

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

Porteuse du projet : **Lucie Miché**

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

Consortium : - **IMEP** - UMR 6116 : Miché Lucie (MCF) : Ecologie Microbienne et Biotechnologies ; Laffont-Schwob Isabelle (MCF), Rabier Jacques (MCF) : Biomarqueurs et Bioindicateurs Environnementaux ; Tatoni Thierry (Pr), Affre Laurence (MCF) : Populations, Communautés, Paysage
- **LCP** - UMR 6264 : Prudent Pascale (MCF), Vassalo Laurent (ASI), Coulomb Bruno (MCF) : Chimie de l'Environnement Continental

Rappel : Contexte de la recherche

La région méditerranéenne représente une région floristique exceptionnelle avec un fort taux d'endémisme. Mais paradoxalement, ces formations végétales péri-urbaines remarquables sont soumises à des perturbations environnementales et anthropiques croissantes. L'agglomération marseillaise et ses environs sont par exemple très concernés par les sols pollués suite aux activités industrielles passées (notamment l'extraction minière et la métallurgie), qui ont laissé derrière elles de nombreuses friches fortement contaminées par des éléments traces métalliques et métalloïdes (ETMM). Dans la zone du futur Parc National des Calanques (Sud-Est de Marseille) l'ancienne usine de L'Escalette effectuant la métallurgie du plomb et de l'argent à partir de la galène en est un exemple typique.

Les effets de ces pollutions peuvent être multiples: risques environnementaux et sanitaires, régression des populations de certaines espèces végétales et coûts économiques importants de restauration des habitats. Dans ce cadre, la phytoremédiation (procédé impliquant l'utilisation de plantes et de leurs micro-organismes associés pour leurs capacités à piéger les ETMM) pourrait s'avérer une alternative intéressante. Mais pour être réalisable, cette technique nécessite l'identification de plantes à la fois adaptées aux conditions environnementales du site et tolérant la pollution en ETMM.

Parmi les communautés végétales littorales répertoriées dans ces habitats contaminés se trouvent les phryganes dont une des espèces-clefs est l'astragale de Marseille (*Astragalus tragacantha*, Fabacées), espèce rare et endémique de Méditerranée occidentale. *A. tragacantha* a la particularité de pouvoir établir une double symbiose racinaire (endomycorhizes et nodules bactériens), qui pourraient lui conférer un avantage sélectif pour se développer dans ces sols pollués et carencés en eau et nutriments. Or, très peu de données sont actuellement disponibles sur cette plante. Dans une démarche de conservation d'*A. tragacantha*, notre objectif a alors été de mieux connaître ses symbioses fonctionnelles et d'analyser si ces interactions symbiotiques sont modifiées en conditions de fort stress métallique, correspondant à sa zone de répartition actuelle.

Bilan des réalisations

Remarque : nos travaux ont tenu compte des remarques du CS faites lors de l'attribution du financement, à savoir de nous focaliser sur les analyses moléculaires de la diversité des populations microbiennes colonisant les racines d'astragale.

Ils ont impliqué l'encadrement de deux stagiaires :

- **Fatoumata Djitte** (BTS BioAnalyses et Contrôles, Lycée Marie Curie, Marseille) : du 25.05 au 26.06.2010 ; et du 10.01 au 11.03.2011.
- **Louiza Moussaoui** (M2R – BIOECO, Master SET, Université Aix-Marseille III) : de janvier à juin 2011.

1. Mise en culture d'*A. tragacantha* sur des sols récoltés *in situ* (avril-juin 2010)

A. tragacantha étant une espèce protégée, il n'était pas envisageable d'étudier les microorganismes symbiotiques naturellement associés aux racines en prélevant ces dernières directement sur sites. Pour palier cette contrainte, nous avons réalisé une analyse indirecte, en récoltant du sol mycosphérique au pied de ces plantes, puis en y plantant des plantules d'*A. tragacantha* au laboratoire afin de piéger les microorganismes du sol capables de coloniser leurs racines (150 pots au total).

Cinq prélèvements distincts de sols ont ainsi été effectués près de l'ancienne usine de l'Escalette (sol pollué en ETMM). Afin de tester l'influence des ETMM sur la croissance des astragales et la diversité des microorganismes associés, nous avons également effectué des prélèvements à la Maronaise, considéré comme un site peu pollué suite à des analyses spectrométriques précédentes.

2. Récolte des plantes : mesures de leurs paramètres de croissance et colonisation racinaire (janvier-février 2011)

Après 6 mois d'incubation en chambre de culture (nécessaires pour favoriser la colonisation racinaire), les plants ont été récoltés afin de mesurer leur croissance. Il en ressort qu'aucune différence significative n'a pu être mise en évidence sur la taille des astragales ou leur biomasse (parties racinaires ou aériennes) en fonction du type de sol ; ce qui confirme la tolérance de l'astragale de Marseille à cette pollution en ETMM.

De même, la pollution des sols n'a montré aucune influence sur le nombre de nodules par plante, ou le taux de mycorhization des racines. Par ailleurs, l'analyse des teneurs en ETMM des astragales a révélé que ceux-ci avaient tendance à se retrouver préférentiellement au niveau des racines, ce qui renforce le potentiel de phytostabilisation de cette plante.

3. Identification des partenaires symbiotiques (mars-mai 2011)

L'identification moléculaire des microsymbiotes s'est révélée contraignante (croissance très lente des bactéries) et a nécessité de nombreux ajustements des protocoles expérimentaux (la contamination des échantillons par les ETMM inhibant par exemple l'amplification des ADN par PCR).

Les partenaires fongiques ont été identifiés en réalisant une PCR emboîtée à partir des ADN extraits des racines, puis clonage des fragments. L'analyse de 73 séquences d'ADNr ainsi obtenues a révélé une grande diversité des champignons colonisant les racines d'astragale, avec une majorité de souches appartenant au genre *Glomus*.

De manière surprenante, des clades phylogénétiquement très éloignés ont également été détectés, dont certains endophytes probables. Ces résultats sont corrélés aux observations

microscopiques des racines, révélant (en plus de la colonisation mycorhizienne à arbuscules attendue) la présence de structures fongiques de type DSE (*Dark Septate Endophyte*) dans quelques racines provenant du sol de L'Escalette. Ce résultat mis à part, aucune variation significative de la diversité spécifique des champignons associés aux racines n'a pu être observée en fonction des deux sites.

En ce qui concerne les bactéries symbiotiques, près de 170 souches ont été mises en culture sur boîte avant d'extraire leur ADN. Une mise au point de l'analyse de ces souches par ribotypage a été faite, montrant une diversité des rhizobia colonisant les racines. L'identification taxonomique de l'ensemble des souches de la collection n'a cependant pu être finalisée par manque de temps, et sera donc poursuivie ultérieurement.

En conclusion, notre analyse en conditions contrôlées des partenaires symbiotiques naturellement associés à *A. tragacantha* apporte les premières informations sur la diversité des symbiotes d'une espèce rare, qui a fait l'objet de peu d'études et dont les populations sont menacées. Ces travaux ouvrent ainsi de nouvelles perspectives de recherches à explorer, afin notamment de déterminer le rôle des microorganismes associés naturellement aux racines dans la tolérance d'*A. tragacantha* aux ETMM.

Une meilleure connaissance de l'écophysiologie de cette espèce permettra non seulement de contribuer à sa conservation, mais pourra aussi ouvrir des perspectives intéressantes dans la restauration écologique de son habitat.

Valorisation

Rapports de stage :

Djitte F. 2010. Associations symbiotiques de l'Astragale de Marseille (*Astragalus tragacantha*). B.T.S BioAnalyses et Contrôles (1^{ère} année), Lycée Marie Curie, Marseille. 34p.

Djitte F. 2011. Associations symbiotiques de l'Astragale de Marseille (*Astragalus tragacantha*). Tolérance aux métaux lourds. B.T.S BioAnalyses et Contrôles (2^e année), Lycée Marie Curie, Marseille. 44p.

Moussaoui L. 2011. Étude des interactions symbiotiques d'*Astragalus tragacantha*, espèce rare et protégée, dans la perspective de mieux comprendre la survivance de l'espèce sous perturbations anthropiques. M2R – BIOECO, Master SET, Université Aix-Marseille III. 55p.

Publications :

Laffont-Schwob I., Dumas P.J., Pricop A., Rabier J., Miché L., Affre L., Masotti V., Prudent P., Tatoni T. 2011. Insights on metal-tolerance and symbionts of the rare species *Astragalus tragacantha* aiming at phytostabilization of polluted soils and plant conservation. *Ecologia Mediterranea* (sous presse).

Communications :

Laffont-Schwob I., Dumas P.J., Rabier J., Miché L., Affre L., Tatoni T. 2010 (24-27 août). Insights on symbioses of *Astragalus tragacantha* (Fabaceae), an endangered plant species, for ecological restoration purpose. SER, 7th European Conference on Ecological Restoration, Avignon (poster).

Pricop A-D, Laffont-Schwob I., Lixandru B., Dumas P.-J., Prudent P., Rabier J., Salducci M-D, Affre L., Masotti V., Tatoni T. 2011 (27 mai). Do we protect them or do they protect us? Heavy metals tolerance and phytostabilization potential of rare protected species – *Astragalus tragacantha* L.. International

Scientific Symposium "Bioengineering in animal production", Faculty of Animal Science And Biotechnologies, Timisoara (Roumanie).

Pricop A-D, Laffont-Schwob I., Dumas P.-J., Prudent P., Rabier J., Salducci M.-D., Affre L., Masotti V., Tatoni T. 2011 (4-7 juillet). Trace metals and metalloids tolerance of an endemic plant species from Marseille urban area, *Astragalus tragacantha*: prospect for phytostabilization of local industrial polluted site. 5th European Bioremediation Conference in Chania (Crète).

Conférences grand public :

Tatoni T. & Le Mire Pecheux L, 2010. Les enjeux scientifiques du Parc National des Calanques. Journées de l'Ecole Doctorale des Sciences de l'Environnement, centre des Congrès, Cassis, 29 avril 2010.

Tatoni T., 2010. Vulnérabilité écologique du littoral méditerranéen. « Septembre en mer », Station marine d'Endoume, Marseille, 24 septembre 2010.

Tatoni T., 2010. Les enjeux de la Biodiversité. Les mardis scientifiques de l'Université du Temps Libre, théâtre « Le comedia », Aubagne, 9 novembre 2010.

Suite donnée au projet

Ce projet a notamment permis au porteur de mettre en place une nouvelle collaboration au sein de la fédération, en développant une facette complémentaire d'un programme ANR en cours.

Nous envisageons de poursuivre cette collaboration pour approfondir les résultats préliminaires obtenus, avec à cours terme :

- Une demande de bourse de thèse **Averroès** (collaboration Algérie) (*appel à candidature : mi-octobre 2011*) afin de poursuivre les analyses initiées dans ce projet.
- Réponse à l'appel d'offre **ANR-CESA** (*février 2012*), qui fera suite au diagnostic réalisé au cours de l'ANR Marséco (I. Laffont-Schwob) et sera plus orienté sur la restauration écologique