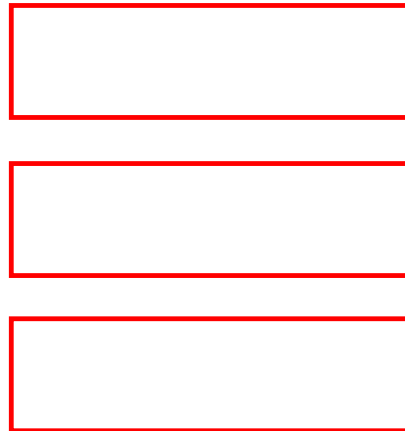


### 3-1 : Des Cypéracées capables d'établir et de tirer bénéfice de la symbiose mycorhizienne

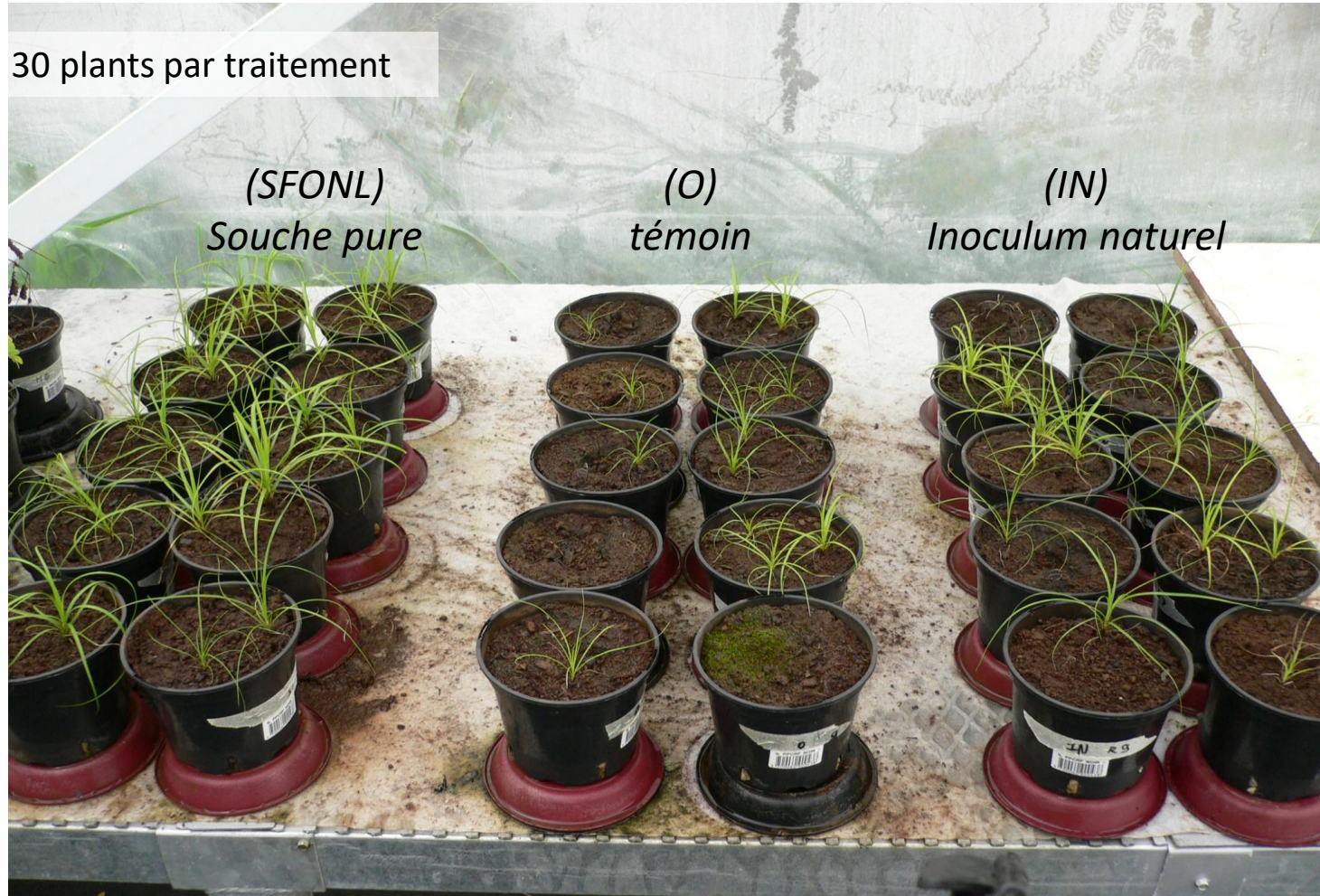
⇒ Colonisation des racines faible et variable

⇒ % de colonisation plus importants chez les espèces du genre *Costularia* sp.

⇒ Recherche des modifications physiologiques apportées par la mycorhization ?

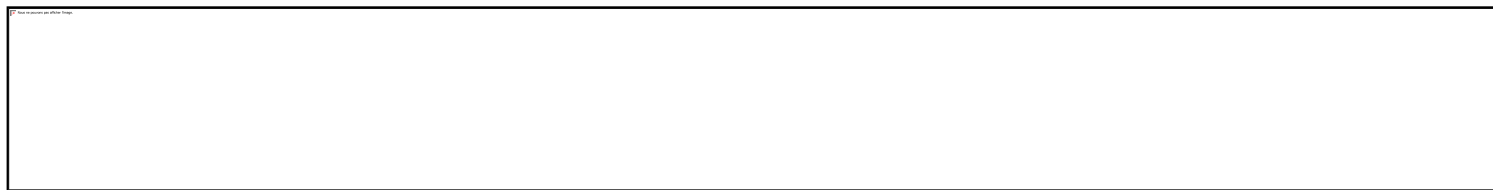


### 3-1 : Des Cypéracées capables d'établir et de tirer bénéfice de la symbiose mycorhizienne



## 3-1 : Des Cypéracées capables d'établir et de tirer bénéfice de la symbiose mycorhizienne

- **Corrélation**

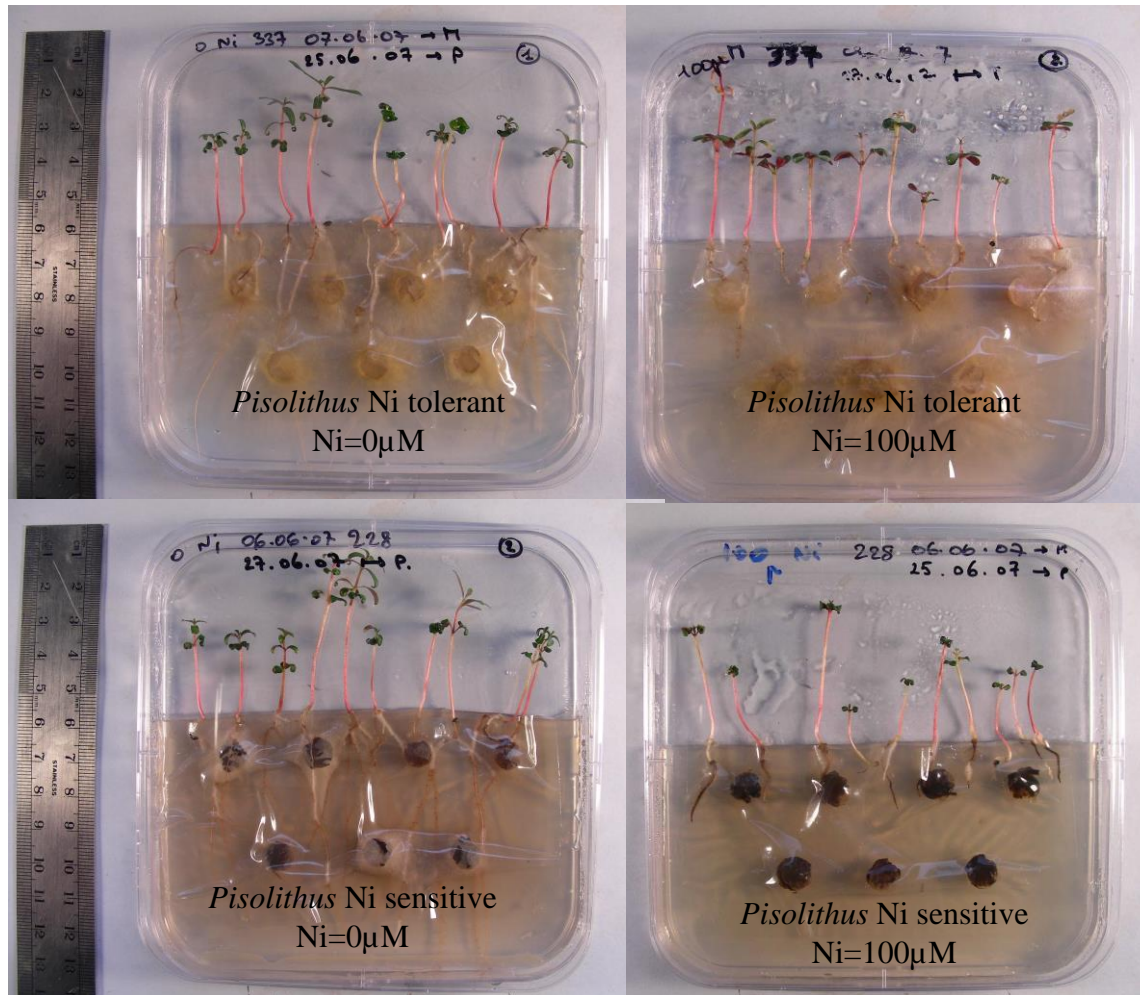


\*\* : Significantly different for  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* : Significantly different for  $P \leq 0,001$  ; **n = 48**

⇒ Corrélations positives entre % AM et croissance

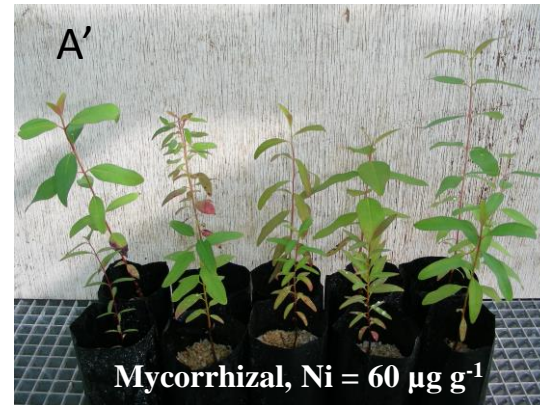
### 3-2 : Des écotypes de *Pisolithus albus* aux capacités symbiotiques différentes

Test d'inoculation d'écotypes ultramafique de *Pisolithus albus* tolérant au Ni sur plante hôte modèle (*Eucalyptus globulus*)



### 3-2 : Des écotypes de *Pisolithus albus* aux capacités symbiotiques différentes

Test d'inoculation d'écotypes ultramafique de *Pisolithus albus* tolérant au Ni sur plante hôte modèle (*Eucalyptus globulus*)

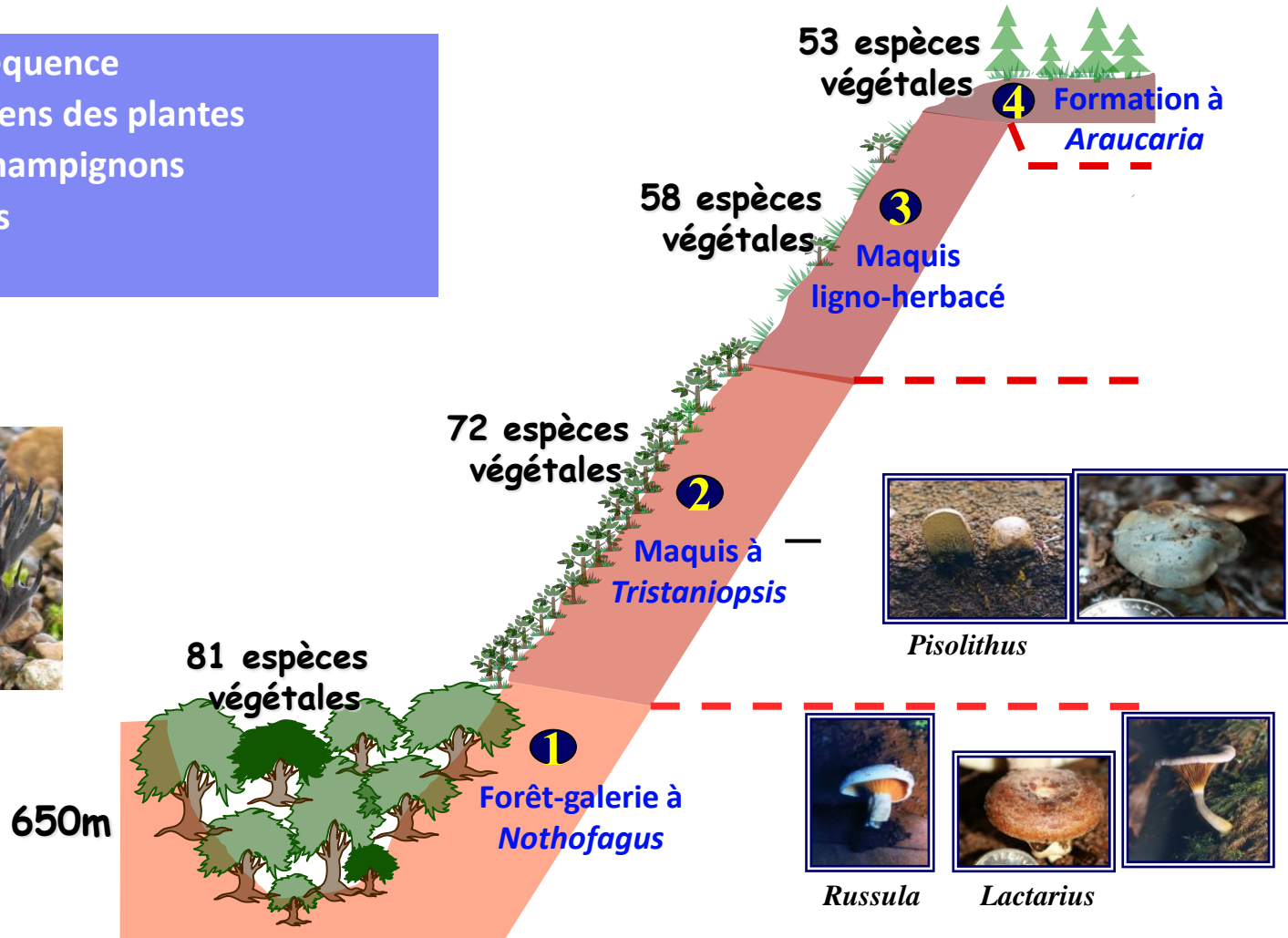
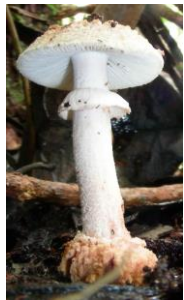






# Synthèse 1-, 2- et 3-

- Etude d'une toposéquence
- Etats mycorhiziens des plantes
- Diversité des champignons ectomycorhiziens



# 4- Fonctionnement génomique sous stress métallique

## 4-1 : Identification de déterminants génétiques de l'adaptation chez *Pisolithus albus*

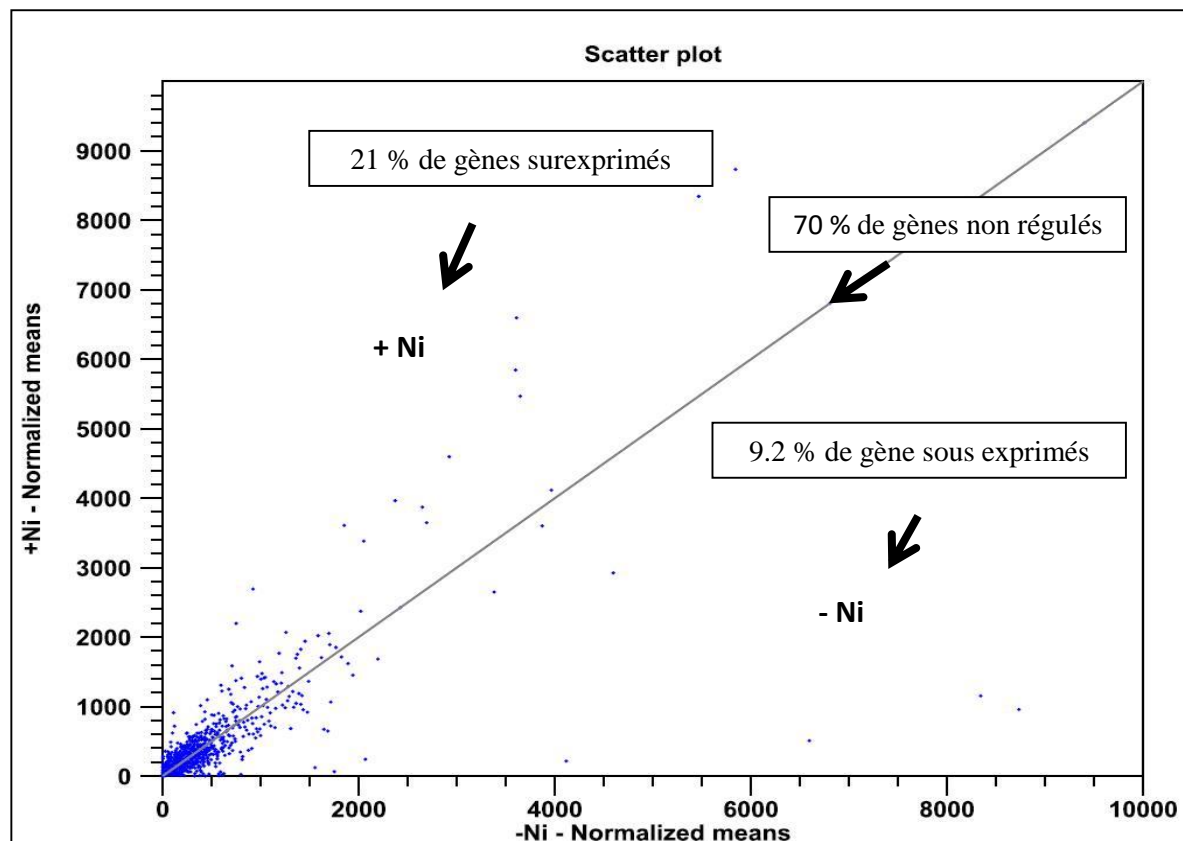
### 1<sup>ère</sup> étape de la démarche scientifique :

- Le nickel (Ni) : marqueur de la contrainte édaphique ultramafique (métal le + toxique)
- Analyse comparée de transcriptome de *P. albus* Ni-tolérant et Ni-sensitive en présence et en absence de nickel: acquisition de métadonnée transcriptomique (base de donnée)
- Recherche dans la base de donnée transcriptomique de marqueurs moléculaires de la tolérance au nickel

## 4-1 : Identification de déterminants génétiques de l'adaptation chez *Pisolithus albus*

### Résultats :

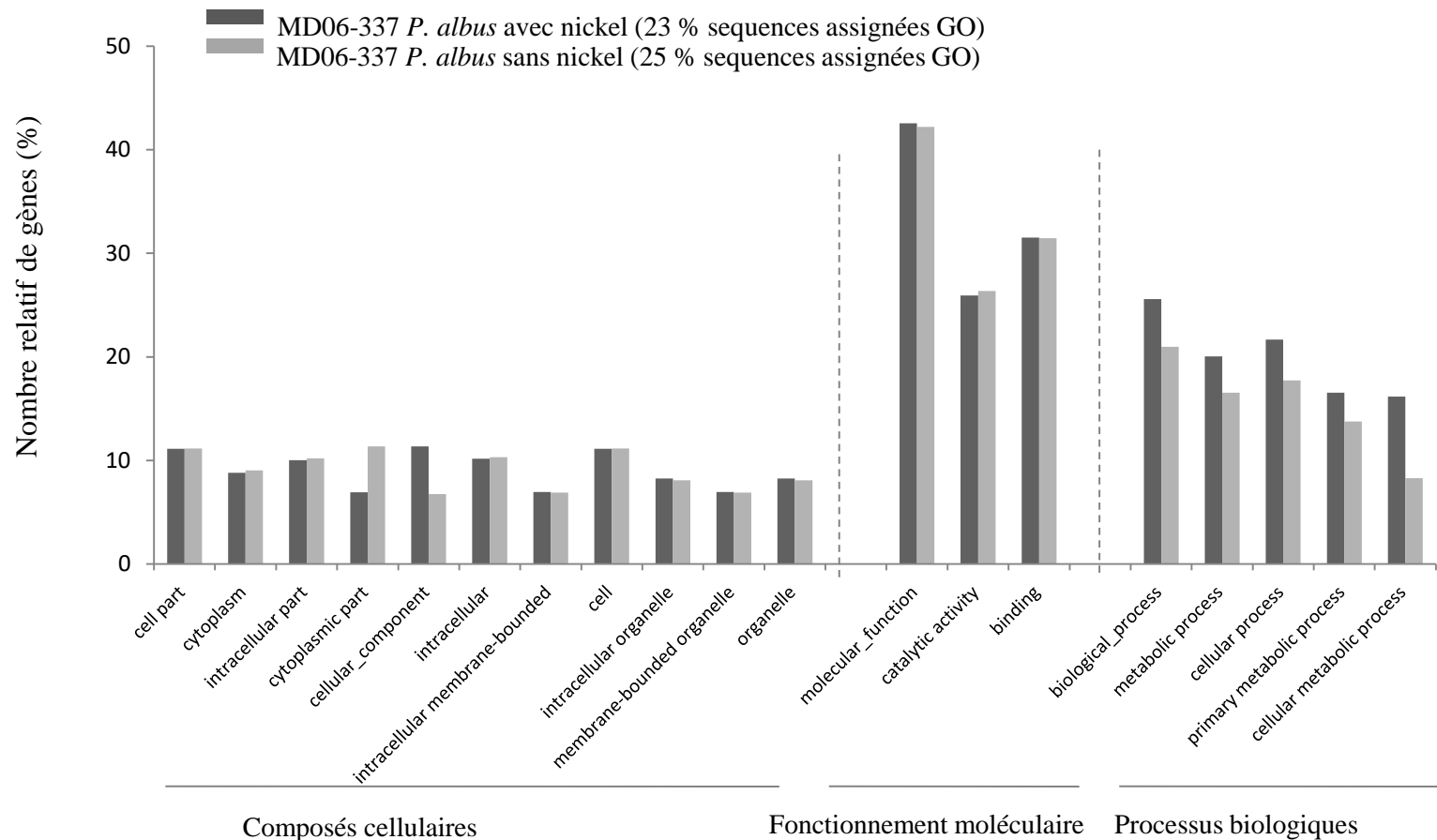
≈ 20 % du génome transcrit est induit en présence de nickel



## 4-1 : Identification de déterminants génétiques de l'adaptation chez *Pisolithus albus*

### Résultats (suite)

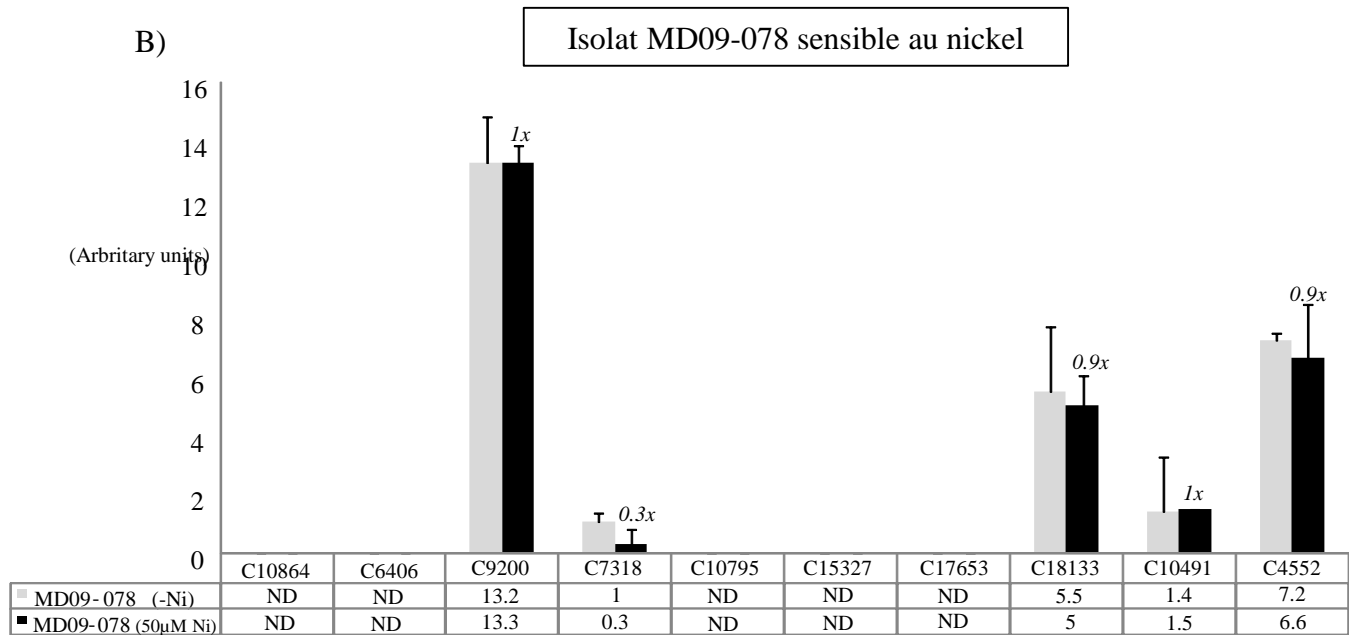
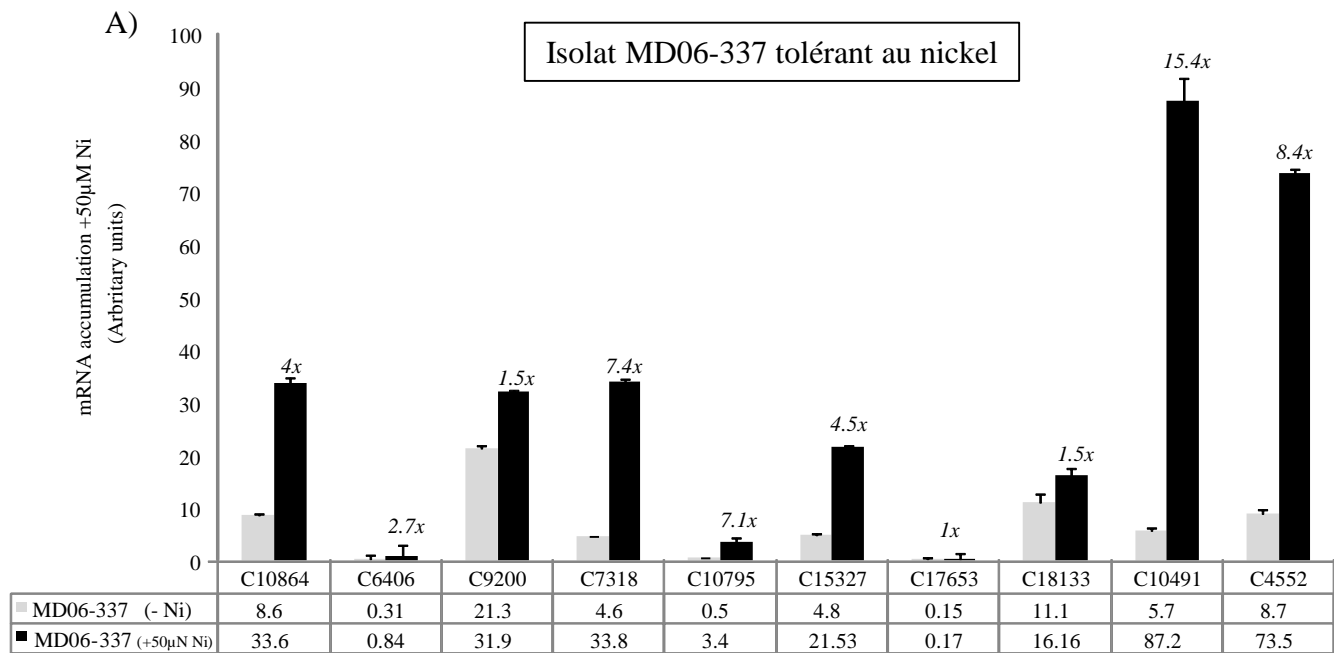
- Les gènes induits par le Ni couvrent l'ensemble des fonctions cellulaires et métaboliques



## 4-1 : Identification de déterminants génétiques de l'adaptation chez *Pisolithus albus*

### 2<sup>ème</sup> étape de la démarche scientifique (suite)

- Recherche et sélection dans le transcriptome exprimé du « top 10 » des gènes les + induits par le nickel
- Comparaison des niveau d'expression de ces gènes chez *P. albus* Ni-tolérant et Ni-sensitive en présence et en absence de nickel.



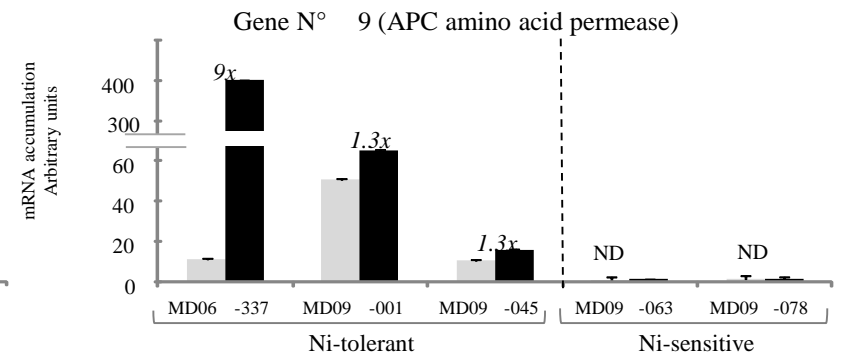
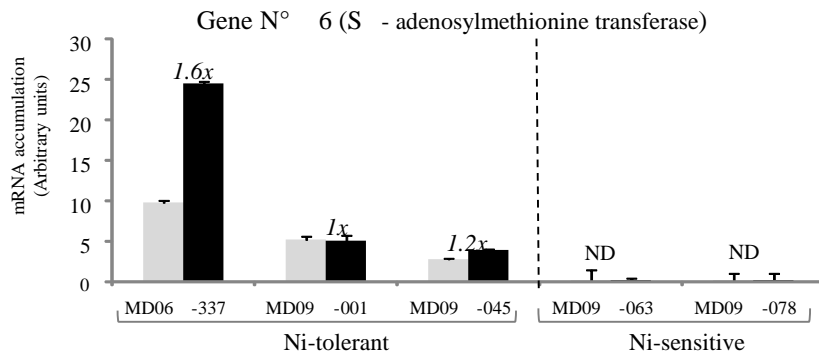
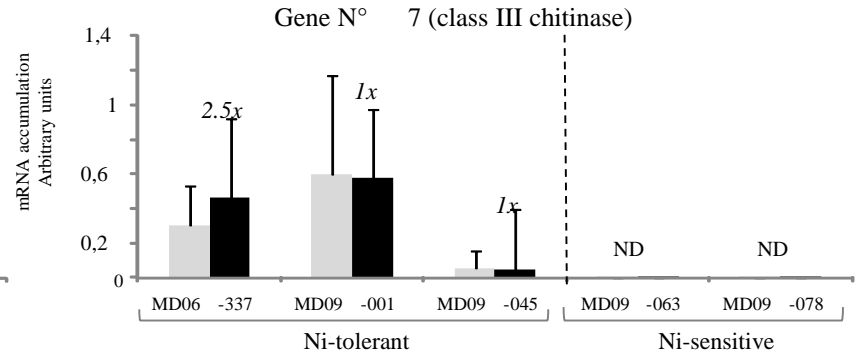
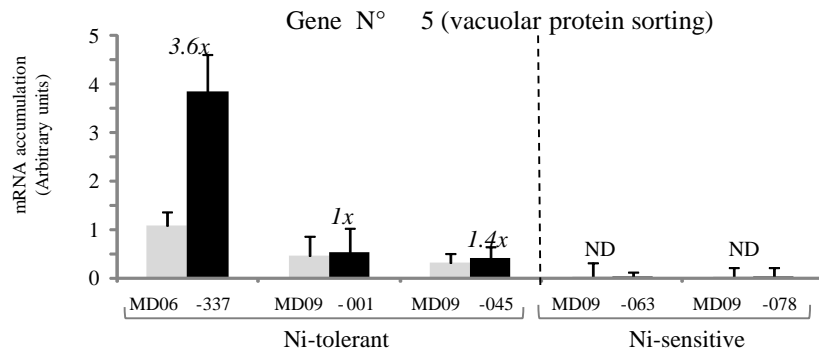
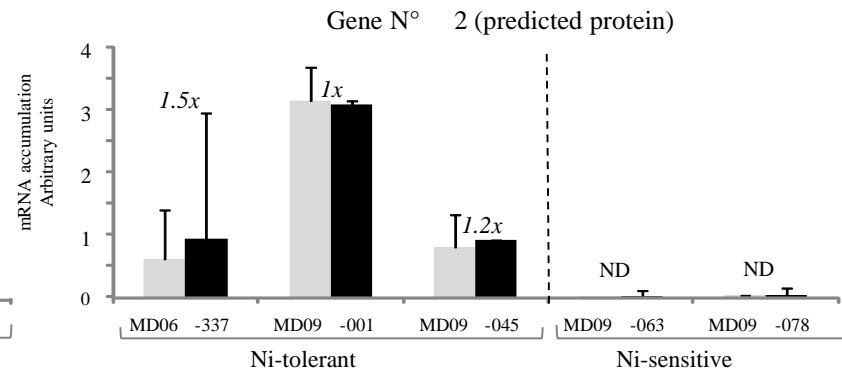
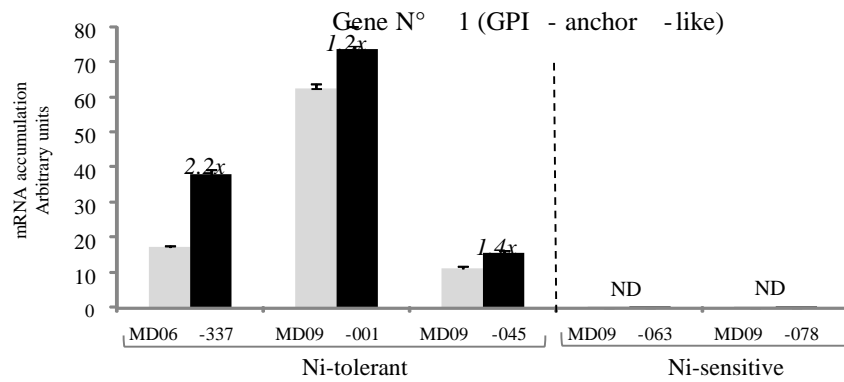
## 4-1 : Identification de déterminants génétiques de l'adaptation chez *Pisolithus albus*

### Résultats majeurs :

- Des gènes sont spécifiquement et exclusivement induits chez les isolats de *P. albus* Ni-tolérant.
- Ces gènes sont impliqués dans la synthèse de la paroi (chitine) ou le métabolisme régulant le flux du métal (perméase / transférase)

Vérification de cette spécificité d'expression de ces gènes chez d'autres isolats de *P. albus*





#### 4-1 : Identification de déterminants génétiques de l'adaptation chez *Pisolithus albus*

### Conclusions majeures :

- Des gènes sont spécifiquement et exclusivement induits chez les isolats de *P. albus* Ni-tolérant.
- Ces gènes sont potentiellement des marqueurs de l'adaptation du champignon ECM à la contrainte édaphique ultramafique

**Ensemble de résultats publiés dans l'article  
Majorel *et al.*, 2012, revue *Molecular Ecology*  
(vol 21, pp 2208-2223)**

## Conclusion de ces travaux

- Des écosystèmes hyper diversifiés et originaux (plantes, animaux, champignons et bactéries)

⇒ *Connaissance de la diversité et de l'organisation des groupes fonctionnels*

- La contrainte ultrabasique reste complexe même si le fer est un élément central : difficulté à mobiliser le phosphore. Importance du magnésium et des métaux lourds, notamment le nickel.

⇒ *Connaissance du sol et de ses contraintes*

- Les champignons mycorhiziens et les microorganismes en général contribuent à l'adaptation de leurs plantes hôtes à leurs environnements, notamment en réduisant le transfert de métaux vers les parties aériennes et en améliorant la croissance des plantes hôtes.

⇒ *Nécessité de maîtriser de la composante microbienne de ces sols*

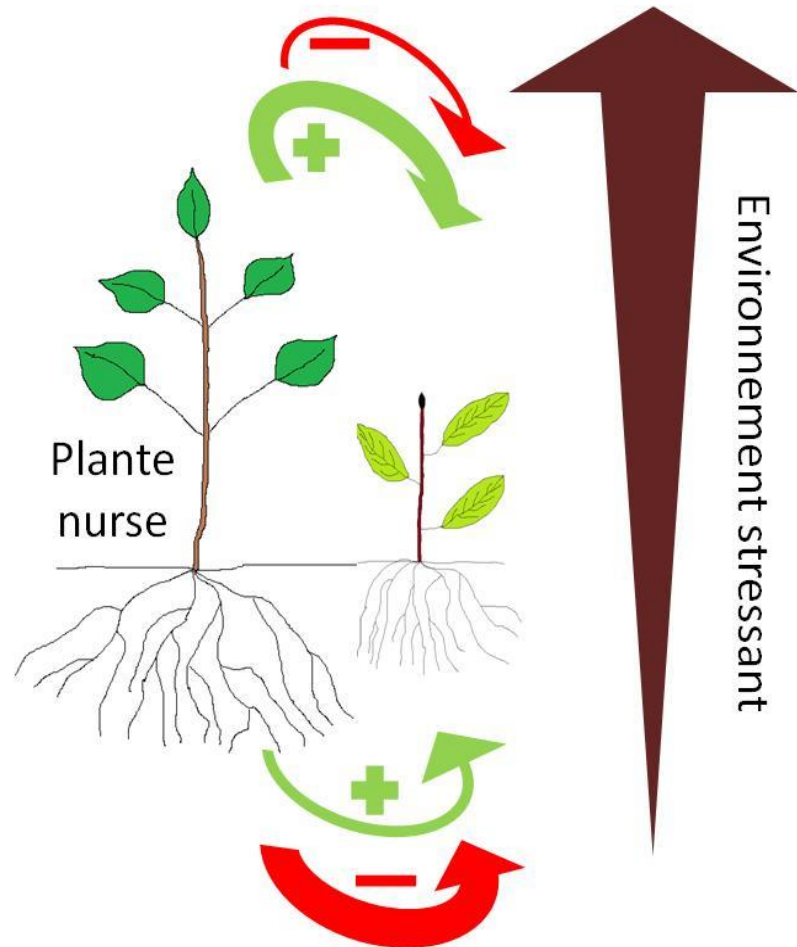
# => Propositions d'itinéraires techniques de réhabilitation

## La symbiose mycorhizienne, un partenaire clé du processus de facilitation entre plantes

Competition

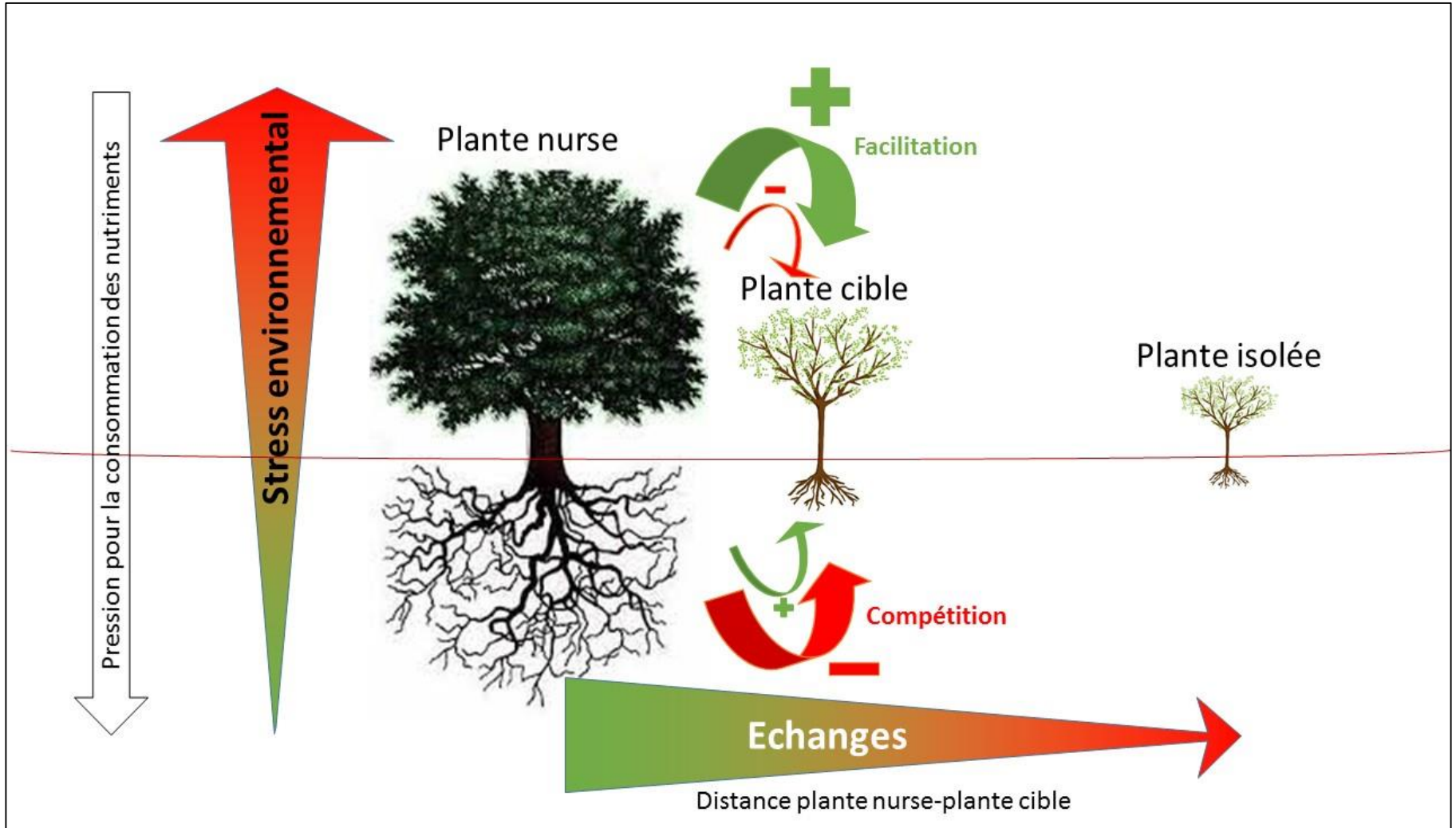


Facilitation

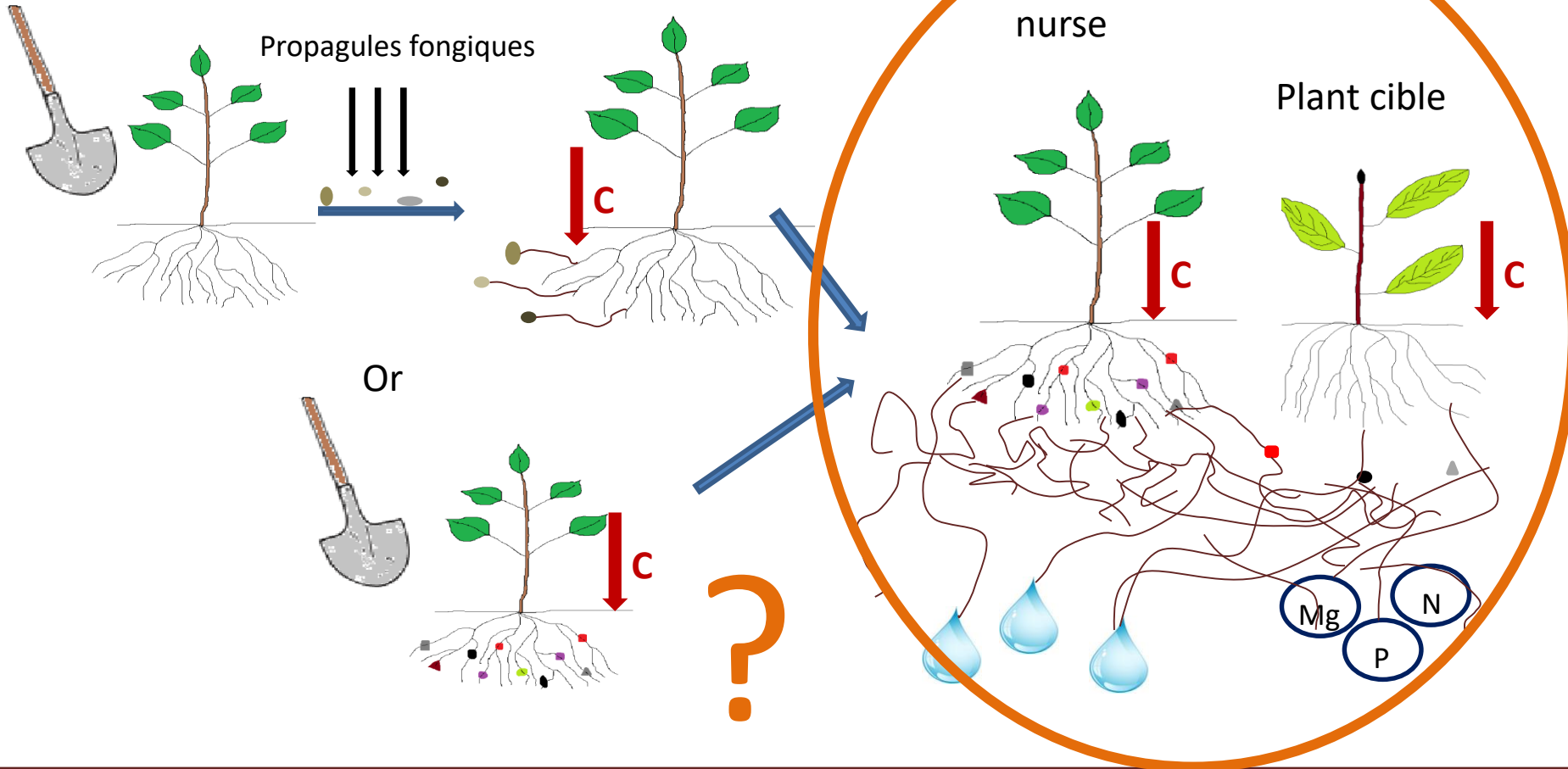


# Principe du système Plante nurse – Plante cible

(Padilla et Pugnaire, 2006)



# Processus de restauration écologique



# Espèces ectomycorhiziennes localement dominantes des maquis de Nouvelle-Calédonie



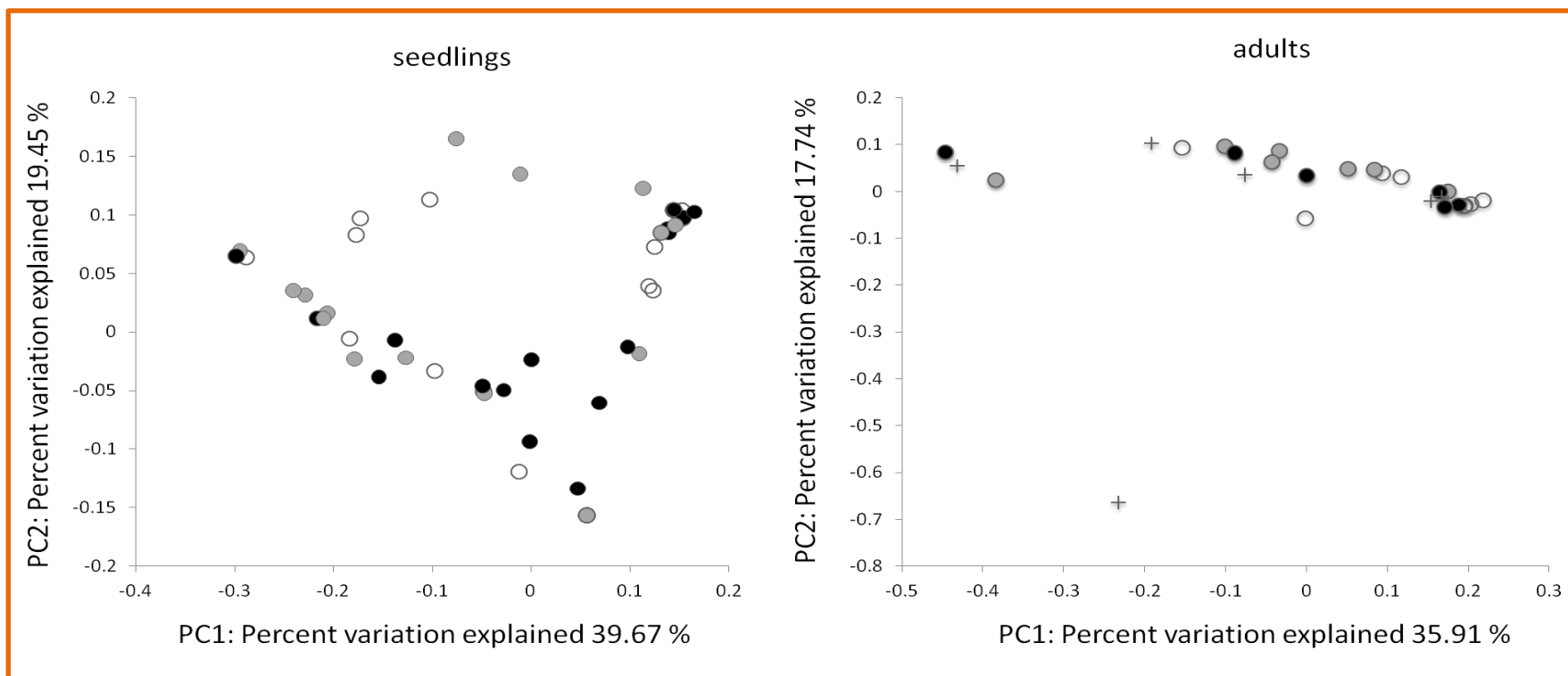
## Espèces ectomycorhiziennes localement dominantes des forêts naturelles malgaches

|                         | <i>Leptolaena sp.</i> | <i>Sarcolaena sp.</i> | <i>Asteropeia mcphersonii</i> | <i>Uapaca densifolia</i> |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------|--------------------------|
| <b>Famille</b>          | <i>Sarcolanaceae</i>  | <i>Sarcolanaceae</i>  | <i>Asteropeiaceae</i>         | <i>Phyllanthaceae</i>    |
| <b>Semis en forêt</b>   | <b>Faible</b>         | Non                   | <b>Abondant</b>               | <b>Oui</b>               |
| <b>Semis sur sol nu</b> | Non                   | Non                   | <b>Abondant</b>               | Non                      |



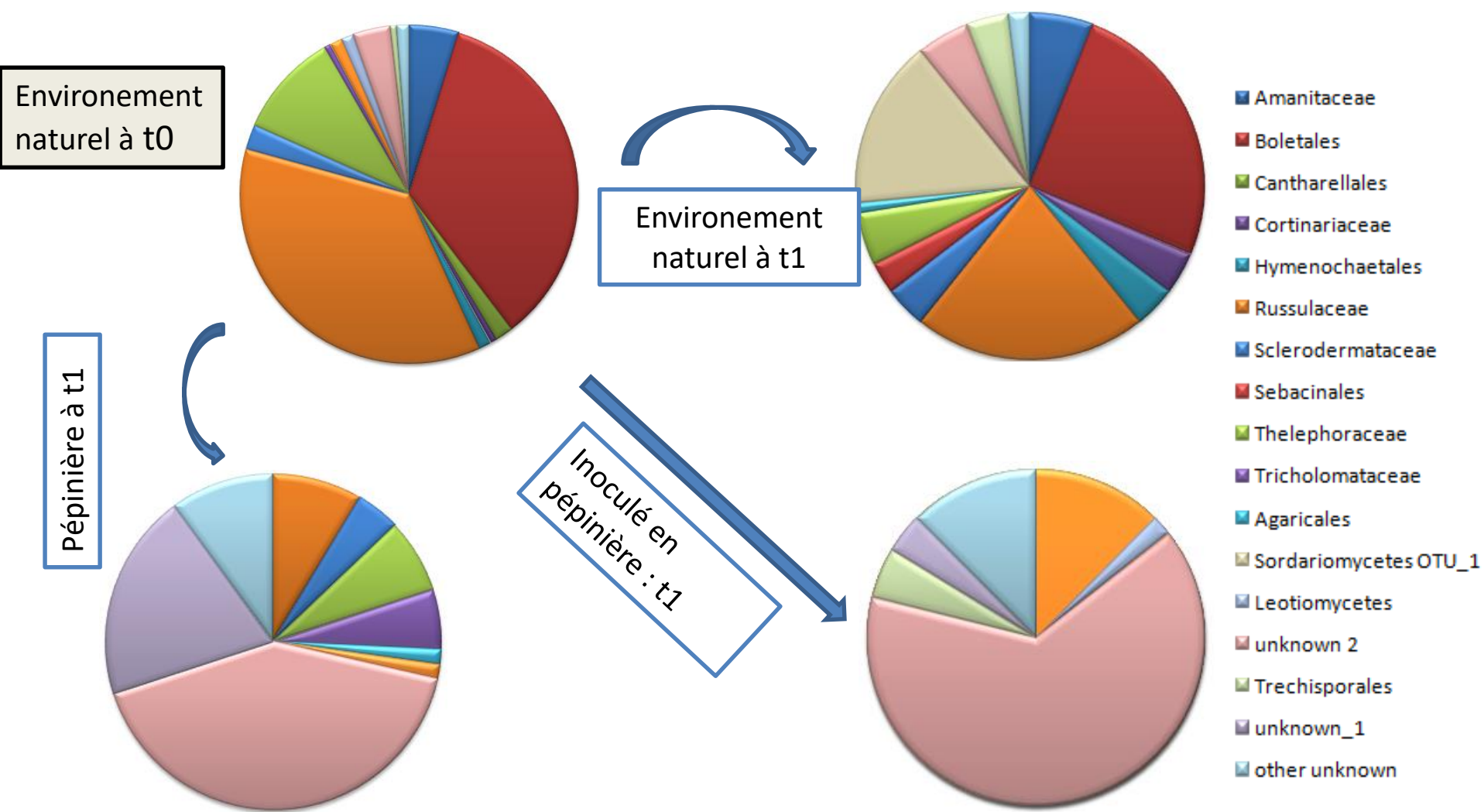
# Caractérisation des ectomycorhizes d'un site minier à Madagascar : partage des cortèges

Les arbres adultes et les semis partagent majoritairement les mêmes partenaires



● *Asteropeia mcphersonii* ○ *Leptolaena sp.* ● *Uapaca densifolia* + *Sarcolaena sp.*

# Contrôle de la mycorhization dans le cadre d'un itinéraire de réhabilitation d'un site minier à Madagascar

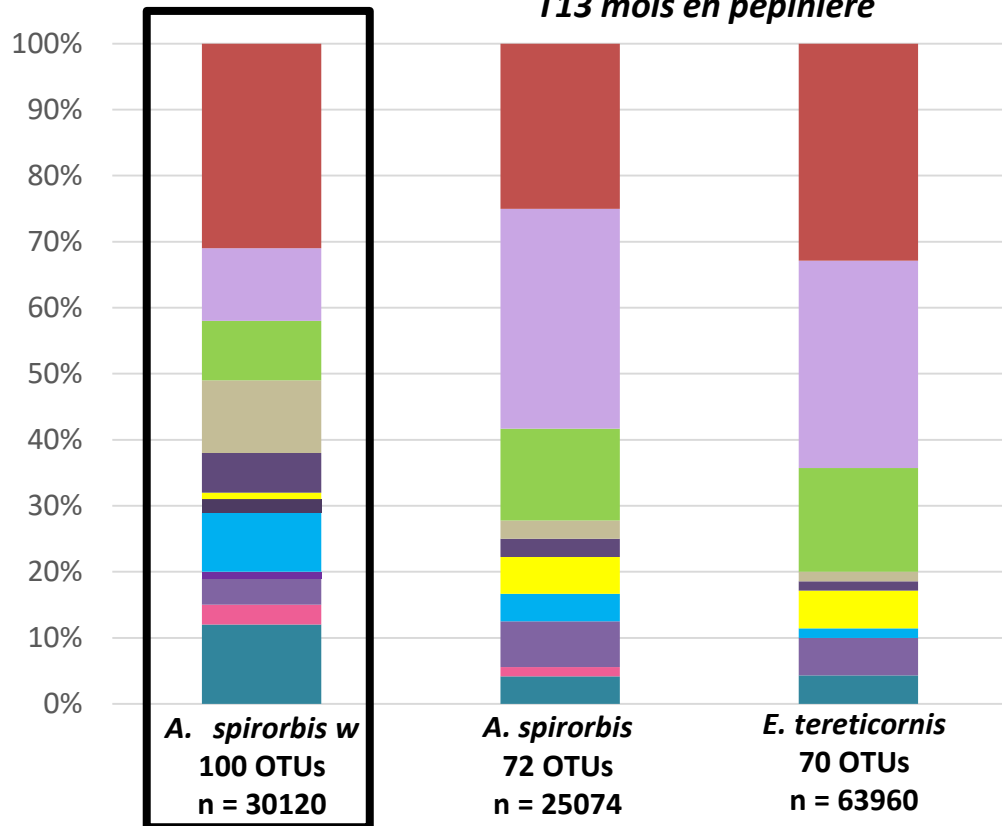


# Contrôle de la mycorhization dans le cadre d'un itinéraire de réhabilitation d'un site minier en Nouvelle-Calédonie

Analyse de la diversité ectomycorhizienne en pépinière en fonction du type de sol  
 Sur les sols SAS (sols sous *A. spirorbis* : AS1, AS2 et AS3)

T0 en mine

T13 mois en pépinière

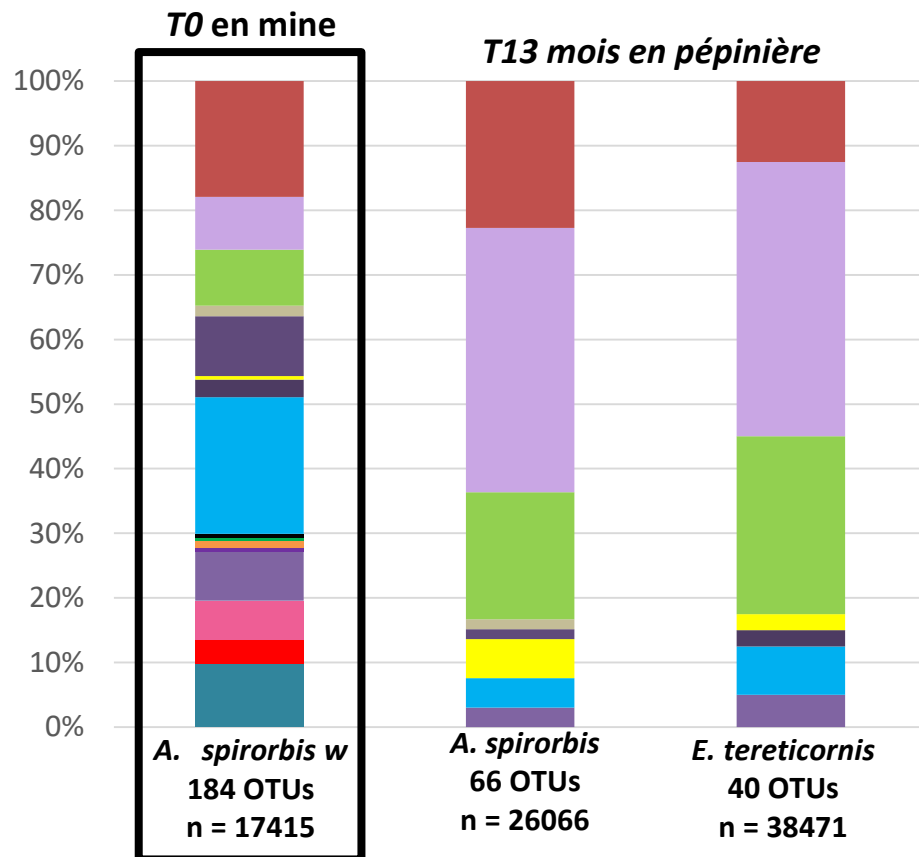


- 10/12 lineages présents sur les arbres des sols prélevés sont identifiés sur les plants semés sur ces mêmes sols
- *Thelephoraceae* stables
- + Sordariales et Sebaciales
- - de Sclerodermataceae, Helotiales, Eurotiales
- 25-30 % - d'OTUs mais jusqu'à 100 % + de séquences (*E. tereticornis*)



# Contrôle de la mycorhization dans le cadre d'un itinéraire de réhabilitation d'un site minier en Nouvelle-Calédonie

Analyse de la diversité ectomycorhizienne en pépinière en fonction du type de sol  
 Sur les sols **STG (sols sous *T. guillainii* : TG1, TG2 et TG3)**



- 8/16 lineages présents sur les arbres des sols prélevés sont absents sur les plants semés sur ces mêmes sols.
- *Thelephoraceae* stables
- + *Sordariales* et *Sebacinales*
- Les autres lineages sont absents ou beaucoup moins présents
- 300-400 % - d'OTUs mais 75-100 % + de séquences (*E. tereticornis*)



# Contrôle de la mycorhization dans le cadre d'un itinéraire de réhabilitation d'un site minier en Nouvelle-Calédonie



**T0**

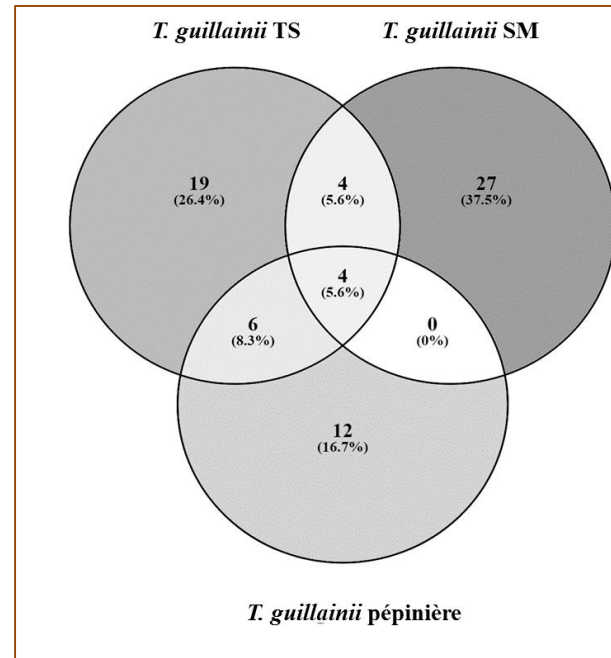
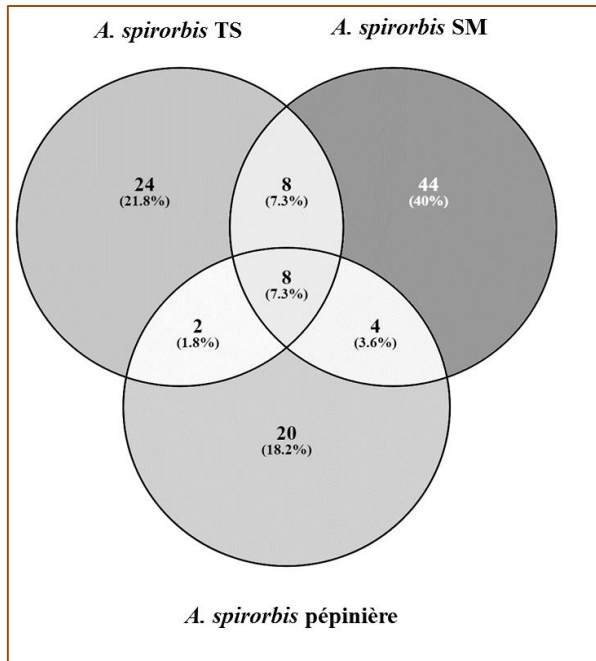


**T 8 months**



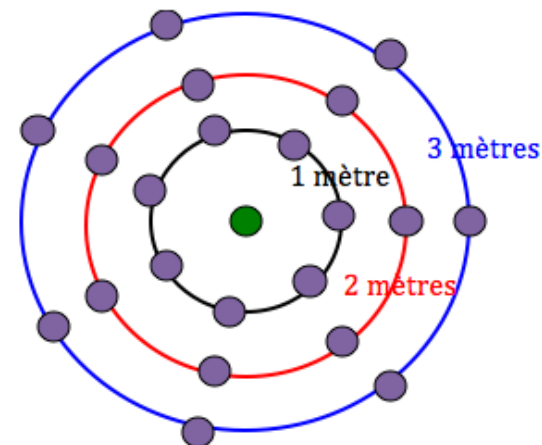
**T 1 year**

# Diversité fongique ECM : Partage des taxons ECM



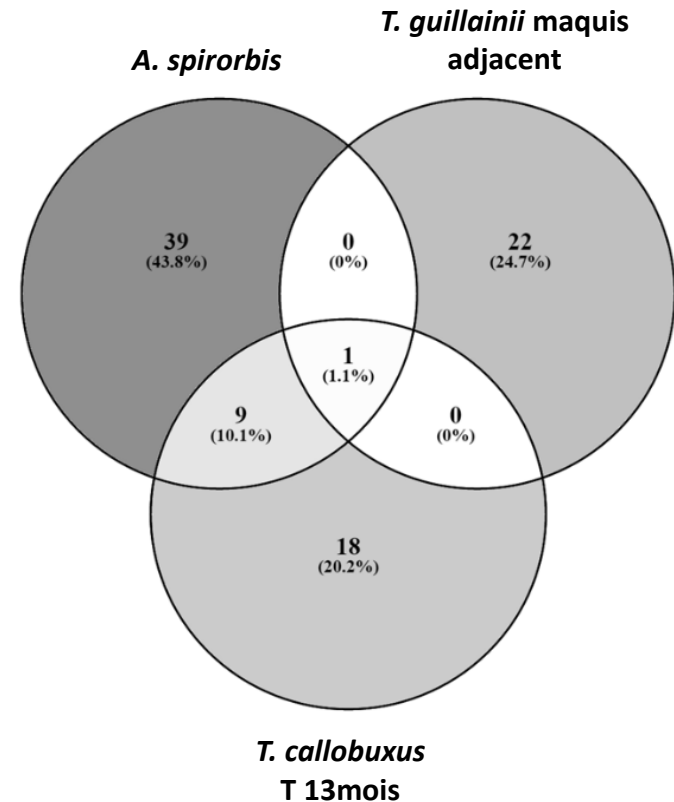
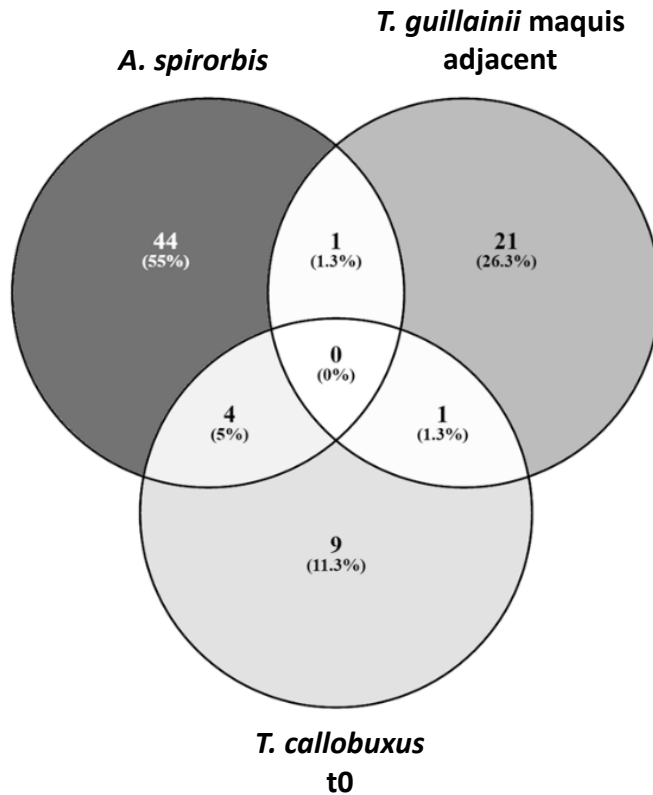
- Des partages des taxons en proportions similaires entre *T. guillainii* et *A. spirorbis* plantés
- La diversité taxonomique est plus importante sur les sols SM

# Contrôle de la mycorhization dans le cadre d'un itinéraire de réhabilitation d'un site minier en Nouvelle-Calédonie



**Estimation de la diversité  
des champignons  
ectomycorhiziens avec des  
outils moléculaires(NGS)**

# Diversité des champignons ECM associées aux plantes ECM



Enrichissement de la diversité de *T. callobuxus* et des taxons ECMs partagés avec l'espèce nurse *A. spirorbis*





# Merci de votre attention



# Trois définitions de base de la restauration écologique des sites dégradés

## Restauration écologique

Processus qui assistent l'autoréparation d'un écosystème qui a été endommagé, dégradé ou détruit.

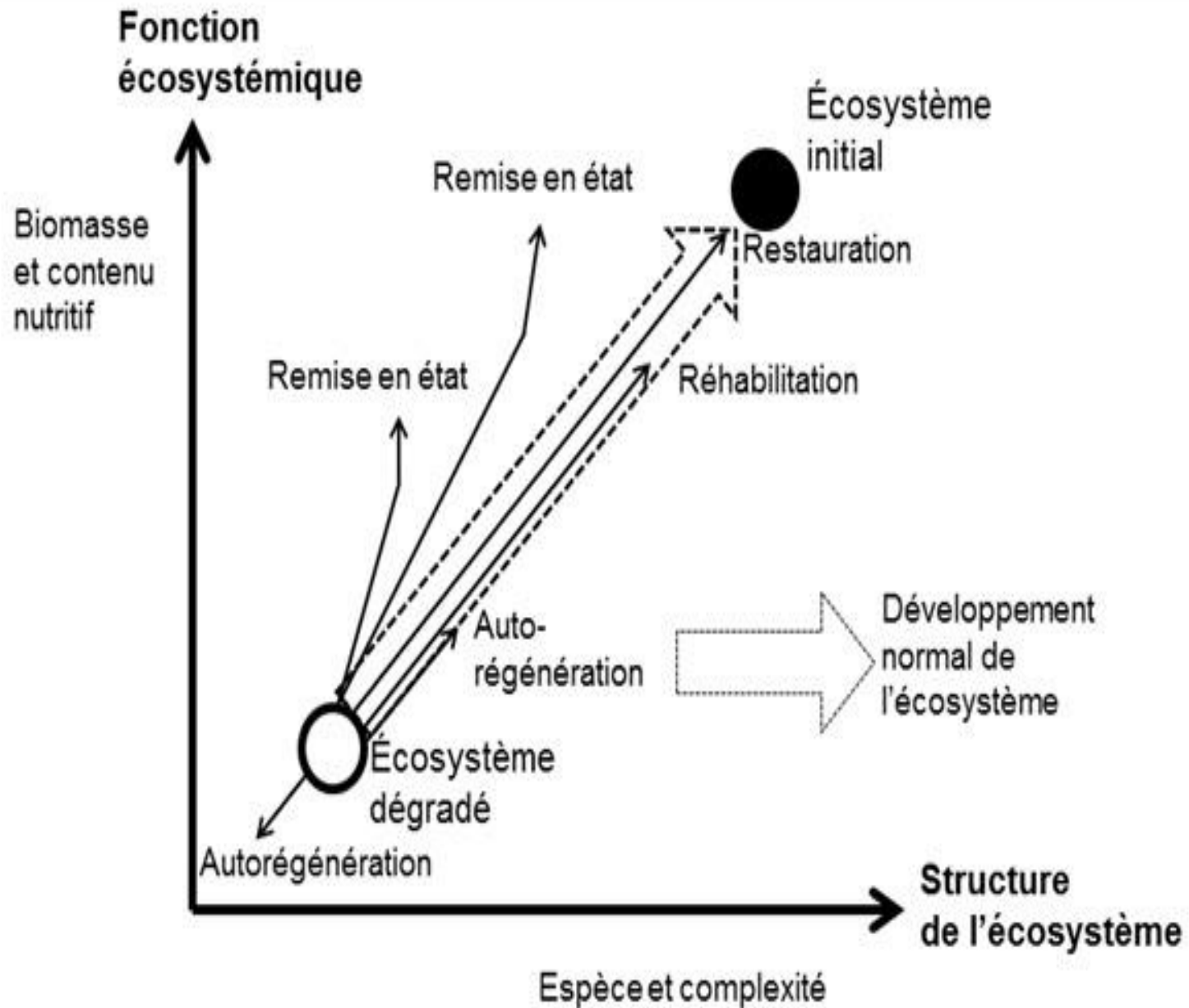
L'objectif étant de stopper le processus de dégradation et tenter de rétablir les fonctions essentielles et la structure générale (l'intégrité biotique préexistante au niveau de composition spécifique et de structure des communautés).

## Réhabilitation

Notion de réparation des processus, de la productivité et des services de l'écosystème.

## Réaffectation ou Remise en l'état

Mise en place d'un couvert végétal sans tenir compte de l'écosystème d'origine



**Différentes approches de la mise en place d'une végétation sur terrain dégradé (Bradshaw, 1997)**

# INTRODUCTION : La restauration écologique des sites dégradés

- **Hydroseeding avec des graminées sur les talus des pistes de mines**

→ Réaffectation



- **Plantation de graines/semis d'une centaine d'espèces** → Réhabilitation
- **Apport de terre végétale « topsoil » depuis les années 2000**