

Implications des symbioses racinaires dans la polluo-tolérance de plantes rares du littoral méditerranéen

Contexte de la recherche

La région méditerranéenne représente une région floristique exceptionnelle avec un fort taux d'endémisme (Médail and Quézel, 1999). Cependant, le littoral méditerranéen - «hotspot» de biodiversité (Médail and Verlaque, 1997) - est également un «hotspot» de croissance démographique humaine et constitue ainsi un des exemples phares des espaces sensibles méritant une attention toute particulière. L'urbanisation croissante entraîne des bouleversements notoires : (i) une «homogénéisation biotique», (ii) des changements d'occupation du sol et (iii) une augmentation des pollutions d'origine anthropique. A tout ceci s'ajoutent les changements climatiques alors que le littoral méditerranéen est déjà un milieu écologique typique de par des stress abiotiques spécifiques.

Dans l'état actuel des choses, **le littoral méditerranéen est ancré dans une situation paradoxale** : les formations végétales péri-urbaines, remarquables et originales, sont soumises à des perturbations environnementales et anthropiques croissantes. La région PACA est, par exemple, très concernée par les sols pollués suite aux activités industrielles (notamment l'extraction minière et la métallurgie), qui ont laissé derrière elles des sites fortement contaminés par des éléments traces métalliques (ETM). Les effets de ces pollutions sont multiples: risques environnementaux et sanitaires, régression de certaines espèces végétales et coûts économiques importants de restauration des habitats.

Une alternative efficace et peu coûteuse pour la restauration des habitats pollués, la phytoremédiation, implique l'utilisation de plantes capables de piéger ces métaux lourds ; ce qui assure un couvert végétal tout en limitant la dispersion des ETM. Mais pour être réalisable, cette technique nécessite l'identification de plantes à la fois adaptées aux conditions environnementales du site et tolérant une pollution en ETM (Pilon-Smits, 2005).

Parmi les communautés végétales littorales répertoriées dans ces habitats contaminés se rencontre l'Astragale de Marseille (*Astragalus tragacantha*), espèce rare et endémique de Méditerranée occidentale. Avec *Plantago subulata* et *Thymelaea tartonraira*, elles correspondent aux formations arbustives thermo-méditerranéennes en coussinets (phryganes littorales), communautés fortement singulières présentant des distributions spatiales fragmentées et restreintes et des dynamiques populationnelles extrêmement perturbées du fait de diverses pressions d'origine anthropique (urbanisation – fréquentation – embruns et sols pollués). *Astragalus tragacantha* appartenant à la famille des *Fabaceae*, elle présente la particularité de pouvoir établir deux types de symbioses racinaires (endomycorhizes et nodulation à rhizobium), qui pourraient lui conférer un avantage sélectif pour se développer dans ces sols carencés en eau et nutriments. Mais jusqu'à présent, aucune étude ne s'est intéressée à l'impact des microorganismes sur la tolérance de cette plante aux pollutions en ETM.

Dans une démarche de conservation des espèces et de restauration écologique des habitats, notre projet consiste à :

- 1. Identifier les symbiotes associés aux racines d'*Astragalus tragacantha***
- 2. Tester l'impact de ces associations symbiotiques (endomycorhizes et/ou nodulation à rhizobium) sur les capacités de polluo-tolérance d'*A. tragacantha***

Objectifs de la demande

Cette étude se focalisera sur le site de « l'Escalette » (au sud-est de Marseille), qui a été le siège d'une activité industrielle d'extraction minière durant le XIX^e siècle et est à l'abandon depuis plus de 80 ans. Le dépôt de scories (issues de la production de Pb et Ag) présents sur le site représente une source de pollution par divers ETM (principalement Pb, As, Zn, Cu, Sb), avec des degrés variables de contamination selon les zones référencées.

Le site est pourtant végétalisé par différentes espèces : rudérales (pionnières), introduites envahissantes, ou endémiques/rares comme *Astragalus tragacantha*, déjà présentes durant cette activité industrielle. Peu de données sont disponibles sur cette plante. A l'IMEP un travail de thèse est en cours afin de mieux comprendre les caractéristiques d'habitat et les paramètres biologiques de vulnérabilité de cette espèce face aux perturbations d'origine anthropique. Cependant, dans une démarche de conservation d'*Astragalus tragacantha*, il est indispensable de mieux connaître ses symbioses fonctionnelles et d'analyser si ces interactions symbiotiques sont présentes en conditions de fort stress métallique, correspondant à sa zone de répartition actuelle.

Ce projet aura donc plusieurs objectifs :

- Isoler les partenaires symbiotiques (glomales et rhizobia) présents dans un sol colonisé par *Astragalus tragacantha* et contaminé en ETM.
- Mesurer l'impact de ces microorganismes sur la tolérance des plantes aux métaux lourds, en réalisant des inoculations croisées (bactéries et/ou champignons) en condition de stress métallique (Zn).
- Déterminer le potentiel de phytostabilisation (chélation des métaux par les racines et/ou les symbiotes associés) par mesure des ETM présents dans les parties aériennes et racinaires d'*Astragalus tragacantha*.

Si de nombreux travaux ont été menés sur l'utilisation des bactéries ou des champignons mycorhiziens pour améliorer la croissance des plantes et leurs capacités de phytoremédiation, le manque d'études sur l'utilisation combinée des 2 microorganismes dans des sites pollués en ETM est en effet flagrant (Gamalero et al., 2009).

L'originalité de ce travail réside dans l'étude multidisciplinaire d'une association tripartite (espèces végétale, fongiques et bactériennes) qui rassemble des spécialistes des 3 règnes autant au niveau de la connaissance des espèces impliquées que de leur fonctionnalité.

Cette étude préfigure un projet de plus grande ampleur sur les espèces végétales en zone littorale et leurs symbiotes dans un objectif de restauration écologique de ces milieux dans le Bassin Méditerranéen. Nous avons notamment programmé de **déposer un projet AUF (Agence Universitaire de la Francophonie)** pour développer nos collaborations selon un axe Nord-Sud avec nos partenaires algériens et tunisiens autour de la problématique de l'interface biodiversité et anthropisation des zones littorales. Cette étude sera donc focalisée sur les écosystèmes littoraux à proximité du grand pôle urbain marseillais qui fera office de «site-atelier» et sera ensuite comparé avec un «site-miroir» sur les rives sud du Bassin Méditerranéen.

Réalisations prévues

1. avril-juin 2010 : Préparation des inoculums microbiens à partir d'un sol colonisé par *Astragalus tragacantha*, et contaminé en ETM

Piégeages (en condition de laboratoire) des symbiotes microbiens présents *in situ*, à partir d'un homogénéisat de terre collectée sur le site d'étude, en utilisant :

- des plants d'ail (*Allium* sp.) permettant de piéger spécifiquement les souches endomycorhiziennes (non cultivables *in vitro*), et multiplier l'inoculum.
- des plants d'*Astragalus tragacantha*, afin d'isoler les rhizobia du sol capables de noduler cette espèce.

2. Rôle des symbiotes racinaires dans la tolérance d'*Astragalus tragacantha* au Zn

- juin 2010 : inoculations croisées en conditions contrôlées (phytotron) afin de tester l'effet séparé et/ou synergique des symbioses sur la plante. Les plantules d'astragale seront cultivées en pot sur le sol préalablement irradié aux rayons gamma afin d'exclure toute présence microbienne autre que l'inoculum choisi.
- septembre 2010 : après 3 mois, traitement de la moitié des plantes par adjonction de zinc correspondant au niveau de pollution maximal observé sur le site.
- décembre-janvier 2011 : mesure de biomasse végétale dans les 8 conditions testées (contrôle, inoculum bactérien, fongique, ou en mélange ; avec ou sans traitement au Zn). Mesure des taux de mycorhization et de nodulation. Quantification des métaux accumulés dans les parties racinaires et aériennes.

3. Février-avril 2011 : Identification des partenaires symbiotiques

La diversité des bactéries et champignons endomycorhiziens ayant colonisé les racines d'astragale (avec ou sans traitement métallique) sera comparée après identification des partenaires symbiotiques par analyses moléculaires (PCR-RFLP sur ITS). Ces microorganismes seront conservés en banque en vue d'études fonctionnelles ultérieures.

Plan financier succinct :

Type de dépense :	Montant :
Collecte (sol et matériel végétal)	200 €
Petit matériel de culture (pots, irrigation automatique...)	200 €
Petit matériel de labo (boîtes de Petri, cônes pipetman,...)	400 €
Produits chimiques	600 €
Analyses moléculaires (extraction ADN, PCR-RFLP, séquençage...)	4000 €
Analyses des métaux (minéralisations, spectrométrie ICP-AES)	1500 €
Analyses histochimiques (histologie, microscopie...)	500 €
Indemnités de stage (2 étudiants x 3 mois)	2502 €
Montant total du projet (HT)	9902 €

Description courte du mode d'interaction prévu entre les équipes

La réalisation de ce projet va nécessiter la mutualisation de l'expertise de chacune des équipes pour les domaines abordés :

- L'IMEP (**Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléoécologie**) apportera son expérience sur les plantes endémiques du littoral méditerranéen, leur tolérance aux stress métalliques, l'inoculation contrôlée, les symbioses mycorhiziennes et à rhizobium, la phylogénie moléculaire.
- Le LCP (**Laboratoire Chimie Provence**) est reconnu pour son expérience pour les dosages et l'étude des flux d'ETM dans les plantes et dans le sol.
- Les 2 équipes partagent une compétence dans le domaine de la phytoremédiation avec chacune une expertise complémentaire.

Description du consortium

Nom de l'équipe	Nom et prénom des participants	Implication dans le projet
IMEP - UMR 6116		
Equipe Ecologie Microbienne et Biotechnologies	Miché Lucie (MCF)*	20%
Equipe Biomarqueurs et Bioindicateurs Environnementaux	Laffont-Schwob Isabelle (MCF)	10%
	Rabier Jacques (MCF)	10%
Equipe Populations, Communautés, Paysage	Tatoni Thierry (Pr)	5%
	Affre Laurence (MCF)	5%
LCP - UMR 6264		
Pôle Environnement, Equipe Chimie de l'Environnement Continental	Prudent Pascale (MCF)*	5%
	Vassalo Laurent (ASI)	10%
	Coulomb Bruno (MCF)	5%

* porteur du projet par équipe

Court CV du porteur de chaque équipe et liste de 3 publications les plus pertinentes pour le projet :

Lucie Miché - Docteur en Ecologie Microbienne, Maître de conférences

Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléoécologie (IMEP),
UMR 6116 CNRS-UPCAM-IRD-UP-UAPV
e-mail : lucie.miche@univ-provence.fr

Activités et responsabilités scientifiques

Partenaire de l'ANR Jeunes Chercheurs BetaSym « Ecologie, diversité et adaptation à la symbiose chez les bêta-rhizobium » (2009-2012).
Encadrement de 5 étudiants (BTS et L3), co-encadrement d'une M2.

- 1- Miché, L., L. Moulin, C. Chaintreuil, J. L. Contreras-Jimenez, J.-A. Munive-Hernández, M. C. Villegas-Hernandez, F. Crozier, and G. Béna. Diversity analyses of *Aeschynomene* symbionts in Tropical Africa and Central America reveal that *nod*-independent stem nodulation is not restricted to photosynthetic bradyrhizobia. *Environmental Microbiology* 2009 Oct 29. [Epub ahead of print].
- 2- Nzoué, A., L. Miché, A. Klonowska, G. Laguerre, P. de Lajudie, and L. Moulin. 2009. Multilocus sequence analysis of bradyrhizobia isolated from *Aeschynomene* species in Senegal. *Systematic and Applied Microbiology* 32:400-412.
- 3- Miché, L., F. Battistoni, S. Gemmer, M. Belghazi, and B. Reinhold-Hurek. 2006. Upregulation of jasmonate-inducible defense proteins and differential colonization of roots of *Oryza sativa* cultivars with the endophyte *Azoarcus* sp. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:502-511.

Pascale Prudent - Docteur en Chimie de l'environnement, Maître de conférences (HDR)

Laboratoire Chimie Provence (UMR6264), Equipe Chimie de l'Environnement Continental
Université de Provence – CNRS
e-mail : pascale.prudent@univ-provence.fr

Activités et responsabilités scientifiques

Partenaire ANR - PRECOD CleanWaste « Evaluation des technologies propres et durables de gestion des déchets » (2009-2012).

Partenaire ANR-CES Marséco « Flux de contaminants et fonctionnement des écosystèmes littoraux provençaux : transferts sol-eau-biocénose » (2008-2012).

Directions et co-directions : 1 post-doctorant, 4 doctorants, 12 étudiants en DEA ou Master-2
Participation aux encadrements de 4 doctorants.

- 1- Wang R.Y., N. Korboulewsky, P. Prudent, V. Baldy, and G. Bonin. 2009. Can vertical-flow wetland systems treat high concentrated sludge from a food industry? A mesocosm experiment testing three plant species. *Ecological Engineering*, 35 (2), 230-237.
- 2- Farnet A-M., P. Prudent, M. Cigna, and R. Gros. 2008. Soil microbial activities in a constructed soil reed-bed under cheese-dairy farm effluents. *Bioresource Technology*, 99(14), 6198-6206.
- 3- Rabier J., I. Lafont-Schwob, S. Bouraima-Madjebi, V. Leon, P. Prudent, J. Viano, W.M. Nabors, and E.A.H. Pilon-Smith. 2007. Characterization of metal tolerance and accumulation in *Grevillea exul* var *exul*. *International Journal of Phytoremediation*, 9(5), 419-435.

Références bibliographiques générales

- Gamalero, E., G. Lingua, G. Berta, and B. R. Glick.** 2009. Beneficial role of plant growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant responses to heavy metal stress. *Canadian Journal of Microbiology* 55:501-514.
- Médail, F. and R. Verlaque.** 1997. Ecological characteristics and rarity of endemic plants from southeast France and Corsica: implications for biodiversity conservation. *Biological Conservation* 80: 269-281.
- Médail, F. and P. Quézel.** 1999. Biodiversity hotspots in the mediterranean basin: setting global conservation priorities. *Conservation Biology* 13: 1510-1513.
- Pilon-Smiths, E.** 2005. Phytoremediation. *Annu Rev Plant Biol* 56:15-39.