



HAL
open science

Déterminisme de la diversité bactérienne rhizosphérique des hyperaccumulateurs de nickel

Séverine Lopez

► **To cite this version:**

Séverine Lopez. Déterminisme de la diversité bactérienne rhizosphérique des hyperaccumulateurs de nickel. Biodiversité et Ecologie. Université de Lorraine, 2018. Français. NNT : 2018LORR0335 . tel-02323036

HAL Id: tel-02323036

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02323036>

Submitted on 21 Oct 2019

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

Spécialité "Sciences Agronomiques"

par

Séverine Lopez

Déterminisme de la diversité bactérienne rhizosphérique des hyperaccumulateurs de nickel

Soutenue publiquement le 26 novembre 2018

Membres du jury :

M. Thierry Lebeau Rapporteur
Professeur, Université de Nantes, LPG, Nantes

M. Yvan Moëgne Loccoz Rapporteur
Professeur, Université de Lyon, EM, Villeurbanne

M^{me} Isabelle Laffont-Schwob Examinatrice
Professeur, Aix-Marseille Université, LPED, Marseille

M^{me} Corinne Leyval Examinatrice
Directrice de recherche, Université de Lorraine, LIEC, Vandœuvre-lès-Nancy

M. Emile Benizri Directeur de thèse
Professeur, Université de Lorraine, LSE, Vandœuvre-lès-Nancy

M. Jean Louis Morel Co-directeur de thèse
Professeur, Université de Lorraine, LSE, Vandœuvre-lès-Nancy

Remerciements

Un grand homme m'a dit un jour que les protagonistes d'une thèse pouvaient être imagés en ingrédients d'une émulsion : parfois ça prend et parfois non. Donc je remercie profondément mes deux directeurs de thèse, **Emile Benizri** et **Jean Louis Morel**, d'avoir si bien joué leur rôle pour nous permettre de réaliser cette belle mayonnaise ! Je mesure la chance d'avoir été si bien épaulée et conseillée durant ces années : je vous dois cette belle réussite.

Emile, merci d'avoir donné vie à ce sujet et de m'avoir fait confiance suite à mon stage de Master 2. Merci pour votre soutien, pour votre disponibilité et pour l'aide que vous m'avez apportée tout au long de ces trois années. Merci également, d'un point de vu plus personnel, de m'avoir parlé comme vous l'auriez fait à une amie. Notre aventure a commencé début 2015 et je ne considère pas cette fin de thèse comme la fin de notre collaboration.

Jean Louis, merci d'avoir donné de la hauteur à cette thèse. Merci pour tous vos conseils et votre disponibilité pour nos réunions mensuelles. Sachez que je suis encore plus admirative aujourd'hui de l'homme que vous êtes et de la si belle carrière que vous avez menée. Donc avant tout, merci pour votre humanité et votre confiance durant ces trois années.

Merci à **Thierry Lebeau** et **Yvan Moëgne Loccoz** d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie également **Isabelle Laffont-Schwob** et **Corinne Leyval** d'avoir été examinatrices de ma soutenance. Merci à vous d'avoir fait de votre temps de questions une discussion forte enrichissante. Merci également pour les moments d'échanges moins formels que nous avons pu avoir lors du pot.

Je remercie également de nouveau **Corinne Leyval** ainsi que **Xavier Goux** d'avoir fait partie de mon comité de pilotage. Merci pour les échanges que nous avons pu avoir et d'avoir donné une bonne trajectoire à cette thèse.

Merci également aux membres du **Pôle Scientifique OTELo** aux côtés desquels j'ai eu la chance de siéger aux conseils et de m'enrichir durant deux années. Je garde en mémoire les bons moments partagés lors des journées au golf du Pulnoy.

D'autre part, cette aventure n'aurait pu avoir lieu sans le soutien financier du **LabEx RESSOURCES21** et des différents projets **Agromine**. C'est donc naturellement que je souhaite exprimer ma profonde gratitude aux membres de ces comités.

J'aimerais également remercier le directeur du Laboratoire Sols et Environnement, **Christophe Schwartz**, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de son unité.

J'en viens à remercier l'ensemble des personnels du LSE pour leur aide, les différents échanges ou tout simplement leur "bonjour" souriant au détour d'un couloir. Si l'on se sent si bien dans ce laboratoire c'est grâce à la grande famille que l'on a l'impression de rejoindre lorsque l'on arrive au LSE.

De manière plus détaillée, merci à **Sylvia** et **Laetitia** de nous permettre de nous concentrer sur la recherche en prenant en charge tout le côté administratif. Si ce labo tourne bien c'est en grande partie grâce à vous !

Merci à **Guillaume**, à la fois pour avoir trouvé les financements mais aussi pour l'ensemble des échanges, scientifiques ou non, que nous avons pu avoir à Nancy ou ailleurs dans le monde.

Un immense merci à l'équipe technique ! **Lucas**, **Romain** et **Yannick**, merci d'avoir continué à me parler malgré les milliers de broyages et lectures ICP que je vous ai infligés. **Alain**, merci pour tout l'aide informatique mais aussi pour les différents échanges et ta sympathie. Ce fut un honneur d'être ta n°2 ! **Adeline**, merci de t'occuper de nous aussi bien et de toutes tes initiatives pour que l'on puisse évoluer dans un environnement agréable, propre et rangé. **Stéphane**, merci pour la bonne humeur et le rituel du bonjour, mais aussi pour partager ton amour des bons produits avec moi aussi bien lors d'un apéro cochon que d'une soirée lapin. Et pour finir **Jean-Claude**, merci pour les discussions toujours... surprenantes ?!!

Merci bien sûr à tous les enseignants chercheurs et les chercheurs du LSE. **Apolline**, merci pour ta bonne humeur et pour l'ambiance que tu mets. **Catherine** et **Pierre**, merci pour les différentes discussions et l'aide statistique. **Françoise**, merci pour les explications sur le MET et d'avoir persévéré avec mes petites bactéries. La team **Microhumus Gaylord** et **Maxime**, merci pour votre sympathie et les bons moments passés. **Frédéric**, **Geoffroy**, **Noële**, **Sophie**, **Stéphanie** et **Thibault**, merci pour les différents échanges et les bonjours souriants.

Je remercie également les différents collaborateurs que j'ai pu avoir à l'échelle mondiale au cours des missions d'échantillonnage. *Falemnderit* à **Aida Bani** en Albanie. *Punsikou tagaio* à **Sukaibin**, **Paul** et l'ensemble de la **Macaranga team** en Malaisie. *Thank you* à **Antony**, **Peter** et **Philip** d'Australie.

Merci à **Adrian**, le picard australien et **Oljan** d'Albanie d'avoir rendu le congrès ISCE si mémorable. Le raki y aura été pour un peu aussi je pense... De façon modérée !

Un grand merci également aux membres non permanents que j'ai pu croiser durant cette aventure.

Merci aux stagiaires de s'être laissés traumatiser pour les pots d'arrivée et de départ ! Une mention spéciale pour **Etienne**, **Vincent** et **Tatiana** pour s'être s'y bien intégrés. Mes remerciements les plus sincères à mes deux stagiaires **Florian** et **Pauline** pour leur coup de main sur les manips !

Et un immense merci aux jeunes docteurs et futurs docteurs du labo, **Ali** et **Ramez** qui m'ont appris les rouages des protocoles et de m'avoir nourrie de baklawa, **Frédéric** et **Robin** les anciens qui m'ont si bien intégrée en stage, **Marie** pour les conseils avisés sur les cultures, **Quentin** nôtre QVette national d'être aussi drôle (filet venteux !), **Romane** pour ton humour vosgien (ne détruit pas le labo s'il te plaît...), **Dulce**, pour ta joie de vivre communicative, **Victor** de prendre la relève pour tout ce qui est organisation, **Alexis** d'avoir (re-)rejoint la team microbio pour nous apporter toute sa bonne humeur et sa drôlerie et **Clément** de m'avoir poursuivie depuis Metz pour devenir mon collègue. Merci à tous de manière générale pour le soutien jusqu'à la fin et les moments de détente en dehors du boulot qui ont contribué à ma bonne santé mentale durant ce doctorat. Je remercie aussi les jeunes LIECois qu'ils viennent de Nancy (**Nicolas, Romain**) ou de Metz (**Andréina, Emilie, Nicolas, Marc, Kévin** avec une mention spéciale pour **Justine**) pour les éclats de rires et les bons moments hors labo. Je tiens également à remercier **Mohammad** qui, lors de sa présence au laboratoire, a su amener sa joie et sa gentillesse. Je te souhaite toute la réussite possible pour la suite car tu le mérites amplement. Enfin un énoorme merci à toi **Tino** d'avoir partagé toutes ces belles aventures avec moi en Malaisie, les nuits en pleine jungle, les galères de sangsues et de t'être si bien occupé de moi avec les petits repas au refuge le soir. Surtout merci d'être aussi sympathique et authentique : mais quel "Hombre" !

On ne réussit pas une aventure comme celle-ci sans le soutien de nos proches. Je remercie donc l'ensemble des personnes ayant contribué à ma vie sociale en dehors du labo pour m'avoir permis de décompresser et de ne pas me perdre en route.

Plus spécifiquement, merci à **Mélissa, Richard** et **Cyrill** de ne pas m'avoir rayée de votre liste d'amis malgré mon peu de disponibilité ces dernières années. Une mention spéciale pour **Mélissa** de me supporter depuis plus de 25 ans, et j'espère pour encore bien d'autres années à venir.

J'ai eu la chance de commencer cette thèse en même temps que deux doctorantes d'exception, sans qui cette aventure n'aurait pas eu la même saveur. Je tiens donc à remercier les deux super nanas que j'ai rencontrées, les deux entités de mon triopikeur. **Anne**, merci d'être aussi folle que moi et de me permettre de me sentir moins seule car maintenant nous sommes deux à avoir les mêmes idées tordues. Merci d'être aussi dynamique, joyeuse et motivante. Mais surtout merci d'avoir été ma jumelle sur ces trois années et d'avoir apporté autant de rôzeuh à ma vie ! **Clémentine**, merci pour ton aide et d'avoir supporté ma cohabitation envahissante dans les deux bureaux. Je ne te remercierai jamais assez d'avoir sacrifié une douzaine de nuits pour me permettre de m'occuper de mes petites bactéries. Merci pour tes pétages de plombs et de t'occuper aussi bien de nous les dimanches : je suis devenue fan des poulets rôtis pilou-pilou ! Enfin merci pour ton écoute et la compassion dont tu peux faire preuve. De manière générale, un immense merci à vous deux pour le soutien que vous m'avez apporté aux différents moments de ce doctorat, pour les éclats de rires et pour l'amitié qui est née de notre trio infernal.

Ma **Nanouw**, ma "future scientifique" ! Nous avons commencé les Sciences en 2006 et nous n'avons jamais cessé notre aventure depuis. Merci pour ta joie de vivre, ta folie, ton écoute, ton aide, ton amour des choses bizarres (dont moi) et d'avoir fait partie des meilleurs moments de ma vie mais surtout d'être responsable de beaucoup d'entre eux. Je ne pense pas que tout le monde ait une Nanouw sur qui compter, donc moi je mesure la chance de t'avoir à mes côtés. Je ne résumerai tout ceci que par une chose : FOOO[...]OOORT !

Le fait que ma famille se soit déplacée en masse pour assister à ma soutenance de thèse révèle à quel point les valeurs familiales sont une dimension importante pour moi. Aussi j'aimerais remercier l'ensemble de mes proches, car être aussi bien soutenue n'est pas donné à tout le monde. Merci à **Alain, Martine, Stéphanie** et à **Téo** d'être venus me soutenir à Nancy. Un grand merci aux "habituels" **Franck, Véronique, Fabien, Thomas, Tata, Mamie** et **Papi** car quand bien même je me plains de nos repas interminables je ne vous échangerai pour rien au monde ! Merci à ma sœur **Aurore** et mon frère **Frédéric** d'avoir supporté la "petite dernière".

Enfin un merci infini à vous, mes parents, d'avoir toujours été là pour moi et pour tous les sacrifices que vous avez pu accomplir. **Maman, Papa**, je ne vous serai jamais assez reconnaissante d'avoir fait de moi la femme que je suis aujourd'hui et de m'avoir permis d'en arriver là. J'espère que vous êtes fiers de moi, ce qui est sûr c'est que moi je suis fière d'être votre fille.

La thèse étant jalonnée d'imprévus, je suis reconnaissante de l'amour qu'elle m'a permis de rencontrer. **Gabin**, merci d'être venu te perdre en Lorraine ! Merci d'être aussi passionné et passionnant, de supporter ma folie et de l'entretenir également. Merci pour les excursions en pleine nature, pour les grandes discussions les soirs d'été et pour tous les ateliers cuisine enjoués. Tu m'as subie en dernière année de thèse donc je peux t'assurer que le meilleur reste à venir. Merci d'avoir été présent et de m'avoir soutenue comme tu l'as fait, le fait et je suis sûre le fera. Je suis consciente de la chance de t'avoir et je me réjouis de cette nouvelle vie à deux.

Pour finir, je remercie les 60 829 colonies bactériennes qui ont bien voulu participer à mes expérimentations.

Tables des matières

Tables des matières.....	i
Liste des figures	vi
Liste des tableaux.....	ix
Liste des photographies.....	xi
Liste des abréviations.....	xii
Valorisation des travaux de recherche	xiii
Introduction générale	1
Partie 1 : Les rhizobactéries des plantes hyperaccumulatrices de nickel	5
Les environnements ultramafiques.....	5
1. La spécificité de ces environnements	5
2. La végétation des environnements ultramafiques.....	6
2.1. La flore hyperaccumulatrice	6
2.2. L'hyperaccumulation du Ni	7
2.2.1. Le transport des métaux	7
a) Le transport radial dans la racine	7
b) Le transport axial vers les parties aériennes	8
2.2.2. La détoxification et le stockage du Ni.....	8
2.2.3. Les conséquences du Ni sur le développement des plantes.....	9
3. L'agromine	10
3.1. Le principe d'agromine.....	10
3.2. Leviers pour l'optimisation de la phytoextraction.....	12
3.3. Les plantes hyperaccumulatrices de Ni candidates pour l'agromine	13
3.3.1. <i>Odontarrhena chalcidica</i> : hyperaccumulateur de milieu tempéré.....	13
3.3.2. <i>Rinorea bengalensis</i> : hyperaccumulateur de milieu tropical	15
La microflore des environnements ultramafiques.....	16
1. Etude de la diversité bactérienne des sols.....	16
1.1. Approches culture-dépendantes	16
1.2. L'ADNr 16S.....	17
1.3. Les techniques de séquençage nouvelle génération	18
1.3.1. Pyroséquençage 454	18
1.3.2. Séquençage par ligation.....	19
1.3.3. Séquençage Illumina	19

2. Les microorganismes en milieux ultramafiques	19
2.1. La spécificité de la microflore ultramafique	19
2.2. La réponse des bactéries au Ni	21
3. Les bactéries rhizosphériques	22
3.1. Influence des paramètres environnementaux sur la diversité des communautés rhizosphériques	22
3.1.1. L'interface sol racine	22
3.1.2. Les facteurs influençant la diversité bactérienne rhizosphérique	22
3.2. La diversité bactérienne rhizosphérique en sols ultramafiques.....	25
4. Les bactéries PGPR	26
Objectifs de la thèse	29
Partie 2 : La diversité bactérienne des environnements ultramafiques	33
Introduction.....	33
Matériel et méthodes.....	37
1. Sites et échantillonnages.....	37
1.1. Les sites d'Albanie	39
1.2. Les sites de Grèce	40
1.3. Les sites de Malaisie.....	41
1.4. Les sites d'Indonésie.....	42
2. Caractérisation des échantillons végétaux et des terres.....	44
2.1. Concentrations élémentaires dans les plantes	44
2.2. Caractérisation physico-chimique des terres.....	44
2.2.1. Préparation des échantillons de terre.....	44
2.2.2. Mesure du pH des terres	44
2.2.3. Mesure de la capacité d'échange cationique des terres	45
2.2.4. Mesure de la fraction des éléments des terres extractibles au DTPA	45
2.2.5. Mesure de la fraction extractible à l'eau régale des éléments des terres.....	45
2.2.6. Mesure de l'azote total et du carbone total et organique des terres	45
2.3. Facteurs de bioconcentration et de transfert chez les hyperaccumulateurs	46
3. Caractérisation de la diversité génétique des communautés bactériennes.....	46
3.1. Séquençage haut débit Illumina	46
3.1.1. Extraction de l'ADN des terres	46
3.1.2. Préparation de la banque d'amplicons d'ARNr 16S.....	46
3.1.3. Vérification de la banque de clones.....	48
3.1.4. Lancement du run de séquençage.....	48
3.2. Analyses bioinformatiques	48
3.2.1. Création de la table d'OTU.....	48
3.2.2. Analyses bioinformatiques de la table d'OTU.....	48

3.2.3. Les indices de diversité.....	49
3.2.4. La prédiction de la diversité fonctionnelle	49
3.3. Analyses statistiques	50
Résultats.....	51
1. La diversité des communautés bactériennes en climat tempéré (Albanie).....	51
1.1. La caractérisation des échantillons.....	51
1.1.1. Les sites sélectionnés.....	51
1.1.2. L'hyperaccumulation de Ni par les plantes échantillonnées	55
1.2. La diversité bactérienne rhizosphérique	56
1.3. Les facteurs influençant la diversité bactérienne.....	60
2. La diversité des communautés bactériennes en climat de mousson (Malaisie).....	62
2.1. Caractérisation des échantillons	62
2.1.1. Les sites sélectionnés.....	62
2.1.2. L'hyperaccumulation de Ni par les plantes échantillonnées	64
2.2. La diversité bactérienne rhizosphérique	68
2.3. L'impact de l'âge de la plante sur la diversité des communautés bactériennes	76
2.4. Les facteurs influençant la diversité bactérienne.....	78
3. La diversité des communautés bactériennes en climat tropical humide (Indonésie).....	80
3.1. Caractérisation des échantillons	80
3.1.1. Les sites sélectionnés.....	80
3.1.2. L'hyperaccumulation du Ni par les plantes échantillonnées	84
3.2. La diversité bactérienne rhizosphérique	88
3.3. Focus sur <i>F. trachypison</i> , <i>R. aff. bengalensis</i> et <i>T. morotaiense</i>	92
3.4. Les facteurs influençant la diversité bactérienne.....	95
4. Analyse globale à l'échelle mondiale.....	97
4.1. La caractérisation des environnements ultramafiques	97
4.2. La diversité bactérienne des plantes hyperaccumulatrices de Ni au niveau mondial	100
4.3. Les facteurs influençant la diversité bactérienne.....	108
4.4. La diversité fonctionnelle des communautés bactériennes au niveau mondial	111
Discussion : Déterminisme de la diversité bactérienne rhizosphérique des hyperaccumulateurs de Ni	117
Conclusion.....	133
Partie 3 : Inoculation de <i>O. chalcidica</i> par des bactéries PGPR.....	137
Introduction.....	137
Matériel et méthodes.....	141
1. Isolement et criblage de bactéries PGPR.....	141
1.1. Isolement de bactéries résistantes au Ni.....	141
1.1.1. Mesure de l'humidité de terre	142

1.1.2. Collection de souches Ni-résistantes	142
1.1.3. Affiliation taxonomique des souches Ni-résistantes	142
a) Extraction de l'ADN des souches	142
b) PCR de l'ADN 16S	142
c) Séquençage des amplicons 16S	143
d) Affiliation taxonomique.....	143
1.2. Criblage de bactéries PGPR Ni-résistantes	143
1.2.1. Mesure de l'activité ACCd sur souches	143
1.2.2. Mesure de la capacité de production de sidérophores.....	144
1.2.3. Mesure de la capacité de solubilisation du phosphore.....	145
1.2.4. Mesure de la production d'auxines	146
1.3. Potentiel de bioaccumulation du Ni des bactéries PGPR	146
2. Inoculation de <i>O. chalcidica</i>	147
2.1. Le dispositif expérimental.....	147
2.2. Inoculation des plantes par les souches PGPR.....	149
2.2.1. Courbes de croissance des souches bactériennes.....	149
2.2.2. Préparation de l'inoculum et inoculation des pots.....	149
2.3. Récolte de l'expérimentation.....	150
2.4. Analyses abiotiques	150
2.4.1. Terres.....	150
2.4.2. Solutions de sol.....	150
2.5. Analyses biotiques.....	150
2.5.1. Plantes	150
2.5.2. Activités microbiennes enzymatiques	151
a) Activité de l'ACC déaminase des terres	151
b) Activité uréase des terres	151
c) Activité de l'arylsulfatase, de la β -glucosidase et de la phosphatase alcaline des terres	152
2.5.3. Diversité bactérienne par séquençage haut débit Illumina.....	152
3. Analyses statistiques.....	152
Résultats.....	153
1. La recherche de bactéries PGPR.....	153
1.1. La résistance au Ni des bactéries de la rhizosphère de <i>O. chalcidica</i>	153
1.2. Le criblage des bactéries sur leurs traits PGP	154
1.3. Le potentiel de bioaccumulation de Ni des bactéries PGPR.....	157
2. L'effet de PGPR bioaccumulatrice de Ni sur la phytoextraction par <i>O. chalcidica</i>	158
2.1. L'effet de l'inoculation sur la plante	158
2.2. L'effet de l'inoculation sur la terre ultramafique	159
2.3. L'effet de l'inoculation sur la structure et la diversité des communautés bactériennes.....	162
2.4. L'effet de l'inoculation sur la diversité fonctionnelle des communautés bactériennes	166

Discussion : Inoculation de <i>Odontarrhena chalcidica</i> par des bactéries PGPR	171
Conclusion	177
Conclusion générale et perspectives.....	179
Références	185
Annexes	205
Annexe 1 : La diversité des communautés bactériennes en climat tempéré (Grèce).....	205
Annexe 2 : Affiliations taxonomiques relatives au réseau d'OTUs.....	210
Annexe 3 : Corrélations entre l'abondance relative des familles de gènes représentées à plus de 1% et les variables abiotiques des sols.....	212
Annexe 4 : Tampon PBS.....	213
Annexe 5 : Milieu minimum DF.....	213
Annexe 6 : Milieu CAS.....	213
Annexe 7 : Milieu PVK.....	214
Annexe 8 : Paramètres biotiques et abiotiques des terres de cultures	214

Liste des figures

Figure 1 : Voies apoplastique et symplastique pour le transport racinaire	8
Figure 2 : Principe de phytoextraction et de valorisation des produits bio-sourcés	10
Figure 3 : Répartition de Ni et Ca dans les feuilles de <i>O. chalcidica</i>	14
Figure 4 : Répartition du Ni dans les feuilles de <i>R. bengalensis</i>	15
Figure 5 : Représentation schématique du gène codant pour l'ARNr 16S.....	18
Figure 6 : Principaux processus impliqués dans la résistance des bactéries aux métaux	21
Figure 7 : Inhibition de la biosynthèse d'éthylène par l'ACC déaminase	27
Figure 8 : Plante hyperaccumulatrice en sol ultramafique : Interface sol-racines-PGPR.....	28
Figure 9 : Zones ultramafiques à climat tempéré et tropical étudiées	38
Figure 10 : Carte géographique des 11 sites de prélèvements	51
Figure 11 : Abondance relative des phyla majoritaires des terres rhizosphériques.....	57
Figure 12 : Analyse de redondance entre les abondances relatives des 14 phyla majoritaires et les variables abiotiques des sites.....	59
Figure 13 : Matrice de corrélations entre les paramètres abiotiques et les sept phyla bactériens majoritaires	60
Figure 14 : Analyse de partition de la variance bactérienne au niveau OTUs en fonction des données abiotiques, topographiques et de l'espèce de plante	61
Figure 15 : Carte géographique des 10 sites de prélèvement.....	62
Figure 16 : Abondance relative des phyla majoritaires des terres rhizosphériques en fonction des sites	69
Figure 17 : Abondance relative des phyla majoritaires des terres rhizosphériques en fonction des plantes.....	70
Figure 18 : Analyse de redondance entre les abondances relatives des 10 phyla majoritaires et les variables abiotiques des sites.....	73
Figure 19 : Arbre phylogénétique UPGMA des terres rhizosphériques	75
Figure 20 : Analyse en coordonnées principales (PCoA) en 3D fondée sur la métrique de phylogénie Unweighted UniFrac des terres rhizosphériques de plantes d'âges différents prélevées sur le site 02 et le site 10.....	77
Figure 21 : Matrice de corrélations entre les paramètres abiotiques et les dix phyla bactériens majoritaires	78
Figure 22 : Analyse de partition de la variance bactérienne au niveau OTUs en fonction des données abiotiques, topographiques et de l'espèce de plante	79
Figure 23 : Carte géographique des 15 sites de prélèvements	80
Figure 24 : Abondance relative des phyla majoritaires des terres rhizosphériques.....	89
Figure 25 : Analyse de redondance entre les abondances relatives des dix phyla majoritaires et les variables abiotiques des sites.....	91

Figure 26 : Diagramme de Venn basé sur la présence des OTUs dans les terres rhizosphériques de <i>F. trachypison</i> , <i>R. aff. bengalensis</i> et <i>T. morotaiense</i>	92
Figure 27 : Arbre phylogénétique UPGMA des terres rhizosphériques.....	93
Figure 28 : Analyse de redondance entre les abondances relatives des 13 phyla majoritaires et les variables abiotiques des sites pour <i>F. trachypison</i> , <i>R. aff. bengalensis</i> et <i>T. morotaiense</i>	94
Figure 29 : Matrice de corrélations entre les paramètres abiotiques et les 13 phyla bactériens majoritaires.....	95
Figure 30 : Analyse de partition de la variance bactérienne au niveau OTUs en fonction des données abiotiques, topographiques et de l'espèce de plante.....	96
Figure 31 : Concentrations en Ni total et extractible au DTPA des terres rhizosphériques et du Ni des parties aériennes des différents hyperaccumulateurs.....	97
Figure 32 : ACP des paramètres physico-chimiques des terres rhizosphériques.....	99
Figure 33 : Abondance relative des phyla majoritaires dans les terres rhizosphériques.....	101
Figure 34 : Diagramme de Venn basé sur la présence des OTUs dans les terres rhizosphériques.....	103
Figure 35 : Réseau basé sur les OTUs >1% d'abondance relative dans les terres rhizosphériques.....	105
Figure 36 : Analyse en coordonnées principales en 3D des terres rhizosphériques.....	106
Figure 37 : Indice de Shannon moyen des communautés bactériennes des terres rhizosphériques suivant la latitude.....	107
Figure 38 : Arbre de régression multivariable basé sur l'abondance relative des 11 phyla majoritaires en relation avec les variables abiotiques et climatiques.....	109
Figure 39 : Analyse de partition de la variance bactérienne au niveau OTUs en fonction des données abiotiques, climatiques, topographiques et de l'espèce de plante.....	110
Figure 40 : Abondances relatives (%) des familles de fonctions prédites pour les communautés bactériennes rhizosphériques des plantes hyperaccumulatrices.....	111
Figure 41 : Abondances relatives (%) des KO majoritaires (>1%) prédits pour les communautés bactériennes rhizosphériques des plantes hyperaccumulatrices.....	113
Figure 42 : Matrice de corrélations entre les données climatiques et les KO majoritaires (>1%) prédits des communautés bactériennes.....	115
Figure 43 : Dispositif expérimental en pots en conditions contrôlées.....	148
Figure 44 : Cinétique de croissance des 3 souches de <i>Rhodococcus</i> PGPR retenues.....	149
Figure 45 : Pourcentage moyen de souches bactériennes cultivables Ni ^R isolées de la rhizosphère de <i>O. chalcidica</i>	153
Figure 46 : Pourcentage de bactéries possédant 0, 1, 2 ou 3 des traits PGP ciblés.....	156
Figure 47 : Radar en pourcentage de la moyenne des différents paramètres des plantes récoltées.....	158
Figure 48 : Evolution des concentrations en nickel dans la solution des terres de culture entre l'inoculation (t = 0 semaine) et la récolte (t = 12 semaines).....	159

Figure 49 : Analyse en Composantes Principales des terres de culture.....	161
Figure 50 : Abondance relative des phyla majoritaires des terres à T0 et à la récolte, inoculées ou non par les 3 souches de PGPR	163
Figure 51 : Matrice de corrélations entre les paramètres abiotiques des terres à la récolte et les huit phyla bactériens majoritaires	164
Figure 52 : Abondances relatives (%) des familles de fonctions prédites pour les communautés bactériennes rhizosphériques des terres de culture	167
Figure 53 : Abondances relatives (%) des KO majoritaires (>1%) prédits pour les communautés bactériennes rhizosphériques des plantes hyperaccumulatrices	169
Figure 54 : Carte géographique des 5 sites de prélèvements	205
Figure 55 : Abondance relative des phyla majoritaires des terres rhizosphériques.....	209
Figure 56 : Détail du réseau basé sur les OTUs >1% d'abondance relative dans les terres rhizosphériques	210
Figure 57 : Matrice de corrélations entre les paramètres abiotiques et les KO majoritaires (>1%) prédits des communautés bactériennes	212

Liste des tableaux

Tableau 1 : Nombre d'échantillons récoltés par espèces de plantes dans les différents pays sélectionnés	37
Tableau 2 : Données climatiques de l'année 2017	38
Tableau 3 : Sites en Albanie	39
Tableau 4 : Sites en Grèce	40
Tableau 5 : Sites en Malaisie	41
Tableau 6 : Sites en Indonésie	43
Tableau 7 : Composition du mix de la première PCR	47
Tableau 8 : Composition du mix de la deuxième PCR.....	47
Tableau 9 : Composition du mix de qPCR	48
Tableau 10 : Sites, espèces et codes des plantes hyperaccumulatrices prélevées.....	51
Tableau 11 : pH, N et C totaux et C organique des terres rhizosphériques	52
Tableau 12 : Eléments totaux des terres rhizosphériques	53
Tableau 13 : Eléments traces métalliques totaux des terres rhizosphériques	53
Tableau 14 : Métaux extractibles au DTPA des terres rhizosphériques	54
Tableau 15 : CEC totale et éléments échangeables des terres rhizosphériques.....	54
Tableau 16 : Macronutriments des parties aériennes des plantes hyperaccumulatrices	55
Tableau 17 : Micronutriments des parties aériennes des plantes hyperaccumulatrices.....	55
Tableau 18 : Facteur de bioconcentration (BCF) des hyperaccumulateurs	56
Tableau 19 : Indices d' α -diversité	58
Tableau 20 : Sites, espèces et codes des plantes hyperaccumulatrices prélevées.....	62
Tableau 21 : pH, N et C totaux et C organique des terres rhizosphériques	63
Tableau 22 : Eléments totaux des terres rhizosphériques	63
Tableau 23 : Eléments traces métalliques totaux des terres rhizosphériques	63
Tableau 24 : Métaux extractibles au DTPA des terres rhizosphériques	64
Tableau 25 : CEC totale et éléments échangeables des terres rhizosphériques.....	64
Tableau 26 : Macronutriments des différentes parties des plantes hyperaccumulatrices	65
Tableau 27 : Micronutriments des différentes parties des plantes hyperaccumulatrices.....	67
Tableau 28 : Facteur de bioconcentration et de transfert des hyperaccumulateurs	68
Tableau 29 : Indices d' α -diversité	71
Tableau 30 : Echantillons de tailles différentes prélevés sur le site 02 (Pahu).....	76
Tableau 31 : Echantillons de tailles différentes prélevés sur le site 10 (Bukit Lompouyu)	76
Tableau 32 : Sites, espèces et codes des plantes hyperaccumulatrices prélevées.....	80

Tableau 33 : pH, N et C totaux et C organique des terres rhizosphériques	81
Tableau 34 : Eléments totaux des terres rhizosphériques	82
Tableau 35 : Eléments traces métalliques totaux des terres rhizosphériques	82
Tableau 36 : Métaux extractibles au DTPA des terres rhizosphériques	83
Tableau 37 : CEC totale et éléments échangeables des terres rhizosphériques	83
Tableau 38 : Macronutriments des différentes parties des plantes hyperaccumulatrices	85
Tableau 39 : Micronutriments des différentes parties des plantes hyperaccumulatrices	87
Tableau 40 : Facteur de bioconcentration des hyperaccumulateurs	88
Tableau 41 : Facteur de transfert des hyperaccumulateurs	88
Tableau 42 : Indices d' α -diversité par plante	90
Tableau 43 : Indices d' α -diversité	102
Tableau 44 : Composition du mix de la PCR sur souche	143
Tableau 45 : Caractéristiques des 3 souches de <i>Rhodococcus</i> retenues	147
Tableau 46 : Traits PGP des souches Ni ^R isolées de la rhizosphère de <i>O. chalcidica</i>	155
Tableau 47 : Caractéristiques des souches PGPR rhizosphériques de <i>O. chalcidica</i>	156
Tableau 48 : Bioaccumulation de Ni par les souches PGPR isolées de la rhizosphère de <i>O. chalcidica</i>	157
Tableau 49 : pH, Ni, CEC totale, N et C totaux et C organique des terres de culture	159
Tableau 50 : Indices d' α -diversité	165
Tableau 51 : Sites, espèces et codes des plantes hyperaccumulatrices prélevées.....	205
Tableau 52 : pH, N et C totaux et C organique des terres rhizosphériques	205
Tableau 53 : Eléments totaux des terres rhizosphériques	206
Tableau 54 : Eléments traces métalliques totaux des terres rhizosphériques	206
Tableau 55 : Métaux extractibles au DTPA des terres rhizosphériques	206
Tableau 56 : CEC totale et éléments échangeables des terres rhizosphériques	207
Tableau 57 : Macronutriments des parties aériennes et racinaires des hyperaccumulateurs	207
Tableau 58 : Micronutriments des parties aériennes et racinaires des hyperaccumulateurs	207
Tableau 59 : Facteur de bioconcentration et de transfert des hyperaccumulateurs	208
Tableau 60 : Indices d' α -diversité	209
Tableau 61 : Détail de l'affiliation taxonomique des OTUs	211
Tableau 62 : Activités enzymatiques des terres de culture	214
Tableau 63 : pH, N et C totaux et C organique des terres de culture.....	215
Tableau 64 : Métaux biodisponibles (mg kg ⁻¹) des terres de culture.....	215
Tableau 65 : CEC totale et éléments échangeables (cmol ⁺ kg ⁻¹) des terres de culture	215

Liste des photographies

Photographie 1 : <i>Odontarrhena chalcidica</i>	14
Photographie 2 : Jeune spécimen de <i>Rinorea bengalensis</i>	15
Photographie 3 : Réaction positive du papier filtre DMG	38
Photographie 4 : Echantillonnage en Albanie.....	39
Photographie 5 : Echantillonnage en Grèce.....	40
Photographie 6 : Echantillonnage en Malaisie.....	42
Photographie 7 : Echantillonnage en Indonésie.....	43
Photographie 8 : Terre rhizosphérique de <i>O. chalcidica</i>	141
Photographie 9 : Souches bactériennes Ni ^R à 7,5 mM de Ni.....	142
Photographie 10 : Mobilisation du fer par une souche PGPR sur milieu CAS	145
Photographie 11 : Solubilisation du P inorganique par une souche PGPR sur milieu PVK .	145
Photographie 12 : Microplaque avec dosage de composés auxiniques et de protéines	146

Liste des abréviations

%C	Pourcentage en carbone total
%Corg	Pourcentage en carbone organique
%N	Pourcentage en azote total
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylate
ACCd	1-aminocyclopropane-1-carboxylate déaminase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIA	Acide indole 3-acétique
ARN	Acide ribonucléique
CEC	Capacité d'échange cationique
DO	Densité optique
DTPA	Acide diéthylène tri-amine penta-acétique
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
ETM	Elément trace métallique
ICP-AES	Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry
Ni ^R	Nickel-résistantes
OTU	Unité taxonomique opérationnelle (operational taxonomic unit)
pb	paire de bases
PBS	Tampon phosphate salin (phosphate buffer saline)
PCR	Réaction en chaîne par polymérase (polymerase chain reaction)
PGP	Traits promoteurs de la croissance des plantes (plant growth promoting)
PGPR	Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (plant growth promoting rhizobacteria)
qsp	Quantité suffisante pour
rpm	Rotations par minute
TBE	Tris borate EDTA
TSA	Gélose trypto-caséine soja (tryptic soy agar)
TSB	Bouillon trypto-caséine soja (tryptic soy broth)
UFC	Unités formant colonie

Valorisation des travaux de recherche

Publications

S. Lopez, S. Piutti, J. Vallance, J.L. Morel, G. Echevarria et E. Benizri (2017). *Nickel drives bacterial community diversity in the rhizosphere of Alyssum murale*. Soil Biology and Biochemistry. **114**: 121-130.

S. Lopez, X. Goux, A. van der Ent, P.D. Erskine, G. Echevarria, M. Calusinska, J.L. Morel et E. Benizri (2019a). *Bacterial community diversity in the ultramafic rhizosphere of nickel hyperaccumulator species found on Halmahera Island (Indonesia)*. Applied Soil Ecology. **133**: 70-80.

S. Lopez, X. Goux, G. Echevarria, M. Calusinska, J.L. Morel et E. Benizri (2019b). *Community diversity and potential functions of rhizosphere-associated bacteria of nickel hyperaccumulators found in Albania*. Science of the Total Environment. **654**: 237-249.

S. Lopez, A. van der Ent, P.D. Erskine, G. Echevarria, G. Lee, E. Permana, J.L. Morel et E. Benizri (2019c). *Rhizosphere chemistry and above-ground elemental fractionation of nickel hyperaccumulator species from Weda Bay (Indonesia)*. Plant and Soil. **436**: 543-563.

S. Lopez, E. Benizri, P.D. Erskine, Y. Cazes, J.L. Morel, G. Lee, E. Permana, G. Echevarria et A. van der Ent (2019d). *Biogeochemistry of the flora of Weda Bay, Halmahera Island (Indonesia) focusing on metal hyperaccumulation*. Journal of Geochemical Exploration. **202**: 113-127.

Communications orales

S. Lopez, E. Benizri, 2016. *The role of soil microbes in hyperaccumulator plants*. Workshop Sabah Parks & University of Queensland. Manukan Island, Malaisie, 2016.

S. Lopez, E. Benizri, J.L. Morel, G. Echevarria, S. Piutti, J. Vallance. *Is nickel driving the bacterial community diversity in the rhizosphere of hyperaccumulator plants?* International Mineral Processing Congress. Canada, Montréal, 2016.

S. Lopez. *Bactéries PGPR bioaccumulatrices de nickel destinées à l'inoculation d'Alyssum murale*. Séminaires RP2E. France, Nancy, 2017.

S. Lopez, X. Goux, G. Echevarria, A. van der Ent, M. Calusinska, P. Delfosse, J.L. Morel, E. Benizri. *The bacterial community diversity in the rhizosphere and non-rhizosphere ultramafic soils of Ni-hyperaccumulator plants growing in Halmahera Island, Indonesia*. SUITMA9 Congress. Russie, Moscou, 2017.

S. Lopez, X. Goux, G. Echevarria, A. van der Ent, M. Calusinska, P. Delfosse, J.L. Morel, E. Benizri. *The bacterial community diversity in the rhizosphere of Ni-hyperaccumulator plants growing in Halmahera, Indonesia*. Workshop Franco-Australian on Serpentine Ecology. France, Nancy, 2017.

S. Lopez, X. Goux, G. Echevarria, M. Calusinska, P. Delfosse, J.L. Morel, E. Benizri. *The bacterial community diversity in the rhizosphere of Ni-hyperaccumulator plants in Albania*. 9th International Conference on Serpentine Ecology. Albanie, Tirana et Pogradec, 2017.

P.D. Erskine, A. van der Ent, G. Echevarria, E. Benizri, **S. Lopez**, G. Lee, E. Permana. *Hyperaccumulator discovery in Halmahera, Indonesia*. 9th International Conference on Serpentine Ecology. Albanie, Tirana et Pogradec, 2017.

S. Lopez, X. Goux, A. Van der Ent, P.D. Erskine, G. Echevarria, M. Calusinska, J.L. Morel, E. Benizri. *The bacterial community diversity in the rhizosphere of ultramafic soils of nickel-hyperaccumulator species from Halmahera Island (Indonesia)*. Workshop international : Geochemical cycle of Ni, Co and Sc: from mining exploration to ecotoxicity. France, Nancy, 2017.

S. Lopez, X. Goux, G. Echevarria, M. Calusinska, P. Delfosse, J.L. Morel, E. Benizri. Community diversity and potential functions of rhizosphere-associated bacteria of nickel hyperaccumulators found in Albania. 15th International Phytotechnology Conference. Serbie, Novi Sad, 2018.

Communications affichées

S. Lopez, J.L. Morel, G. Echevarria, E. Benizri. *Déterminisme de la structuration des communautés microbiennes en sols ultramafiques dans un contexte d'agromine du nickel*. Séminaires scientifiques du LabEx RESSOURCES21, Nancy, 2016.

S. Lopez, J.L. Morel, G. Echevarria, E. Benizri. *Inoculation d'Alyssum murale par des souches PGPR bioaccumulatrices ou non de nickel*. Séminaires scientifiques du LabEx RESSOURCES21, Nancy, 2017.

S. Lopez, J.L. Morel, G. Echevarria, E. Benizri. *Inoculation of Alyssum murale with PGPR strains with different patterns of nickel bioaccumulation*. 9th International Conference on Serpentine Ecology, Albanie, Tirana+Pogradec, 2017.

Introduction générale

Alors que notre connaissance de la diversité microbienne dans la rhizosphère des plantes s'améliore, grâce en particulier au développement des techniques relevant de la biologie moléculaire, les microbiologistes ont accordé peu d'attention aux communautés bactériennes spécifiques aux zones ultramafiques.

Les régions ultramafiques, où la roche mère serpentinique est naturellement fortement pourvue en Ni, est la zone de prédilection pour l'implantation de mines de Ni. Les plus grandes exploitations minières se trouvent en Nouvelle Calédonie, à Cuba, aux Philippines et en Indonésie. Un des problèmes majeurs des mines à ciel ouvert est l'impact écologique sur la biodiversité du milieu. En effet, en plus de la pollution engendrée pour l'exploitation des minerais, la première étape de l'installation de ces mines est la destruction de la couverture végétale. Or, les environnements ultramafiques possèdent une flore spécifique, telles les plantes hyperaccumulatrices de métaux. Ces végétaux possèdent la faculté d'accumuler des métaux dans leurs parties aériennes à des concentrations plus élevées que les niveaux tolérés par d'autres espèces. Dans le cas du Ni, elles le concentrent à plus de 1% dans leurs feuilles.

La particularité exceptionnelle de ces plantes hyperaccumulatrices a permis le développement de l'agromine. Cette filière, qualifiée de "mine verte", comprend l'établissement d'agrosystèmes dédiés à l'extraction d'éléments métalliques contenus dans les sols, suivi de leur récupération, *via* des processus d'hydrométallurgie, et de leur transformation pour un usage industriel. En outre, elle permet une diminution des concentrations en métaux des sols et ainsi une remédiation des milieux. Bien que cette technologie ne soit pas aussi rentable que l'extraction minière d'un point de vue économique, elle peut être envisagée pour une restauration des sites miniers. En effet, une culture d'hyperaccumulateurs sur les aires dégradées permettrait une restauration des fonctions écologiques de ces sites, induisant par la suite leur recolonisation par une végétation spontanée. Par ailleurs, appliquée à des environnements naturels ultramafiques, elle peut être à l'origine d'une mise en valeur de ces zones délaissées à des fonctions agronomiques et de procurer un revenu aux agriculteurs.

Le processus d'hyperaccumulation du Ni commence au niveau de la rhizosphère, au sein de laquelle les microorganismes, les racines et le sol interagissent. Comme les hyperaccumulateurs se développent dans des environnements peu fertiles, la composante microbienne rhizosphérique peut améliorer leur implantation, stimuler leur production de biomasse et l'extraction du Ni. Ainsi, l'inoculation de rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (bactéries PGPR) apparaît être un levier possible pour l'optimisation de l'agromine.

Cependant, malgré l'intérêt porté à ces plantes hyperaccumulatrices et à leur valorisation possible, peu d'études ont porté sur la caractérisation de la diversité bactérienne de la rhizosphère de ces dernières se développant sur ces sols bien pourvus en Ni. En effet, aucune recherche n'a eu pour objectif de comprendre les facteurs qui conditionnent la structure et la diversité de ces communautés bactériennes. Il est connu que les bactéries rhizosphériques de ces végétaux sont résistantes aux métaux, grâce, en particulier, au mécanisme de bioaccumulation. Cependant, aucune recherche n'a portée sur l'existence d'une éventuelle compétition pour le Ni entre une bactérie PGPR bioaccumulatrice et une plante hyperaccumulatrice, ce qui limiterait les processus d'hyperaccumulation par la plante.

Pour apporter des éléments de réponse à ces questionnements, la thèse s'articule autour de trois parties.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à un état de l'art portant sur les rhizobactéries des plantes hyperaccumulatrices de Ni et les questions scientifiques qui en résultent.

La deuxième partie porte sur l'étude du déterminisme de la diversité des bactéries de la rhizosphère des plantes hyperaccumulatrices de Ni. Cette recherche fondamentale repose sur un échantillonnage conséquent, avec plus de 160 plantes hyperaccumulatrices et leur terre rhizosphérique, effectué dans deux régions à climats contrastés : européen et tropical. L'objectif est double : apporter un éclairage sur la diversité bactérienne de ces écosystèmes et cerner le déterminisme de cette diversité, que ce soit à échelle mondiale ou d'une région climatique. Ainsi, suite à la présentation du contexte, seront présentées les méthodes utilisées qui décrivent les missions d'échantillonnage sur le terrain, la caractérisation des échantillons et les méthodes de séquençage haut débit et d'analyses bioinformatiques. Les résultats seront dans un premier temps exposés indépendamment pour l'Albanie, la Malaisie et l'Indonésie, avant d'être regroupés pour une analyse à échelle mondiale. Ils seront enfin discutés à la lumière de la littérature scientifique.

La troisième partie, plus appliquée, porte sur un des leviers pour l'amélioration de l'agromine, par l'utilisation de bactéries PGPR. Notre recherche repose sur le criblage de bactéries PGPR bioaccumulatrices de Ni dans la rhizosphère de l'hyperaccumulateur endémique d'Albanie *Odontarrhena chalcidica*. Ceci avec pour objectif final une inoculation de cette plante hyperaccumulatrice par les bactéries retenues afin de déterminer une potentielle compétition pour le Ni entre les deux acteurs : bactérie inoculée et plante hyperaccumulatrice.

Partie 1 : Les rhizobactéries des plantes hyperaccumulatrices de nickel

Les environnements ultramafiques

1. La spécificité de ces environnements

Les sols ultramafiques (ou serpentiniques) couvrent 3% de la surface du globe terrestre (Guillot et Hattori, 2013 ; Echevarria, 2018). Les zones les plus vastes se trouvent essentiellement à Cuba, en Nouvelle Calédonie, aux Philippines, en Indonésie et en Malaisie (van der Ent, 2015). Des surfaces non négligeables sont aussi retrouvées sur le pourtour méditerranéen, notamment en Europe du Sud dans la péninsule des Balkans avec, par exemple, la Grèce et l'Albanie (Brooks, 1987 ; Bani *et al.*, 2010).

Les zones serpentiniques sont issues de l'altération des roches ultramafiques. Le processus pédogénétique comprend i) l'élimination rapide du Ca, ii) la formation d'un humus noir en surface et iii) le développement d'un horizon argileux sous-jacent peu structuré. En raison de la nature de la roche mère, ces sols contiennent de fortes concentrations en métaux, allant de plusieurs centaines à plusieurs milliers de mg de Ni par kg et de plusieurs dizaines à plusieurs centaines de mg de Co par kg (Proctor et Woodell, 1975). Ils sont également caractérisés par des concentrations élevées en Fe et Cr mais également en Mg, avec un ratio Ca/Mg faible, à l'inverse de la plupart des sols développés sur d'autres roches mères (Harrison et Rajakaruna, 2011). De plus, ils présentent de faibles teneurs en éléments majeurs tels que N, P et K (Shallari *et al.*, 1998 ; Boyd et Jaffré, 2009 ; Rajkumar *et al.*, 2009a) et une faible capacité de rétention en eau (Kay *et al.*, 2011). La disponibilité du Ni dans le sol est contrôlée par plusieurs facteurs comme la teneur en argile, le potentiel redox (Eh) et le pH. Les faibles valeurs du Eh favorisent la dissolution des hydroxydes et l'augmentation de la concentration des métaux en solution (Chardot *et al.*, 2005). A l'inverse, lorsque le pH augmente, la fraction disponible du Ni diminue (Everhart *et al.*, 2006).

L'ensemble des facteurs chimiques, physiques et biologiques de ces sols correspondent au "syndrome de serpentine" (Kazakou *et al.*, 2008).

2. La végétation des environnements ultramafiques

Du fait de leurs propriétés extrêmes, souvent non favorables au développement des végétaux, les environnements ultramafiques hébergent une flore particulière. Les plantes endémiques des régions ultramafiques ont des caractéristiques communes leur permettant de survivre dans ces environnements. Dans les sols bien pourvus en Mg, elles montrent une croissance des racines en profondeur et une diminution de leur croissance latérale (Brooks, 1987 ; Kay *et al.*, 2011).

2.1. La flore hyperaccumulatrice

En général, les plantes réagissent différemment selon leur tolérance aux métaux. Trois stratégies en réponse à une augmentation des teneurs en métaux des sols ont été mises en évidence. Les plantes excluantes tolèrent l'entrée des métaux dans leurs racines sans pour autant les transporter vers les tiges, lorsque la concentration du métal dans le sol s'élève. Les plantes bio-indicatrices se caractérisent par une absorption et un transport des métaux dans leurs tissus qui augmentent proportionnellement avec la teneur en métaux dans le sol. Enfin, les plantes accumulatrices concentrent les métaux dans leurs parties aériennes, quelle que soit la concentration retrouvée dans le sol (Baker, 1981).

Le terme "plante hyperaccumulatrice" a été proposé la première fois par Jaffré *et al.* (1976) à propos de l'accumulation très élevée de Ni chez *Pycnanandra* (anciennement *Sebertia*) *acuminata*. Une plante hyperaccumulatrice est inhabituelle d'un point de vue chimique et physiologique car elle est capable d'accumuler de grandes quantités de métaux, de 100 à 1 000 fois plus que les autres plantes (Brooks *et al.*, 1998). Les plantes hyperaccumulatrices sont retrouvées sur l'ensemble des zones ultramafiques connues à ce jour, avec plus de 700 hyperaccumulateurs recensés ces dernières années (Nkrumah *et al.*, 2016, 2018a ; Reeves *et al.*, 2017, 2018 ; www.hyperaccumulators.org). Elles sont bien représentées dans le règne végétal et totalisent 0,2% des angiospermes (McGrath et Zhao, 2003 ; van der Ent *et al.*, 2013a). Elles sont retrouvées chez plus de 40 familles botaniques et la plupart appartiennent aux *Brassicaceae*, *Fabaceae*, *Euphorbiaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Phyllanthaceae* et *Scrophulariaceae* (Reeves, 2003 ; Ghosh et Singh, 2005 ; Cecchi *et al.*, 2010 ; Reeves *et al.*, 2017).

C'est à Cuba, en Nouvelle Calédonie et dans la région du Sud-Est asiatique que les hyperaccumulateurs sont les plus diversifiés (Reeves, 1999 ; Jaffré *et al.*, 2013 ; van der Ent *et al.*, 2015b). Cependant, c'est la famille des Brassicacées qui totalise le plus grand nombre d'espèces hyperaccumulatrices différentes, essentiellement de Ni. Celles-ci sont endémiques du Portugal, des Balkans, de Turquie, d'Arménie, d'Irak, d'Iran et de Russie (Brooks et Radford, 1978 ; Brooks *et al.*, 1979 ; Reeves *et al.*, 2018).

Le Ni est l'élément trace métallique (ETM) le plus hyperaccumulé, spécificité retrouvée chez plus de 532 espèces (Reeves *et al.*, 2017), soit 70% des hyperaccumulateurs (Nkrumah *et al.*, 2018a). Les plantes peuvent être classées en quatre catégories en fonction de leur réponse au Ni : les non-hyperaccumulatrices ($< 100 \mu\text{g g}^{-1}$ de matière sèche végétale), les accumulatrices ($100 - 1\,000 \mu\text{g g}^{-1}$), les hyperaccumulatrices ($1\,000 - 10\,000 \mu\text{g g}^{-1}$) et les hypernickélophores ($> 10\,000 \mu\text{g g}^{-1}$) (Brooks *et al.*, 1977a, 1998 ; Reeves *et al.*, 1983 ; Shallari *et al.*, 1998 ; Boyd et Jaffré, 2009 ; Baker *et al.*, 2010).

2.2. L'hyperaccumulation du Ni

L'hyperaccumulation du métal débute par son absorption par les racines, suivie par son transport vers les parties aériennes et enfin par son stockage sous des formes non toxiques dans les organes aériens (Gendre *et al.*, 2007). L'hypertolérance est essentielle pour qu'une plante puisse hyperaccumuler un élément toxique (McGrath et Zhao, 2003).

2.2.1. Le transport des métaux

a) *Le transport radial dans la racine*

Le Ni, comme tous les éléments minéraux essentiels aux plantes, ne peut être absorbé que sous forme ionique Ni^{2+} (Nultsch, 1998). La racine prélève donc le Ni soluble présent dans la rhizosphère. L'absorption peut être passive par diffusion (voie apoplasmique), ou active (voie symplasmique) (Figure 1). L'apoplaste inclut les parois cellulaires, les espaces xylème-lumen et ceux intercellulaires des tissus racinaires de la plante (Dalir et Khoshgoftarmanesh, 2014). La voie symplasmique permet l'entrée des éléments dans le cytoplasme des cellules et leur passage entre les cellules *via* les plasmodesmes.

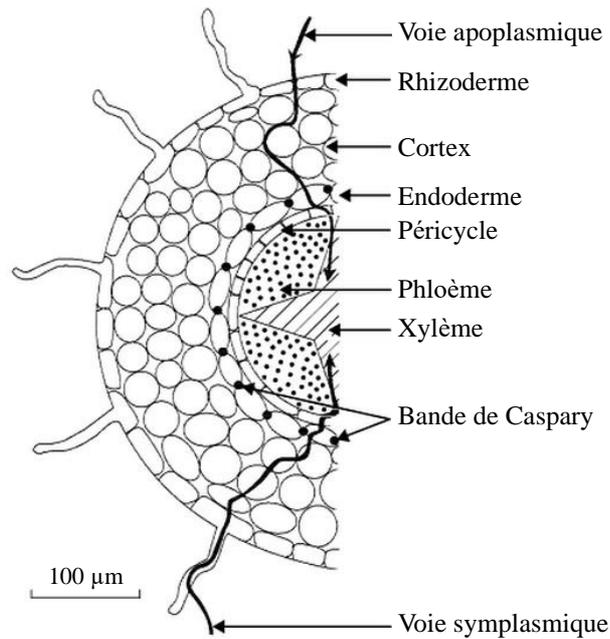


Figure 1 : Voies apoplastique et symplastique pour le transport racinaire (Garbaye, 2013)

b) Le transport axial vers les parties aériennes

Dans les racines, les métaux sont acheminés vers l'endoderme par deux voies : dans l'apoplasme (Eapen et D'Souza, 2005) et dans le symplasma, faisant alors appel à des transporteurs spécialisés (Yang *et al.*, 2005). Sous contrainte des cadres de Caspary, le transport se fait ensuite uniquement par le symplasma. Les métaux déversés dans le xylème sont ensuite transportés par la sève brute vers les parties aériennes. Ce transport répond à un appel foliaire résultant de la transpiration et de la poussée racinaire induite par le potentiel hydrique de l'apport en ions dans le xylème (Eapen et D'Souza, 2005). C'est le flux de masse ou "*mass flow*" (Kim *et al.*, 2003 ; Raven *et al.*, 2007). Les métaux sont transportés vers les feuilles où ils seront majoritairement stockés.

2.2.2. La détoxification et le stockage du Ni

Dans la plante, le Ni n'est pas toujours transporté sous forme libre mais peut être complexé à des molécules organiques, sous des formes moins toxiques. Des acides organiques comme le citrate ou le malate (McGrath et Zhao, 2003), mais également l'histidine (Singer *et al.*, 2007 ; Richau *et al.*, 2009) et la nicotiamine (Verbruggen *et al.*, 2009) se complexent avec le Ni, ce qui facilite son transport vers les parties aériennes. Le stockage dans les parties aériennes, notamment dans les feuilles, a lieu au niveau de l'épiderme ou des trichomes (Tappero *et al.*, 2007). La plus forte accumulation est observée au niveau des parois cellulaires (60 à 70%) ou des vacuoles des cellules foliaires (Yang *et al.*, 2005), rendant le Ni non toxique pour son hôte (McGrath et Zhao, 2003).

2.2.3. Les conséquences du Ni sur le développement des plantes

Sans être indispensable, le Ni, à faible concentration (0,01 à 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ de matière sèche), permet un meilleur développement de nombreux végétaux (Mishra et Kar, 1974 ; Welch, 1981). Cet élément est notamment impliqué dans le métabolisme de l'azote (Marschner, 1991). En effet, une déficience en Ni induit un dérèglement du métabolisme azoté avec accumulation d'urée dans les tissus et une apparition de nécroses sur l'extrémité des feuilles ou de chloroses foliaires (Welch, 1981 ; Walker *et al.*, 1985). A forte concentration, il induit des effets toxiques pour la plante (Garbisu et Alkorta, 2001 ; Chardot *et al.*, 2005). Le Ni est toxique pour des valeurs supérieures à 10 mg kg^{-1} de matière sèche pour les espèces sensibles, et pour des valeurs supérieures à 50 mg kg^{-1} pour les espèces modérément tolérantes (Bollard, 1983 ; Asher, 1991).

Le Ni est indispensable au développement des espèces inféodées aux sols serpentiniques (Pollard *et al.*, 2002). Il s'agit d'espèces qualifiées d'obligatoires, soit 85 à 90% des hyperaccumulateurs de Ni (Reeves *et al.*, 2007 ; Kazakou *et al.*, 2008 ; Reeves et Adigüzel, 2008). Les autres hyperaccumulateurs de Ni, qualifiés de facultatifs, peuvent se développer sur d'autres sols que sur les sols serpentiniques (van der Ent *et al.*, 2013b ; Pollard *et al.*, 2014). Malgré tout, la présence de Ni permet à ces plantes une meilleure germination et survie alors qu'en absence de ce métal, leur croissance se trouve ralentie (Sylvain et McKenna, 2008).

Bien que l'hyperaccumulation de métaux constitue un coût énergétique pour la plante, lié au transport, à l'accumulation et à la détoxification de ces derniers, de nombreux chercheurs ont émis l'hypothèse que ce phénomène pourrait lui procurer certains avantages compensatoires. La tolérance aux métaux et à la sécheresse, la défense contre les agents pathogènes et les herbivores ou encore l'allélopathie vis-à-vis de plantes concurrentes constituent de possibles avantages (Pollard *et al.*, 2002 ; Dechamps *et al.*, 2008 ; Maestri *et al.*, 2010). De plus, le Ni confère également une résistance des plantes envers des champignons et bactéries pathogènes (Jhee *et al.*, 2006 ; Boyd, 2007 ; Raven *et al.*, 2007).

Concernant la résistance aux herbivores, des graines de l'hyperaccumulateur *Streptanthus polygaloides*, concentrées en Ni, survivent mieux en présence de larves de lépidoptères de la famille des *Pieridae*, ou d'acridiens de l'ordre des *Orthoptera* (Martens et Boyd, 1994). De même, l'hyperaccumulateur de Ni *Senecio coronatus* (famille des Astéracées, Afrique du Sud) tend à être évité par le mollusque *Helix aspersa* (Boyd *et al.*, 2002).

Dans les milieux métallifères, l'allélopathie élémentaire est l'effet négatif produit par une concentration élevée de métaux dans le sol sur des espèces végétales peu tolérantes à ces derniers (Boyd et Jaffre, 2001, Whiting *et al.*, 2001b). Le Ni, qui est concentré dans les feuilles des plantes hyperaccumulatrices, se retrouve dans la litière après la sénescence ; la litière se décomposant, la concentration du Ni augmente. L'hyperaccumulateur dispose alors de conditions plus favorables pour son implantation en absence ou quasi-absence de compétition avec les plantes non tolérantes au Ni, que ce soit pour la lumière ou les ressources du sol (Boyd et Jaffre, 2001 ; Zhang *et al.*, 2007).

3. L'agromine

3.1. Le principe d'agromine

La phytomine est un procédé qui utilise les plantes hyperaccumulatrices pour valoriser les métaux issus de sols naturellement riches en métaux ou contaminés (Chaney, 1983). L'agromine est la chaîne de procédés agronomiques qui permettent l'extraction des métaux de sols ou de matrices contaminées à l'aide de plantes hyperaccumulatrices et de procédés leur récupération des métaux d'intérêt à partir des techniques de la métallurgie (Morel, 2013). Cette chaîne repose donc sur un ensemble de procédés agronomiques et industriels assemblés en filière. L'agromine est envisagée pour les sols ultramafiques naturellement bien pourvus en Ni (Brooks *et al.*, 1998 ; Li *et al.*, 2003 ; Chardot *et al.*, 2005 ; van der Ent *et al.*, 2013b ; Morel *et al.*, 2014 ; Saad *et al.*, 2016, 2017).

Après récolte et incinération de la biomasse végétale, il est ainsi possible d'extraire et recycler les métaux dans l'industrie (Figure 2). L'agromine fait l'objet de recherches scientifiques et technologiques avec des dépôts de brevets, comme le brevet international qui porte sur la production d'un sel cristallisé de Ni à partir d'hyperaccumulateurs (WO2012103651 ; www.inpi.fr). De plus, il est possible de récupérer l'énergie produite lors de la combustion.

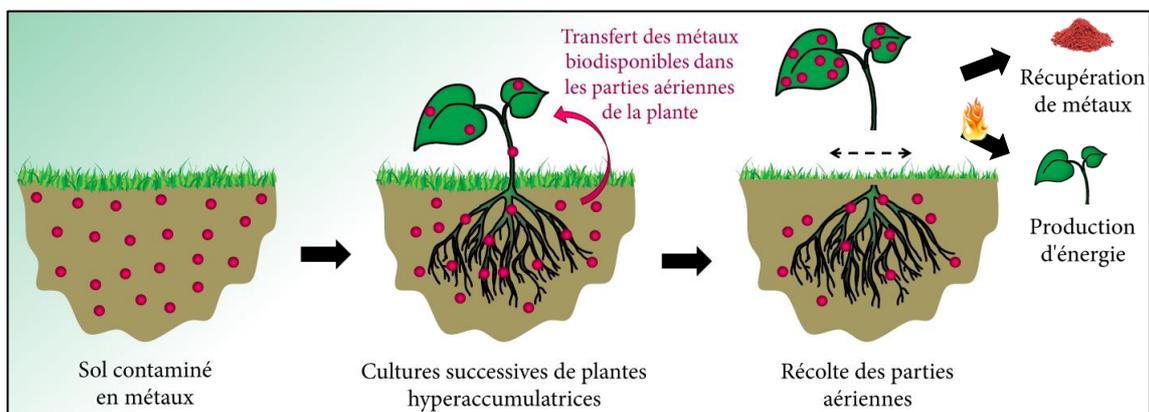


Figure 2 : Principe de phytoextraction et de valorisation des produits bio-sourcés

Pour améliorer la phytoextraction des plantes hyperaccumulatrices et ainsi optimiser les étapes agronomiques de la filière d'agromine, plusieurs stratégies sont envisageables. En particulier, elle peut s'appuyer sur les itinéraires techniques classiques comme l'apport d'engrais minéraux et sur des approches inspirées des principes de l'agro-écologie, comme les associations d'espèces ou co-cultures et l'inoculation de microorganismes sélectionnés pour leurs aptitudes à soutenir la croissance de la plante.

En ce qui concerne la première voie, trois expérimentations principales ont été rapportées dans la littérature jusqu'à présent avec des hyperaccumulateurs du genre *Alyssum*. D'autres essais plus récents ont été conduits avec des espèces ligneuses tropicales qui ont montré une forte réponse aux apports d'éléments minéraux (Nkrumah *et al.*, 2018a). En ce qui concerne les espèces du genre *Alyssum*, des apports d'éléments nutritifs (N, P, K), couplés à des applications d'herbicides et à la gestion de l'irrigation ont permis l'obtention d'au moins 20 t de biomasse sèche conduisant à l'extraction de 400 kg Ni par ha (Chaney *et al.*, 2007). Cinq années d'essais de fertilisation NPK (120 kg N ha⁻¹ et 100 kg P et K ha⁻¹) sur des sols de serpentine en Albanie ont permis l'amélioration de la production de biomasse d'un couvert spontané de *A. murale* (0,3 à 9,0 t de biomasse ha⁻¹) et un passage de l'exportation du Ni de 1,7 à 105 kg Ni ha⁻¹ (Bani *et al.*, 2009, 2015). Le troisième exemple est la multiplication par dix des rendements de *A. pintodasilvae* sur des sols contaminés avec une fertilisation minérale (100 kg N ha⁻¹, 150 kg P ha⁻¹ et 200 K kg ha⁻¹) (Kidd et Monterroso, 2005). L'apport d'amendements organiques favorise également les rendements en biomasse et en Ni d'hyperaccumulateurs comme *A. serpyllifolium* et *A. bertolonii* (Álvarez-Lopez *et al.*, 2016a).

L'association d'espèces différentes est une autre stratégie pour augmenter l'efficacité de la phytoextraction des métaux. Plusieurs modalités d'associations en co-culture ont été testées comme, par exemple, *Sedum alfredii* avec *Alocasia macrorrhiza* (Wu *et al.*, 2007), *Noccaea caerulescens* avec *Lolium perenne* (Jiang *et al.*, 2010), *S. alfredii* avec *Zea mays* (Wei *et al.*, 2011), ou encore *N. caerulescens*, *Hordeum vulgare* et *Lepidium heterophyllum* (Gove *et al.*, 2002). Dans ces différents cas, la co-culture avec des plantes non hyperaccumulatrices de métaux améliore la croissance de la plante hyperaccumulatrice et augmente l'extraction des métaux (Epelde *et al.*, 2012). L'association d'hyperaccumulateurs avec des Légumineuses a également été testée (*A. murale* et *Lupinus Albus*, Jiang *et al.*, 2015 ; *A. murale* et *Vicia sativa*, Saad *et al.*, 2017, 2018). Des systèmes culturaux dédiés à l'agromine intégrant une Légumineuse améliorent notablement les rendements en biomasse de la plante hyperaccumulatrice mais aussi en Ni.

La phytoextraction du Ni par des couverts végétaux constitués de plusieurs espèces hyperaccumulatrices est améliorée tant en ce qui concerne la production de biomasse que la biodisponibilité du Ni dans le sol (Lucisine *et al.*, 2014). La co-culture de *A. murale*, *N. tymphaea*, *Bornmuellera emarginata* et *B. tymphaea* a permis une augmentation de 21% de la biomasse et de 47% de la phytoextraction du Ni par *B. tymphaea* par rapport à sa monoculture (Rue *et al.*, 2015).

Enfin, des inoculations microbiennes sont également une voie prometteuse pour optimiser l'agromine (Garbisu et Alkorta, 2001 ; Abou-Shanab *et al.*, 2003a,b ; Lebeau *et al.*, 2008 ; Rajkumar et Freitas, 2008 ; Liu *et al.*, 2015 ; Durand *et al.*, 2015 ; Benizri et Kidd, 2018). Cet aspect sera développé dans la partie "4. Les bactéries PGPR".

3.2. Leviers pour l'optimisation de la phytoextraction

L'intérêt premier de la filière d'agromine est de donner de la valeur à des territoires, milieux ou matériaux délaissés en raison de leurs teneurs en métaux susceptibles d'engendrer des phénomènes toxiques. Elle permet aussi, secondairement, de réduire les concentrations en Ni dans les sols par la phytoextraction. Sur les territoires ultramafiques, l'agromine permet de récupérer le Ni, comme cela a déjà été démontré en vraie grandeur (Li *et al.*, 2003 ; Bani *et al.*, 2007). En tant qu'activité extractive, *i.e.* minière, elle a une incidence minime sur l'environnement en comparaison à l'activité minière traditionnelle, qu'elle soit souterraine ou à ciel ouvert (Brooks *et al.*, 1998).

Le rendement de l'agromine est étroitement dépendant de la biodisponibilité du Ni. Comme nous l'avons vu précédemment, la solubilité du Ni est dépendante du pH, du Eh et de la concentration en C organique du sol (Chardot *et al.*, 2007 ; Zan *et al.*, 2013). A pH faible, la forme Ni²⁺ est favorisée et la biodisponibilité du Ni est élevée (Mellis *et al.*, 2004). A l'inverse, une CEC élevée entraîne la liaison du Ni aux colloïdes organo-minéraux du sol (*e.g.* argiles) et la disponibilité est plus réduite (Barillot, 2012). Des facteurs biologiques peuvent agir sur la solubilité du Ni. Par exemple, certaines bactéries synthétisent des surfactants et/ou des acides organiques (malate, citrate) qui contribuent à augmenter la biodisponibilité des métaux (Lipton *et al.*, 1987 ; Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2011).

Ainsi, pour une agromine efficace, les caractéristiques du sol ou du substrat sont essentielles. Le rôle de la microflore tellurique doit être aussi considéré avec attention car elle peut moduler la disponibilité du Ni pour la plante hyperaccumulatrice. En ce qui concerne le choix de la plante, sa tolérance est un critère important et son potentiel d'accumulation doit être élevé. Elle doit aussi croître rapidement et produire une biomasse abondante concentrée en métaux. Son système racinaire doit aussi être bien développé afin d'assurer une prospection optimale du sol et puiser les métaux dans un vaste volume (Garbisu et Alkorta, 2001 ; Lebeau *et al.*, 2008).

3.3. Les plantes hyperaccumulatrices de Ni candidates pour l'agromine

Un grand nombre d'espèces hyperaccumulatrices de Ni peut être envisagé pour l'agromine. Cependant, deux espèces ont retenu l'attention des chercheurs du fait de leur forte capacité à concentrer le Ni dans leurs parties aériennes. C'est le cas de *Odontarrhena chalcidica*, originaire du territoire des Balkans (Baker et Brooks, 1989 ; Chaney *et al.*, 1999 ; Baker *et al.*, 2000 ; Bani *et al.*, 2007, 2009, 2015 ; Abou-Shanab *et al.*, 2008 ; Cecchi *et al.*, 2010, 2018 ; Španiel *et al.*, 2015) et de *Rinorea bengalensis* retrouvée dans le Sud-Est asiatique (Brooks *et al.*, 1977b, Brooks et Wither, 1977 ; Wither et Brooks, 1977 ; van der Ent et Mulligan, 2015 ; van der Ent *et al.*, 2017).

3.3.1. *Odontarrhena chalcidica* : hyperaccumulateur de milieu tempéré

Due à leur forte ressemblance, le genre *Odontarrhena* a presque toujours été considéré comme une section du genre *Alyssum* dans la famille des Brassicacées (Cecchi *et al.*, 2018). Grâce à leurs travaux basés sur des approches de biologie moléculaire, Warwick *et al.* (2008), Cecchi *et al.* (2010), Rešetnik *et al.* (2013) et Li *et al.* (2015) ont démontré la monophylie de *Alyssum* et *Odontarrhena* et leur statut générique distinct.

A ce jour, 97 espèces ont été recensées chez *Odontarrhena*, principalement dans les régions euro-méditerranéennes et irano-touraniennes (Španiel *et al.*, 2015 ; Cecchi *et al.*, 2018) ; <http://www.alyssae.sav.sk>). La plupart est présente dans les Balkans, avec une fréquence importante de l'espèce *O. chalcidica* (Janka) Španiel & al. en Albanie, mais aussi au Kosovo, en Serbie ou encore en Grèce (Španiel *et al.*, 2015 ; Cecchi *et al.*, 2018).

La plante hyperaccumulatrice de Ni *O. chalcidica* (Photographie 1), du fait de ses facultés à extraire et accumuler le Ni des sols à plus de 2% de sa masse sèche, a fait l'objet d'un fort intérêt (Baker et Brooks, 1989 ; Chaney *et al.*, 1999 ; Baker *et al.*, 2000 ; Abou-Shanab *et al.*, 2008 ; Cecchi *et al.*, 2010).



Photographie 1 : *Odontarrhena chalcidica* (Albanie)

Les fleurs et les feuilles sont les organes montrant les concentrations les plus élevées en Ni (Xhaferri *et al.*, 2017). Au niveau des feuilles, le Ni est particulièrement concentré dans les vacuoles des cellules épidermiques et les trichomes étoilés recouvrant les feuilles (Figure 3) (Tappero *et al.*, 2007 ; Broadhurst et Chaney, 2016). Cette plante peut également accumuler du Mn lorsque celui-ci est présent dans le sol en même temps que le Ni (Broadhurst *et al.*, 2004, 2009).

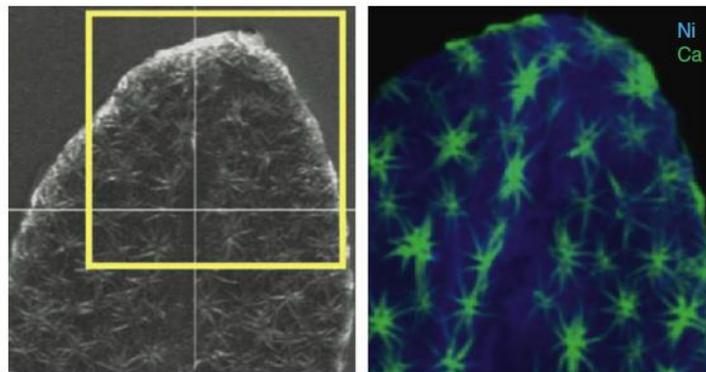


Figure 3 : Répartition de Ni et Ca dans les feuilles de *O. chalcidica* par synchrotron de fluorescence X (Tappero *et al.*, 2007)

Selon McNear *et al.* (2005), *O. chalcidica* montre les teneurs en Ni les plus élevées dans ses tissus épidermiques et vasculaires (jusqu'à environ 2 700 $\mu\text{g g}^{-1}$). Cependant des concentrations plus faibles au niveau du parenchyme lacuneux et palissadique sont observées ($< 680 \mu\text{g g}^{-1}$). Les tissus vasculaires, de par la présence des vaisseaux du xylème qui contribuent au transport du Ni vers les parties aériennes, présentent également des concentrations élevées en ce métal (McNear *et al.*, 2005).

Les premières parcelles d'agromine de grande dimension (plusieurs ha) ont été établies en Albanie avec *O. chalcidica*. Elles ont démontré qu'il était possible d'extraire plus de 120 kg de Ni ha^{-1} , avec une concentration dans la biomasse sèche proche de 1 % (Bani *et al.*, 2007, 2009, 2015).

3.3.2. *Rinorea bengalensis* : hyperaccumulateur de milieu tropical

Rinorea bengalensis (Wall.) Kuntze, de la famille des Violacées, est un arbre pouvant atteindre 25 m de hauteur, natif des forêts tropicales équatoriales semi-humides (Photographie 2) (Brooks et Wither, 1977 ; van der Ent *et al.*, 2017). Cette plante hyperaccumulatrice de Ni est endémique de Malaisie (région de Sabah) et d'Indonésie (Sulawesi) (Wither et Brooks, 1977 ; van der Ent *et al.*, 2017).



Photographie 2 : Jeune spécimen de *Rinorea bengalensis* (Malaisie)

Rinorea bengalensis montre des concentrations en Ni de 2,7% dans les feuilles et jusqu'à 5% dans la sève (Figure 4) (van der Ent et Mulligan, 2015). Sur la base d'analyses en microscopie à rayons X, le Ni apparaît essentiellement localisé au niveau du parenchyme lacuneux mais aussi au niveau de l'épiderme et du xylème (van der Ent *et al.*, 2017). Au niveau des racines et du tronc, le phloème de *R. bengalensis* présente aussi une exceptionnelle concentration en ions Ni²⁺, pouvant atteindre 2,1%, plaçant le phloème comme réserve de Ni (van der Ent *et al.*, 2017). Par ailleurs, Baker *et al.* (2000) ont montré que la spéciation chimique du Ni, une fois entré dans le xylème, ne change pas.

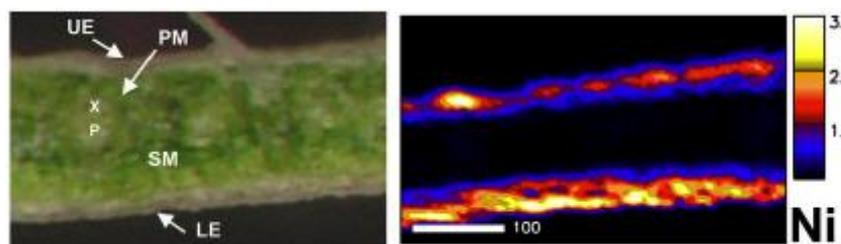


Figure 4 : Répartition du Ni dans les feuilles de *R. bengalensis* par synchrotron de fluorescence X (van der Ent *et al.*, 2017)

UE : épiderme supérieur, PM : parenchyme palissadique, P : phloème, SM : parenchyme lacuneux, LE : épiderme inférieur

La forte capacité de *R. bengalensis* à accumuler le Ni fait de ce ligneux un candidat de premier plan pour l'agromine en sol ultramafique dans le Sud-Est asiatique. Des analyses préliminaires ont permis d'estimer un rendement d'environ 900 kg de Ni ha⁻¹ tous les quatre ans (Lopez *et al.*, 2018). Bien sûr, la récolte ne pourrait avoir lieu tous les ans, mais le rendement annuel estimé serait cependant deux fois plus important que celui obtenu par *O. chalcidica* (Bani *et al.*, 2007, 2009, 2015). De plus, cet arbre ligneux, une fois la taille effectuée, a la capacité de recéper, régénérant des rameaux et facilitant ainsi la gestion des parcelles d'agromine, sans avoir à planter de nouvelles pousses de cette espèce.

La microflore des environnements ultramafiques

1. Etude de la diversité bactérienne des sols

Le sol, environnement complexe et fortement hétérogène, abrite une grande diversité de microorganismes. Parmi ceux-ci, les bactéries sont les plus abondantes, tant en biomasse ou nombre de génomes (Buckley et Schmidt, 2002 ; Torsvik et Øvreås, 2002). Accéder à la diversité bactérienne totale présente dans les sols est un des défis majeurs de ces dernières décennies en écologie microbienne, justifiant que les techniques dédiées à l'étude de la diversité des microorganismes telluriques soient de plus en plus performantes (Fierer et Lennon, 2011).

L'étude de la diversité bactérienne du sol s'est longtemps limitée aux techniques dites culture-dépendantes. L'identification et la classification taxonomique des microorganismes telluriques nécessitaient leur mise en culture et leur caractérisation était fondée sur des critères morphologiques, métaboliques et biochimiques. Cependant, seul un faible pourcentage de microorganismes présents dans les sols (de 0,1 à 10%) peuvent être cultivés sur milieu gélosé (Amann *et al.*, 1995 ; Janssen, 2006). Le développement de techniques moléculaires a permis de s'affranchir de ce biais et d'accéder à la totalité des organismes présents dans le sol. La taxonomie bactérienne s'est alors affinée et le nombre d'espèces recensées est maintenant considérable.

1.1. Approches culture-dépendantes

L'approche culture-dépendante se fait par étalement d'une suspension de sol sur un milieu de culture solide. Les bactéries sont alors dénombrées par comptage des colonies visibles à l'œil nu, et leur nombre est exprimé en unités formant colonie (UFC) par g de sol sec, qui reflète la taille de la communauté bactérienne cultivable.

Les bactéries capables de croître sur milieu gélosé ainsi que le nombre d'UFC dépendent du milieu de culture, de la température et de la durée d'incubation. Certaines bactéries sont dites à stratégie r (bactéries à stratégie rapide), avec une croissance inférieure à 2 j, et d'autres sont à stratégie K (bactéries à stratégie lente), avec une croissance entre 2 et 10 j.

La très difficile reproductibilité de la complexité et de l'hétérogénéité du sol à partir de milieux de culture synthétiques est l'une des principales limites de l'approche culture-dépendante. Staley et Konopka (1985) ont démontré par des observations en microscopie à fluorescence que toutes les bactéries n'étaient pas cultivables, ce qui confirme le biais induit par les méthodes d'étalement sur milieux solides. Cependant, il est possible d'augmenter le nombre de bactéries cultivables en modifiant la teneur en O₂ et en CO₂ (Stevenson *et al.*, 2004) ou le temps d'incubation (Janssen *et al.*, 2002).

Néanmoins, l'approche culture-dépendante demeure encore largement utilisée comme, par exemple, pour l'étude de l'impact des polluants sur les communautés bactériennes des sols (Thorsen *et al.*, 2013) et/ou le criblage de souches d'intérêt (Zhuang *et al.*, 2007 ; Lebeau *et al.*, 2008 ; Ma *et al.*, 2009 ; Glick, 2010 ; Sessitsch *et al.*, 2013 ; Cabello-Conejo *et al.*, 2014a ; Durand *et al.*, 2015).

1.2. L'ADNr 16S

Avec l'avènement des techniques de biologie moléculaire, les travaux de Carl Woese (1987) ont révolutionné la taxonomie et plus largement l'écologie microbienne des sols. En analysant les séquences des ADNs ribosomiaux (ADNr), il a mis en évidence les marqueurs évolutifs qui peuvent déchiffrer l'évolution des populations microbiennes au cours du temps. Les ADNr s'organisent en opérons et peuvent être présents en multi-copies (de 1 à 15 copies par génome bactérien) (Rainey *et al.*, 1996). Ils sont considérés comme des horloges moléculaires car, en évoluant plus lentement que le reste du génome, ils permettent de fournir des indications sur l'évolution des populations (Woese, 1987). Les ADNr qui codent la petite sous-unité du ribosome sont utilisés comme marqueurs, à savoir l'ARNr 18S chez les eucaryotes et l'ARNr 16S pour les procaryotes.

L'ARNr 16S contient environ 1 500 nucléotides et possède neuf régions variables, inter-espacées de régions hautement conservées (Figure 5, d'après Reller *et al.*, 2007). Les régions conservées ont permis la mise au point d'amorces dites "universelles" qui sont à la base de l'amplification de portions d'ADN par polymérisation en chaîne (PCR), et permettent ensuite le séquençage de cette portion d'ADN (Reller *et al.*, 2007).

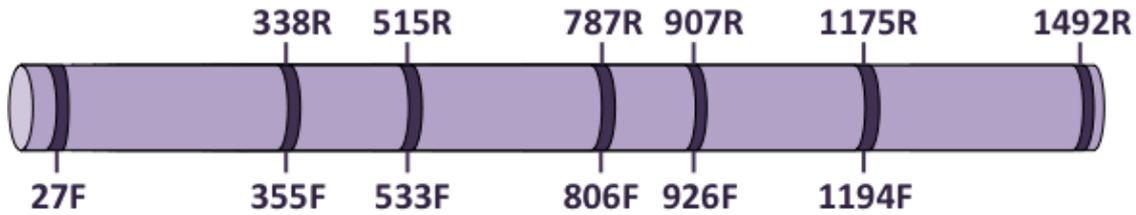


Figure 5 : Représentation schématique du gène codant pour l'ARNr 16S

les régions foncées représentent les régions hautement conservées permettant la conception d'amorces sens (F : forward) et anti-sens (R : reverse) nécessaires à l'amplification du fragment

L'affiliation taxonomique est alors possible grâce aux banques de données spécialisées dans les séquences de l'ADNr 16S. Les plus utilisées sont les bases de données SILVA (<https://www.arb-silva.de>), Greengenes (<http://greengenes.secondgenome.com>) et NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

1.3. Les techniques de séquençage nouvelle génération

A la suite des travaux de Sanger *et al.* (1992), une nouvelle génération de techniques de séquençage a vu le jour il y a une décennie, qui permettent d'amplifier l'ADN issu d'environnements complexes tel le sol. Malgré leurs particularités, ces techniques suivent toutes les grandes étapes suivantes : i) amplification par PCR, ii) séquençage avec l'analyse des nucléotides correspondant à chaque cycle de séquençage et iii) analyse bioinformatique des données. Ces méthodes sont plus rapides car elles s'appuient sur la lecture directe des brins d'ADN synthétisés.

Ainsi, se sont développées les techniques de pyroséquençage (454 Life Sciences, Roche Diagnostics, Bâle, Suisse), de séquençage par ligation (SOLiD™, Life Technologies, Carlsbad, USA) et de séquençage avec des terminateurs réversibles dit séquençage Illumina (HiSeq2000, Illumina/Solexa, San Diego, USA) (Metzker, 2010 ; Woollard *et al.*, 2011).

1.3.1. Pyroséquençage 454

Cette méthode a vu le jour en 2005. Dans un premier temps, l'ADN est fragmenté en subissant des cassures mécaniques par nébulisation (méthode shotgun). La PCR est ensuite conduite en émulsion ; les brins d'ADN sont fixés à des microbilles magnétiques réparties dans des microtubes. Ceci permet une lecture simultanée de plusieurs millions de réactions indépendantes de 400 pb. La lecture des nucléotides insérés se fait par une réaction chimio-luminescente qui révèle ainsi la séquence amplifiée. Roche a cependant arrêté la fabrication de séquenceur en 2015 et l'assistance à cette technique mi-2016 (<https://www.roche.com>).

1.3.2. Séquençage par ligation

Le séquençage par ligation a débuté en 2006. Les premières étapes sont semblables à celles du pyroséquençage, mais les microbilles magnétiques sont fixées à une plaque de verre. La réplication des brins d'ADN s'appuie dans ce cas sur le principe de ligation, intervenant de manière naturelle dans la réparation de l'ADN. La ligase ajoute un bloc de huit bases à la nouvelle séquence d'ADN comprenant deux bases complémentaires au brin à séquencer et six bases universelles reliées à un marqueur au fluor. Les six bases obsolètes et le fluorochrome seront éliminées par clivage, permettant une lecture des séquences amplifiées par fluorescence. Il est possible de lire 1,5 milliards de séquences de 75 paires de bases en simultané. De plus, cette technique permet une correction des erreurs en temps réel rendant ce système dix fois plus performant que le pyroséquençage (<https://www.thermofisher.com>).

1.3.3. Séquençage Illumina

Pour cette technique, qui date de 2007, l'amplification de l'échantillon se fait après fixation des brins d'ADN sur un support solide (flowcell). Chaque base d'ADN incorporée est marquée par un fluorochrome, permettant une lecture par laser à chaque cycle d'incorporation. Le fluorochrome est ensuite clivé, permettant l'addition d'une nouvelle base marquée pouvant être lue. La lecture est donc effectuée cycle après cycle, permettant l'acquisition en parallèle de plus de 3 milliards de séquences de 300 paires de bases (<https://www.illumina.com>).

2. Les microorganismes en milieux ultramafiques

2.1. La spécificité de la microflore ultramafique

En raison de leurs propriétés géochimiques particulières, les sols ultramafiques hébergent des communautés microbiennes spécifiques car elles sont exposées à de fortes concentrations de métaux (Schipper et Lee, 2004 ; Rajkumar *et al.*, 2009b ; Branco, 2010). Par conséquent, ces communautés microbiennes présentent des particularités évolutives et physiologiques à leur environnement local, à l'instar des communautés végétales endémiques des régions ultramafiques (Oline, 2006).

La diversité microbienne dans les zones ultramafiques est surtout connue au travers de la composante bactérienne du sol (Lipman, 1926 ; Mengoni *et al.*, 2001, 2004 ; Idris *et al.*, 2004 ; Schipper et Lee, 2004 ; DeGroot *et al.*, 2005 ; Oline, 2006 ; Lenczewski *et al.*, 2009 ; Becerra-Castro *et al.*, 2013 ; Bordez *et al.*, 2016 ; Lopez *et al.*, 2017). Quelles que soient les conditions environnementales, trois phyla dominent : les *Proteobacteria*, les *Acidobacteria* et les *Actinobacteria* (Mengoni *et al.*, 2001 ; Oline, 2006 ; Pal *et al.*, 2007 ; Roesch *et al.*, 2007 ; Rajkumar *et al.*, 2009b ; Delmont *et al.*, 2012 ; Lopez *et al.*, 2017). Les communautés bactériennes présentes en sols ultramafiques, caractérisées par clonage et séquençage du gène de l'ARNr 16S, n'apparaissent pas différentes de celles issues de sols non ultramafiques, avec une prédominance des phyla *Proteobacteria* et *Actinobacteria* (Oline, 2006). Le phylum *Acidobacteria* est aussi très abondant dans ces milieux (Pessoa-Filho *et al.*, 2015). Ce résultat confirme celui d'une étude réalisée en Nouvelle-Calédonie qui montre une prédominance des *Acidobacteria* dans les sites miniers sans couvert végétal, à l'inverse de ceux revégétalisés par des plantes indigènes et possédant une forte abondance de *Proteobacteria* (Herrera *et al.*, 2007).

En ce qui concerne la diversité fongique en sols ultramafiques, seuls les champignons symbiotiques, comme les mycorhizes à arbuscules (Schechter et Bruns, 2008 ; Fitzsimons et Miller, 2010) ou les champignons ectomycorhiziens (Gonçalves *et al.*, 2007 ; Urban *et al.*, 2008 ; Branco, 2010) ont été étudiés. Pour les champignons telluriques saprophytes, il a été montré en Nouvelle-Calédonie qu'ils sont dominés par les *Ascomycota* (Daghino *et al.*, 2012) et présentent une grande tolérance aux stress métalliques (Likar et Regvar, 2009).

Les fortes concentrations en métaux des sols ultramafiques réduisent la biomasse microbienne (Wang *et al.*, 2006), affectent certaines activités enzymatiques microbiennes (Kandeler *et al.*, 1996 ; Wang *et al.*, 2006), en particulier celles impliquées dans les cycles biogéochimiques (Kuperman et Carreiro, 1997 ; Kandeler *et al.*, 2000a ; Alkorta *et al.*, 2011), et induisent le développement de résistances aux métaux chez les bactéries (Nannipieri *et al.*, 2012). La structure et la diversité des communautés microbiennes sont alors modifiées (Sandaa *et al.*, 1999 ; Mengoni *et al.*, 2001 ; Kamnev *et al.*, 2005 ; Pessoa-Filho *et al.*, 2015). Cependant, il a été observé que l'augmentation des concentrations de métaux dans des sols ultramafiques n'était pas corrélée aux propriétés biologiques, tels que le profil de réponse catabolique, la biomasse et la respiration microbienne (Schipper et Lee, 2004). Ces données contradictoires pourraient être attribuées aux différences de sensibilité des microorganismes aux métaux et à la forme sous laquelle les métaux sont présents dans le sol (spéciation).

2.2. La réponse des bactéries au Ni

Plusieurs processus peuvent conférer aux bactéries la résistance aux métaux, qui interviennent en amont ou en aval de l'internalisation du métal au sein de la bactérie (Figure 6). La biosorption du métal sur la structure cellulaire résulte de la synthèse de biosorbants par les bactéries (Chardot *et al.*, 2005). Ceci peut entraîner une diffusion passive de l'élément dans le cytoplasme bactérien. A l'inverse, une internalisation *via* une inclusion peut résulter de la présence de protéines de transport spécialisées. Après internalisation, le métal est soit pompé activement pour retourner dans l'environnement par un processus d'efflux, soit séquestré sous une forme inerte, ce qui limite sa toxicité. Il s'agit, dans ce dernier cas, de la bioaccumulation. La bactérie synthétise des substances organiques (comme les exopolymères) ou inorganiques (métabolites) qui interagissent avec les métaux qui prennent des formes insolubles et limitent l'internalisation du Ni (Valls et De Lorenzo, 2002).

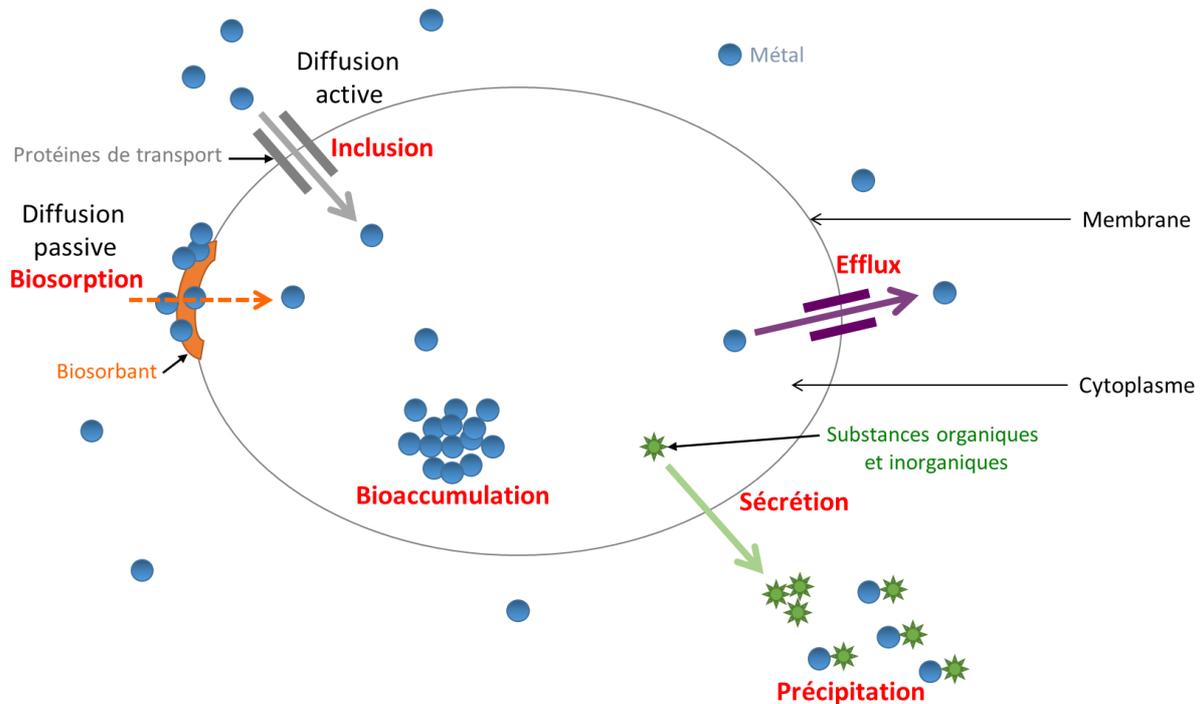


Figure 6 : Principaux processus impliqués dans la résistance des bactéries aux métaux

3. Les bactéries rhizosphériques

3.1. Influence des paramètres environnementaux sur la diversité des communautés rhizosphériques

3.1.1. L'interface sol racine

La rhizosphère, décrite pour la première fois par Hiltner (1904), correspond au volume de sol sous l'influence des racines vivantes, caractérisé par une intense activité microbienne. Elle se limite à quelques millimètres d'épaisseur (en excluant les mycorhizes). Il s'agit d'une interface particulière en raison des différentes actions exercées par les racines sur le milieu extérieur qui créent ainsi des conditions physico-chimiques différentes de celles du sol non rhizosphérique (Morel *et al.*, 1986 ; Hartmann *et al.*, 2008). Divers processus sont en cause tels que la rhizodéposition (exsudats, sécrétions et mucilages), la respiration racinaire, l'excrétion de protons et le prélèvement de l'eau et des solutés par les racines (Nguyen, 2003 ; Chardot *et al.*, 2005). Les propriétés abiotiques et biotiques particulières de la rhizosphère sont dues à la libération dans le sol de nombreux composés (diffusion de sucres, acides aminés et organiques ; sécrétion de mucilages, de phytosidérophores, de composés allélopathiques ; excrétion d'ions carbonate, de protons, d'éthylène) qui stimulent les microorganismes du sol (Benizri *et al.*, 2001 ; Nguyen, 2003 ; Dennis *et al.*, 2010).

Du fait de sa richesse en éléments nutritifs, la rhizosphère contient ainsi 10 à 100 fois plus de microorganismes par g de sol que le sol non rhizosphérique (Hiltner, 1904 ; Rivière, 1960 ; Cunningham et Ow, 1996 ; Nguyen, 2003). Cette interface est donc le siège d'interactions multiples qui impliquent les métaux (Morel *et al.*, 1986), plaçant l'étude de la rhizosphère et des interactions avec les microorganismes telluriques comme primordiale chez les plantes hyperaccumulatrices.

3.1.2. Les facteurs influençant la diversité bactérienne rhizosphérique

Les communautés bactériennes rhizosphériques sont soumises à l'influence des plantes avec lesquelles elles vivent en association. Les plantes sont à même d'exercer une pression de sélection sur les bactéries environnantes, permettant d'amener un cortège de microorganismes spécifiques pouvant, par le biais de fonctions particulières, dégrader les sources de nutriments qu'elles produisent. En effet, la rhizodéposition favorise le développement des microorganismes rhizosphériques, leur fournissant une source d'énergie et de nutriments (Baudoin *et al.*, 2002 ; Nguyen, 2003 ; Buée *et al.*, 2009a).

Par ailleurs, les rhizodépôts jouent un rôle structurant majeur des communautés microbiennes à proximité des racines (Grayston *et al.*, 1998 ; Marschner *et al.*, 2011 ; Berendsen *et al.*, 2012). Apportés à une terre dans plante, les exsudats racinaires peuvent en modifier le microbiome (Badri *et al.*, 2013). De même, l'amendement de terres non plantées avec des mucilages collectés de racines de maïs modifie la structure génétique des communautés bactériennes du sol (Benizri *et al.*, 2007). Ainsi, de nombreux auteurs aboutissent au consensus général du rôle structurant des rhizodépôts sur les communautés bactériennes telluriques. En effet, l'espèce végétale et son stade phénologique (Smalla *et al.*, 2001 ; Lerner *et al.*, 2006), le cultivar d'une même espèce (Andreote *et al.*, 2009) voire la zone de la racine (Baudoin *et al.*, 2002 ; Lundberg *et al.*, 2012), ou encore la diversité des plantes du couvert végétal (Latour *et al.*, 1996 ; Stephan *et al.*, 2000 ; Kuske *et al.*, 2002 ; Marschner *et al.*, 2004) ont une influence sur la diversité bactérienne tellurique.

Outre l'action des plantes sur la diversité des communautés bactériennes rhizosphériques, les conditions environnementales jouent un rôle important dans le déterminisme de cette diversité (Martiny *et al.*, 2006), comme cela a été montré pour le type de sol et de ses paramètres physico-chimiques sur la structure, les fonctions et la diversité des communautés rhizosphériques (Berg et Smalla, 2009).

Un grand nombre de travaux a montré que le pH du sol était le principal facteur de contrôle de la diversité bactérienne (Fierer et Jackson, 2006 ; Lauber *et al.*, 2009 ; Philippot *et al.*, 2009 ; Rousk *et al.*, 2010). Ainsi, les abondances relatives des *Acidobacteria* diminuent avec l'augmentation du pH, tandis que celles des *Actinobacteria* et *Bacteroidetes* augmentent. Toutefois, les abondances relatives des *Alpha*, *Beta* et *Gamma-Proteobacteria* ne varient pas significativement avec le pH du sol. Il semblerait que l'abondance des *Alpha* et *Beta-Proteobacteria* soit plus étroitement liées à la disponibilité en C organique qu'au pH des sols (Bowen et Rovira, 1999 ; Lugtenberg et Dekkers, 1999). D'autres facteurs déterminants ont été avancés tels que la disponibilité en nutriments (Broughton et Gross, 2000 ; Liu *et al.*, 2010) et la salinité du substrat (Lozupone *et al.*, 2011).

Les pratiques agricoles, telles que l'apport d'une fertilisation minérale, influencent aussi la composition de la communauté microbienne tellurique. C'est ainsi que sur la base d'une approche de pyroséquençage, la fertilisation azotée exerce des effets significatifs sur la composition des communautés microbiennes (Fierer *et al.*, 2012). L'abondance relative des phyla des *Proteobacteria* et des *Bacteroidetes*, connus pour être copiotrophes, s'accroît dans des parcelles à niveau d'engrais minéral élevé, alors que les taxons oligotrophes (principalement les *Acidobacteria*) montrent un comportement opposé. Enfin, des pratiques culturales telles les cultures intercalaires (Saad *et al.*, 2018), le type de rotation (Cavagnaro et Martin, 2011) ou le travail du sol (van Capelle *et al.*, 2012), ont un impact sur la diversité microbienne (Philippot *et al.*, 2013).

Le sol a une influence profonde sur l'assemblage des communautés bactériennes mais aussi fongiques dans la rhizosphère (Philippot *et al.*, 2013). Les caractéristiques physico-chimiques complexes des sols affectent la physiologie des plantes et, en conséquence, les profils d'exsudation des racines, qui à leur tour influencent la composition du microbiote de la rhizosphère. Ceci pourrait expliquer les conclusions contradictoires concernant l'origine du déterminisme de la diversité bactérienne rhizosphérique, qui semble être, au final, la résultante de différents paramètres interagissant entre eux. Ainsi, cerner précisément le déterminisme de la diversité bactérienne rhizosphérique reste complexe et demeure encore aujourd'hui un challenge, d'autant que la majorité des études sur la diversité microbienne est limitée à des échelles spatiales réduites. Au niveau mondial, Martiny *et al.* (2006) ont mis en avant que ce déterminisme, à grande échelle, reposait prioritairement sur les conditions climatiques et non en lien directement avec les paramètres physico-chimiques des sols.

Concernant les sols ultramafiques, il ressort que la diversité microbienne dépend de facteurs tels que la température, l'humidité et la disponibilité du C organique (Sandaa *et al.*, 1999 ; Mengoni *et al.*, 2001 ; Idris *et al.*, 2004 ; Rajkumar *et al.*, 2009a). Une étude précédente, basée sur une approche de pyroséquençage, a aussi mis en évidence que le Ni est le facteur principal gouvernant la diversité des communautés bactériennes rhizosphériques de *O. chalcidica* endémique du massif montagneux de Pinde en Grèce (Lopez *et al.*, 2017). En effet, il est connu que les métaux, tel le Ni, peuvent diminuer et moduler la diversité bactérienne (Stefanowicz *et al.* ; Torsvik *et al.*, 1998 ; Sandaa *et al.*, 1999 ; Nwuche et Ugoji, 2010). Cependant, ces différentes études n'ont été effectuées qu'à des échelles spatiales restreintes.

3.2. La diversité bactérienne rhizosphérique en sols ultramafiques

Malgré l'intérêt accordé à l'étude des communautés microbiennes dans les sols ultramafiques, peu d'études se sont intéressées à la caractérisation de la diversité génétique des communautés bactériennes rhizosphériques des plantes hyperaccumulatrices de Ni (Idris *et al.*, 2004 ; Mengoni *et al.*, 2004).

La plupart des études portant sur la diversité bactérienne se sont faites *via* des approches culture-dépendantes. Ainsi, il ressort que les bactéries présentes au niveau de la rhizosphère des plantes hyperaccumulatrices de métaux appartiennent principalement aux genres *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Leifsonia*, *Niocardioides*, *Paenibacillus* (Gram positif), *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Sphingomonas* et *Variovorax*, *Acidovorax*, *Caulobacter*, *Rhizobium*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas* (Gram négatif). Ces genres sont connus pour être fortement tolérants aux métaux, dont le Ni (Mengoni *et al.*, 2001 ; Abou-Shanab *et al.*, 2003b, 2007 ; Oline, 2006 ; Pal *et al.*, 2007, 2007 ; Rajkumar et Freitas, 2008 ; Turgay *et al.*, 2011).

Les effets bénéfiques induits par ces microorganismes résistants aux métaux ont attiré l'attention de nombreux chercheurs en raison de leurs applications potentielles dans des stratégies de dépollution et de réhabilitation des sols (Abou-Shanab *et al.*, 2003b ; Chardot *et al.*, 2005). En effet, ces bactéries peuvent contribuer à diminuer le stress de la plante, augmenter la longueur et la surface racinaire permettant une plus grande surface d'échange et d'absorption, ou augmenter la disponibilité des éléments traces dans la rhizosphère et donc potentiellement influencer leur transfert vers la plante (Glick et Stearns, 2011 ; Sessitsch *et al.*, 2013). Ainsi, l'utilisation de bactéries d'intérêt associées aux plantes pourrait améliorer l'efficacité de la phytoextraction. Il s'agit des bactéries qualifiées de PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*).

4. Les bactéries PGPR

Cet acronyme désigne les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes. Elles représentent de 2 à 5% de la totalité des rhizobactéries et exercent un effet bénéfique sur la croissance des plantes (Antoun et Kloepper, 2001). Parmi les PGPR, certaines sont connues pour leur résistance à plusieurs polluants métalliques et peuvent ainsi être présentes dans la rhizosphère des plantes hyperaccumulatrices (Rajkumar *et al.*, 2009b).

Les PGPR sont à même de solubiliser les formes organiques du P des sols, de produire des régulateurs de croissance (composés auxiniques, des cytokinines et des gibbérellines) et de synthétiser des sidérophores, jouant un rôle dans le transport du fer présent dans le sol vers les cellules racinaires (Rodríguez et Fraga, 1999 ; Whipps, 2001 ; Ma *et al.*, 2009 ; Ahmed et Holmström, 2014). Les sidérophores peuvent aussi former des complexes stables avec d'autres métaux tels que Al, Ni, Cu, Zn, Ga, Cd, In et Pb (Glick et Bashan, 1997 ; Schalk *et al.*, 2011 ; Rajkumar *et al.*, 2012). Les plantes récupèrent le métal *via* divers mécanismes, comme, par exemple, l'absorption de complexes sidérophore-métal, ou par une réaction d'échange de ligands (Schmidt, 1999). Les effets de l'inoculation de plantes hyperaccumulatrices par des bactéries productrices de sidérophores ont fait l'objet d'une attention particulière (Rajkumar *et al.*, 2009a).

Les bactéries PGPR peuvent aussi réguler la synthèse d'éthylène et diminuent ainsi le stress induit chez la plante par la présence de métaux (Whipps, 2001 ; Glick, 2014). L'éthylène, en tant que phytohormone, montre une grande diversité d'action en influençant la germination des graines, la formation de fleurs, la maturation des fruits, la sénescence et l'abscission des feuilles, la nodulation chez les Légumineuses et le développement racinaire (Nultsch, 1998 ; Glick, 2014). La biosynthèse de l'éthylène a pour origine la méthionine. Cette phytohormone provient de l'ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) qui est son précurseur chez les plantes (Adams et Yang, 1979). L'activité ACC déaminase (ACCd) a été étudiée la première fois par Honma et Shimomura (1978). Elle est retrouvée entre autres chez les PGPR *Pseudomonas*, *Variovorax*, *Ralstonia*, *Agrobacterium* ou *Rhizobium* (Antoun et Prévost, 2006 ; Duan, 2007 ; Nascimento *et al.*, 2014 ; Durand *et al.*, 2015). L'enzyme ACCd est le plus souvent sous une forme multimérique, à savoir en dimère ou trimère de sous-unités de 35 à 42 kDa et son activité est localisée dans le cytoplasme bactérien (Jacobson *et al.*, 1994 ; Glick, 2014). Les microorganismes possédant une activité ACCd peuvent synthétiser l'acide indole 3-acétique (AIA) en réponse à la présence de précurseurs contenus dans les exsudats racinaires des plantes (Figure 7 ; d'après Glick *et al.*, 1998). L'AIA absorbé par la plante, en plus

de stimuler l'élongation et la prolifération cellulaire, va augmenter l'activité ACC synthase qui permet de convertir la S-adénosylmethionine (SAM) en ACC. Les bactéries à proximité des racines peuvent absorber l'ACC, qui constitue une source de C et de N, après transformation en ammoniac et en α -kétobutyrate. L'hydrolyse de l'ACC par les bactéries résulte de l'activité de l'ACCd, ce qui conduit à une diminution de sa concentration dans l'environnement racinaire. Ainsi, pour équilibrer la concentration en ACC, à la fois dans l'ectorhizosphère mais aussi dans les tissus racinaires, la plante va exsuder davantage d'ACC (Glick *et al.*, 1998 ; Grichko et Glick, 2001). Il en résulte au final une diminution de la concentration en éthylène dans les tissus végétaux (Moëgne-Loccoz et Défago, 2004 ; Stearns *et al.*, 2005 ; Blaha *et al.*, 2006 ; Han *et al.*, 2015).

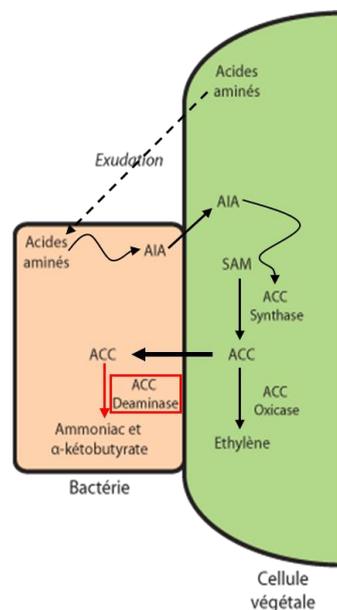


Figure 7 : Inhibition de la biosynthèse d'éthylène par l'ACC déaminase

Les bactéries PGPR peuvent également augmenter la résistance des plantes aux métaux. En effet, le peptide EC20 synthétisé par la rhizobactérie PGPR *Pseudomonas putida* peut se lier au Cd, et permet à la fois un prélèvement accru du métal par les plantes tout en diminuant sa toxicité pour les tissus végétaux (Wu *et al.*, 2006). Les bactéries PGPR, via une synthèse d'antifongiques ou d'antibiotiques, peuvent aussi jouer un rôle d'agents de biocontrôle contre des organismes phytopathogènes (Glick *et al.*, 2007).

Ainsi, via leurs différentes actions, les PGPR pourraient favoriser le développement des plantes cultivées sur des sols naturellement bien pourvus en métaux ou soumis à une pollution métallique (Figure 8).

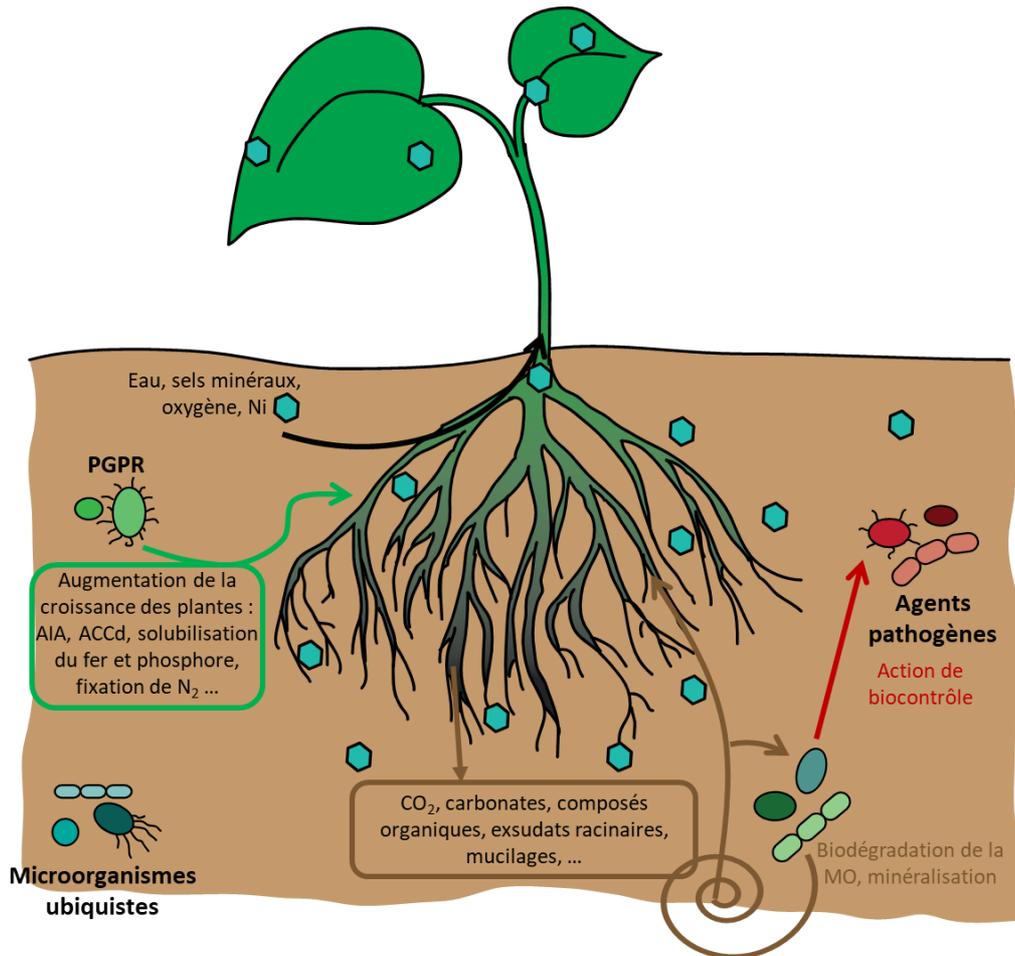


Figure 8 : Plante hyperaccumulatrice en sol ultramafique : Interface sol-racines-PGPR

AIA : auxines, ACCd : 1-aminocyclopropane-1-carboxylate déminase, MO : matière organique

Plusieurs travaux témoignent de l'intérêt d'inoculer des plantes hyperaccumultrices de Ni avec des bactéries PGPR afin d'augmenter la disponibilité du Ni dans le sol et d'améliorer son accumulation. L'inoculation de trois souches PGPR ont montré une augmentation de la phytoextraction de Ni par *A. murale* de 17% (inoculé par *Sphingomonas macrogotaabidus*), 24% (*Micorbacterium liquefaciens*) et 32% (*Micorbacterium arabinogalactanolyticum*) (Abou-Shanab *et al.*, 2003a). De même, une augmentation des biomasses aériennes et racinaires et de l'accumulation de Ni, Cu et Zn chez *Ricinus communis*, a été observée après inoculation par deux espèces PGPR du genre *Pseudomonas* : PsM6 (*Pseudomonas* sp.) et PjM15 (*Pseudomonas jessenii*) (Rajkumar et Freitas, 2008). Un autre exemple est l'inoculation d'*A. serpyllifolium* ssp. *malacitanum* par deux souches d'*Arthrobacter* (SBA82 et LA44) qui a induit une augmentation des biomasses végétales et des concentrations en Ni des hyperaccumulateurs (Becerra-Castro *et al.*, 2013). Enfin, la bactérie PGPR *Variovorax paradoxus* isolées de la rhizosphère de deux associations de plantes hyperaccumultrices (*B. tymphaea*/*N. tymphaea* et *B. tymphaea*/*A. murale*) s'est révélée efficace à augmenter les biomasses végétales et les quantités de Ni extraites (Durand *et al.*, 2015).

Objectifs de la thèse

La microflore rhizosphérique est étroitement dépendante des conditions de milieu et de l'activité des racines. Les métaux influencent sa taille, sa diversité et ses activités (Kandeler *et al.*, 2000 ; Lorenz *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2007 ; Bourceret *et al.*, 2016). Mais peu de travaux ont étudié la caractérisation de la diversité des communautés bactériennes rhizosphériques de plantes hyperaccumulatrices qui se développent dans des sols naturellement bien pourvus en ETM.

Le sol est un milieu vivant composé de nombreux microorganismes, essentiellement hétérotrophes, c'est-à-dire ayant besoin d'une source de C organique pour croître. La libération de C organique dans la rhizosphère (rhizodépôts) constitue une source importante de nutriments pour la croissance de ces microorganismes (0,6 à 27% de la masse sèche de la plante). Cette interaction trophique est à la base de l'effet rhizosphère, qui contient ainsi 10 à 100 fois plus de microorganismes par g de sol que le sol non rhizosphérique (Hiltner, 1904 ; Rivière, 1960 ; Cunningham et Ow, 1996 ; Nguyen, 2003).

Si le processus de rhizodéposition a été maintenu au cours de l'évolution des végétaux, c'est parce que les coûts investis, qui semblent *a priori* ne bénéficier qu'aux microorganismes hétérotrophes de la rhizosphère, sont compensés par des bénéfices (Morgan *et al.*, 2005). En effet, les plantes interagissent étroitement avec la microflore rhizosphérique qui peut, d'une part, fournir des éléments minéraux nécessaires à la plante et, d'autre part, améliorer leur résistance aux agents pathogènes telluriques et à des stress tels que ceux induits par les métaux (Kloepper *et al.*, 1989 ; Leyval *et al.*, 1997 ; Lebeau *et al.*, 2008). Les microorganismes rhizosphériques peuvent également modifier la mobilité et la disponibilité des métaux présents dans le sol, favorisant ou non leur transfert de la rhizosphère à la plante et donc la phytoextraction (Tonin *et al.*, 2001 ; Whiting *et al.*, 2001a ; Bani *et al.*, 2007 ; Kidd *et al.*, 2009 ; Sessitsch *et al.*, 2013).

A ce jour, le déterminisme de la diversité des communautés microbiennes associées à la rhizosphère de plantes hyperaccumulatrices de métaux reste non élucidé. Les facteurs qui participent à la structuration et à la diversité des communautés des sols ultramafiques contenant des niveaux élevés de Ni sont inconnus. Outre l'intérêt fondamental de ces connaissances, appréhender le déterminisme de la microflore rhizosphérique des hyperaccumulateurs pourrait contribuer à la mise en œuvre d'une agromine plus performante. Ainsi, l'inoculation de bactéries d'intérêt capables, d'une part, de stimuler la croissance des plantes et, d'autre part, d'améliorer l'efficacité d'extraction du Ni par les plantes, pourrait répondre aux besoins d'optimisation des cultures d'hyperaccumulateurs.

Le premier objectif de ce doctorat a été d'apporter **une connaissance sur la structure et sur la diversité des communautés bactériennes présentes dans la rhizosphère des plantes hyperaccumulatrices de Ni.**

Les questions scientifiques étudiées ont été :

- Quels sont les facteurs, abiotiques et/ou biotiques, qui contrôlent la structuration et la diversité des communautés bactériennes présentes dans les rhizosphères de plantes hyperaccumulatrices de Ni ?
- Comment peut-on hiérarchiser les différents facteurs abiotiques et biotiques qui influencent l'environnement rhizosphérique et déterminent la structuration et la diversité des communautés bactériennes ?
- Quelle loi du déterminisme de la structuration et de la diversité de ces communautés bactériennes peut être dégagée en fonction du climat, des caractéristiques physico-chimiques des sols considérés et des espèces hyperaccumulatrices ?
- Le déterminisme de la diversité bactérienne est-il le même quelle que soit l'échelle prise en compte, climatique ou planétaire ?

La démarche générale a reposé sur i) la sélection de sites ultramafiques dans deux régions climatiques contrastées, méditerranéenne (Grèce et Albanie) et tropicale (Indonésie et Malaisie), ii) la collecte de plantes et terres rhizosphériques associées, iii) la mise en œuvre du séquençage haut débit pour caractériser la diversité des communautés bactériennes de la rhizosphère de hyperaccumulateurs, iv) la mesure des paramètres physico-chimiques des terres rhizosphériques, enfin v) l'analyse statistique couplant les différentes variables de diversité bactérienne et des facteurs et paramètres abiotiques.

Le deuxième objectif de ce doctorat a été d'étudier **les applications potentielles de cette connaissance à l'optimisation de l'agromine**. La voie choisie a reposé sur l'inoculation de bactéries PGPR dans la rhizosphère de plantes hyperaccumulatrices de Ni. Elle s'est appuyée sur des bactéries capables de bioaccumuler le Ni, isolées dans les rhizosphères des plantes étudiées.

Les questions étudiées ont été :

- L'inoculation d'une souche bactérienne PGPR bioaccumulatrice ou non de Ni peut-elle modifier la phytoextraction d'une plante hyperaccumulatrice ?
- L'inoculation d'une souche bactérienne PGPR peut-elle, au même titre qu'un amendement chimique ou organique, modifier la microflore rhizosphérique ?

La démarche adoptée pour répondre à ce questionnement a été i) l'isolement de bactéries résistantes au Ni (Ni^{R}) de la rhizosphère d'hyperaccumulateurs, ii) le criblage des bactéries Ni^{R} sur la base de leurs traits PGPR, iii) la mesure du potentiel de bioaccumulation du Ni par ces bactéries enfin iv) la culture en conditions contrôlées de plantes hyperaccumulatrices inoculées avec des bactéries PGPR capables de bioaccumuler plus ou moins le Ni. Les interprétations ont fait appel à l'analyse des paramètres abiotiques (caractéristiques physico-chimiques du sol), biotiques (dosage de métaux dans les plantes hyperaccumulatrices, diversité bactérienne présente) ainsi qu'à une approche fonctionnelle (activités enzymatiques microbiennes des sols rhizosphériques et prédiction des métagénomes fonctionnels).

Partie 2 : La diversité bactérienne des environnements ultramafiques

Introduction

Les sols ultramafiques sont caractérisés par une forte toxicité métallique due à une forte concentration en éléments sidérophiles (Fe, Cr, Ni, Co, Mn et Mg), ainsi que par une faible teneur en éléments nutritifs tels que N, P, K et Ca. Les milieux ultramafiques exercent une pression de sélection sur l'ensemble des organismes : plantes, faune, microflore. En effet, ces particularités ont engendré une sélection de plantes adaptées à ces milieux, formant des écosystèmes spécifiques (Reeves *et al.*, 2018). De nombreuses plantes hyperaccumulatrices de Ni, capables de supporter de fortes teneurs en cet élément et de l'accumuler dans leurs parties aériennes, sont ainsi présentes dans ces milieux.

Mais qu'en est-il de la pression de sélection exercée sur les bactéries de ces environnements ultramafiques ?

La majorité des études sur la diversité microbienne dans les sols ultramafiques sont limitées à des échelles spatiales réduites (Lipman, 1926 ; Mengoni *et al.*, 2001, 2004 ; Idris *et al.*, 2004 ; Schipper et Lee, 2004 ; DeGrood *et al.*, 2005 ; Oline, 2006 ; Lenczewski *et al.*, 2009 ; Becerra-Castro *et al.*, 2013 ; Bordez *et al.*, 2016 ; Lopez *et al.*, 2017). De manière générale, il ressort que la diversité microbienne dans ces sols dépend de facteurs tels que la température, l'humidité, le type de métal et la disponibilité du C organique des sols. Une étude précédente, basée sur une approche de pyroséquençage, a mis en évidence que le Ni des sols extractible au DTPA est le facteur principal gouvernant la diversité des communautés bactériennes Rhizosphériques de *O. chalcidica* endémique du massif montagneux de Pinde en Grèce (Lopez *et al.*, 2017).

Pour cerner le déterminisme de la diversité des communautés bactériennes rhizosphériques de plantes hyperaccumulatrices de Ni dans les sols ultramafiques, nous avons choisi de caractériser le microbiome endémique de deux régions contrastées du monde, d'un point de vue climatique, riches en territoires ultramafiques. Ces zones ultramafiques couvrent environ 1% de la surface terrestre (Echevarria, 2018). Ainsi, ont été sélectionnés le territoire des Balkans, avec l'Albanie et la Grèce, et celui du Sud-Est asiatique avec l'Indonésie et la Malaisie.

Les sols ultramafiques sont largement présents dans les Balkans, comme en Albanie où ils représentent environ 10% de la surface du territoire (Bani, 2009). Les hyperaccumulateurs recensés sur ce territoire appartiennent essentiellement à la famille des *Brassicaceae* tels *O. chalcidica*, *O. smolikana*, *O. rigida*, *N. ochroleuca* et *B.* subsp. *markgrafii* (Bani *et al.*, 2013 ; Cecchi *et al.*, 2018 ; Reeves *et al.*, 2018). Une plus grande diversité d'hyperaccumulateurs de Ni a été recensée en Grèce, avec en plus les genres *Leptoplax* (*Brassicaceae*) et *Centaurea* (*Asteraceae*).

Dans le Sud-Est asiatique, les sols ultramafiques de l'état de Sabah en Malaisie (île de Bornéo) sont étendus et occupent une superficie totale d'environ 3 500 km² (Proctor *et al.*, 1988). Le Parc Kinabalu a été créé en 1964 en tant que première zone totalement protégée à Sabah. Il possède une superficie de 754 km² autour du Mont Kinabalu, la plus haute montagne de l'île de Bornéo, incluant des territoires ultramafiques (Beaman, 2005). Les hyperaccumulateurs de Ni de Sabah appartiennent principalement aux familles botaniques des *Phyllanthaceae*, *Rubiaceae*, *Salicaceae* et *Violaceae* (Reeves, 2006 ; van der Ent *et al.*, 2015a). Les hyperaccumulateurs connus de cette région sont *R. bengalensis* et *R. javanica* (*Violaceae*) (Brooks et Wither, 1977 ; Brooks *et al.*, 1977b), *Phyllanthus balgooyi* (*Phyllanthaceae*) (Baker *et al.*, 1992 ; Hoffmann *et al.*, 2003), *Dichapetalum gelonioides* (*Dichapetalaceae*) (Baker *et al.*, 1992), *Psychotria sarmentosa* (*Rubiaceae*) (Reeves, 2003) et *Shorea tenuiramulosa* (*Dipterocarpaceae*) (Proctor *et al.*, 1989). Une campagne de prospection a été réalisée en 2011, dans le Parc Kinabalu, par van der Ent *et al.* (2015a) pour un recensement de nouvelles espèces hyperaccumulatrices. Celle-ci a permis d'inventorier de nouvelles plantes hyperaccumulatrices telles, *Actephila alanbakeri* (*Phyllanthaceae*) (van der Ent *et al.*, 2015a,b), *Antidesma montisilam* (*Phyllanthaceae*) (Nkrumah *et al.*, 2018b) et *Pittosporum peridoticola* (*Pitosporaceae*) (Sugau et van der Ent, 2015).

Concernant l'Indonésie, elle possède des sols ultramafiques riches en latérites de Ni, représentant 70% des réserves de ce métal et contribuant actuellement à 40% de son approvisionnement mondial (Berger *et al.*, 2011 ; Butt et Cluzel, 2013). De grands gisements de latérites de Ni sont retrouvés sur l'île d'Halmahera, où les sols ultramafiques représentent une superficie de 8 000 km² (Mudd, 2009 ; van der Ent *et al.*, 2013a ; Galey *et al.*, 2017). Un grand projet industriel minier, visant à valoriser le gisement de Ni présent sur cette île, est le projet Weda Bay Nickel (WBN) porté par la compagnie ERAMET. Ce projet, qui couvre une zone de 58 874 ha avec des ressources estimées en Ni à 9,3 millions de t, cible une production de 65 000 tonnes de Ni par an (<http://www.eramet.com/projets/weda-bay-nickel-indonesie>). La création de mines à ciel ouvert, comme c'est le cas dans le projet WBN, entraîne la destruction de la couverture végétale. C'est ainsi qu'ERAMET a envisagé, en partenariat avec des chercheurs, de réaliser un inventaire des espèces végétales présentes sur leurs futurs sites d'exploitation de l'île d'Halmahera. En effet, les plantes hyperaccumulatrices de Ni, connues pour leur capacité d'une part, à se développer sur les sols ultramafiques et d'autre part, à accumuler ce métal dans leur partie aérienne, constituent un choix idéal en vue d'une restauration des sites exploités et d'une revégétalisation de ces zones minières. Avant ce projet, aucun hyperaccumulateur n'avait été recensé sur l'île d'Halmahera (Erskine *et al.*, 2018). Cependant, l'analyse de spécimens d'herbier d'Indonésie a conduit à la découverte des plantes hyperaccumulatrices suivantes : *R. bengalensis*, *R. javanica* (*Violaceae*), *Trichospermum kjellbergii* (*Tiliaceae*), *Planchonella oxyhedra* (*Sapotaceae*), *Myristica laurifolia* var. *bifurcata* (*Myristicaceae*), *Brackenridgea palustris* subsp. *kjellbergii* (*Ochnaceae*), *Psychotria* sp. (*Rubiaceae*), *Phyllanthus insulae-japen* et *Glochidion* aff. *acustylum* (*Phyllanthaceae*) (Wither et Brooks, 1977 ; Reeves, 2003). De plus, des travaux sur le terrain à Sulawesi ont mis en évidence *Sarcotheca celebica* (*Oxalidaceae*) et *Knema matanensis* (*Myristicaceae*) comme hyperaccumulateurs de Ni (van der Ent *et al.*, 2013a).

Nous détaillerons, dans un premier temps, les résultats obtenus indépendamment en Albanie, en Malaisie et en Indonésie. L'échantillonnage en Grèce étant restreint (collecte uniquement de 12 échantillons), ne sera pas étudié individuellement mais considéré dans l'analyse globale, que nous aborderons dans un deuxième temps.

Les 48 hyperaccumulateurs d'Albanie ont été prélevés avec leur terre rhizosphérique dans la région ultramafique de Shebenik. Les plantes échantillonnées sont des Brassicacées : *O. chalcidica* (Janka) Španiel & al. (anciennement *Alyssum murale* Waldst. & Kit), *O. rigida* (Nyár.) L. Cecchi & Selvi (anciennement *A. bertolonii*), *O. smolikana* (Nyár.) Španiel & al. (anciennement *A. smolikanum*) et *N. ochroleuca* (Boiss. & Heldr.) F.K. Mey.

Du fait, de la grande diversité d'hyperaccumulateurs recensés dans le Parc Kinabalu, 60 plantes appartenant à huit familles botaniques ont été prélevées dans l'état de Sabah en Malaisie avec leur terre rhizosphérique.

Pour caractériser les hyperaccumulateurs de Ni natifs de l'île d'Halmahera, des échantillons végétaux (feuilles, tiges racines, bois, écorces, fruits) de 10 familles botaniques et leur terre rhizosphérique ont été collectés. En effet, les prospections de terrain sur l'île d'Halmahera ont permis la collecte de plus de 800 échantillons de parties de végétaux ainsi que la collecte de 90 échantillons de terre (rhizosphériques ou non). Au total, 10 hyperaccumulateurs de Ni ont été découverts *in situ* appartenant aux familles des *Violaceae* (*Rinorea* aff. *bengalensis*), *Tiliaceae* (*Trichospermum morotaiense*), *Sapotaceae* (*Planchonella roxburghioides*), *Phyllanthaceae* (*Glochidion moluccanum*), *Moraceae* (*Ficus trachypison*), *Rosaceae* (*Prunus* sp.), *Apocynaceae* (*Cerbera* cf. *floribunda*), *Lecythidaceae* (*Barringtonia* sp.), *Aristolochiaceae* (*Aristolochia* sp.) et *Euphorbiaceae* (*Macaranga* sp.) (Lopez *et al.*, 2018).

Par la suite, un changement d'échelle sera effectué afin de passer d'études ciblées géographiquement à une étude globale à échelle mondiale de la diversité des communautés bactériennes rhizosphériques. Il s'agira ainsi de comprendre quel est, à l'échelle planétaire, le déterminisme de la diversité des communautés bactériennes rhizosphériques de plantes hyperaccumulatrices de Ni dans les sols ultramafiques. La démonstration s'appuiera sur un large échantillonnage de terres rhizosphériques de plantes hyperaccumulatrices de Ni (33 espèces) issues de deux régions ultramafiques contrastées d'un point de vue climatique (Albanie et Grèce d'une part, et Indonésie et Malaisie, d'autre part) et d'une analyse bioinformatique approfondie des données de séquençage couplée à des analyses statistiques multivariées. Ceci constitue au total une collection de 165 terres rhizosphériques et plantes hyperaccumulatrices associées. Dans ces analyses, seront pris en compte l'ensemble des paramètres, à savoir les facteurs physico-chimiques des sols, les facteurs climatiques, les données topographiques et également l'espèce de plante échantillonnée, afin de cerner le déterminisme de la diversité des communautés bactériennes rhizosphériques de plante hyperaccumulatrices de Ni à une échelle mondiale.

Matériel et méthodes

1. Sites et échantillonnages

Au total, 42 sites ont été sélectionnés sur lesquels ont été collectées 33 espèces de plantes différentes appartenant à 17 familles botaniques (Tableau 1). Ainsi, 178 plantes hyperaccumulatrices et leur terre rhizosphérique associée ont été échantillonnées, dont 12 échantillons destinés à étudier la diversité bactérienne rhizosphérique suivant la taille (âge) des plantes.

Tableau 1 : Nombre d'échantillons récoltés par espèces de plantes dans les différents pays sélectionnés

Pays	Famille	Genre et espèce	Nombre d'échantillons
Albanie	<i>Brassicaceae</i>	<i>Odontarrhena chalcidica</i>	30
	<i>Brassicaceae</i>	<i>Odontarrhena rigida</i>	6
	<i>Brassicaceae</i>	<i>Odontarrhena smolikana</i>	6
	<i>Brassicaceae</i>	<i>Noccaea ochroleuca</i>	6
Grèce	<i>Brassicaceae</i>	<i>Odontarrhena muralis s.l</i>	3
	<i>Brassicaceae</i>	<i>Odontarrhena chalcidica</i>	3
	<i>Brassicaceae</i>	<i>Bornmuellera tymphaea</i>	1
	<i>Asteraceae</i>	<i>Centaurea thracica</i>	1
	<i>Brassicaceae</i>	<i>Leptoplax emarginata</i>	3
	<i>Brassicaceae</i>	<i>Noccaea sp.</i>	1
	Indonésie	<i>Aristolchiaceae</i>	<i>Aristolchia sp.</i>
<i>Lecythidaceae</i>		<i>Barringtonia sp.</i>	1
<i>Apocynaceae</i>		<i>Cerbera floribunda</i>	3
<i>Moraceae</i>		<i>Ficus trachypison</i>	10
<i>Phyllanthaceae</i>		<i>Glochidion moluccanum</i>	2
<i>Euphorbiaceae</i>		<i>Macaranga sp.</i>	1
<i>Sapotaceae</i>		<i>Planchonella roxburghioides</i>	5
<i>Rosaceae</i>		<i>Prunus sp.</i>	1
<i>Violaceae</i>		<i>Rinorea aff. bengalensis</i>	8
<i>Tiliaceae</i>		<i>Trichospermum morotaiense</i>	13
Malaisie		<i>Phyllanthaceae</i>	<i>Actephila alanbakeri</i>
	<i>Salicaceae</i>	<i>Flacourtia kinabaluensis</i>	6
	<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Glochidion cf. rubrum</i>	1
	<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Glochidion sp.</i>	2
	<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Macaranga cf. lowii</i>	1
	<i>Sapindaceae</i>	<i>Mischocarpus sundaikus</i>	6
	<i>Phyllanthaceae</i>	<i>Phyllanthus balgooyi</i>	13
	<i>Phyllanthaceae</i>	<i>Phyllanthus securinegoides</i>	12
	<i>Rubiaceae</i>	<i>Psychotria sarmentosa</i>	5
	<i>Violaceae</i>	<i>Rinorea bengalensis</i>	12
	<i>Violaceae</i>	<i>Rinorea javanica</i>	4
	<i>Violaceae</i>	<i>Rinorea sp.</i>	3
	<i>Rubiaceae</i>	<i>Timonius sp.</i>	1
	<i>Meliaceae</i>	<i>Walsura pinnata</i>	3
	<i>Flacourtiaceae</i>	<i>Xylosma luzonensis</i>	1

Les sites ultramafiques sont localisés dans les Balkans, en Albanie et en Grèce, et dans le Sud-Est asiatique, en Indonésie (île d'Halmahera de l'archipel des Moluques) et en Malaisie (Etat de Sabah au Nord-Est de l'île de Bornéo) (Figure 9).



Figure 9 : Zones ultramafiques à climat tempéré et tropical étudiées

Selon la classification des climats de Köppen, la Grèce et l'Albanie possèdent un climat de type Csa, à savoir un climat tempéré avec des saisons bien définies et un été sec. Le climat de l'île de Bornéo est de type Am (climat tropical avec moussons) alors que celui d'Indonésie est de type Af (climat tropical humide) (Tableau 2, www.accuweather.com).

Tableau 2 : Données climatiques de l'année 2017

Mesures	Albanie	Grèce	Indonésie	Malaisie
Type de climat	Csa	Csa	Af	Am
Températures (°C)	17,1 (-2 – 30)	17,7 (-1 – 34)	27,4 (23 – 33)	27,6 (24 – 32)
Pluviométrie annuelle (mm)	567	793	6975	1132
Chute de neige annuelle (cm)	15	113	0	0
Station météo	Prenjas	Trikala et Sofifi	Kudat	Limni

La moyenne et le rang sont donnés pour les températures ; la pluviométrie et les chutes de neige sont les valeurs cumulées au cours de l'année 2017

Le criblage des espèces hyperaccumulatrices lors des prospections de terrain s'est fait grâce à l'utilisation de papiers filtres imprégnés de 1% de diméthylglyoxime (DMG). Cet indicateur prend une coloration rose lorsqu'il est mis en présence de Ni (Photographie 3), ce qui permet de détecter aisément sur le terrain qu'une plante est hyperaccumulatrice de Ni.



Photographie 3 : Réaction positive du papier filtre DMG avec la sève de l'hyperaccumulateur *Phyllanthus balgooyi*

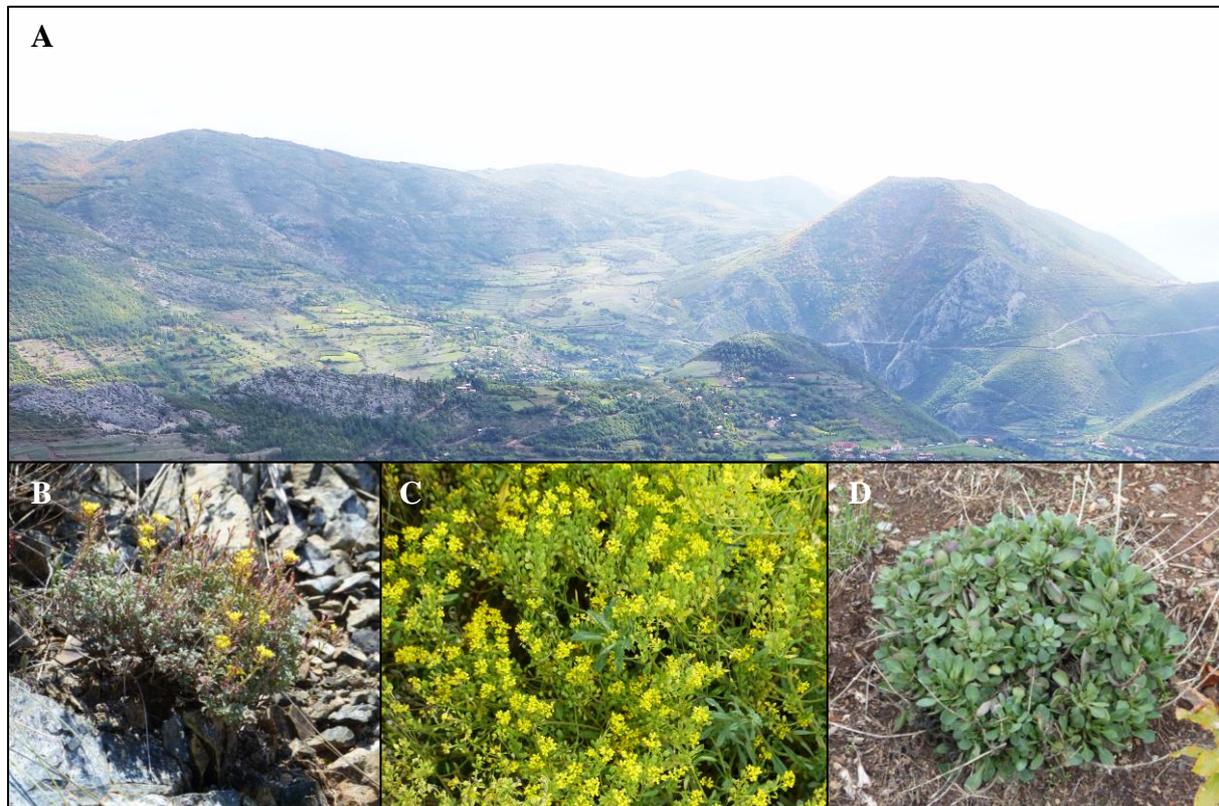
1.1. Les sites d'Albanie

La mission relative à la collecte d'échantillons en Albanie a eu lieu en octobre 2015. Les plantes hyperaccumulatrices de Ni, et leurs terres rhizosphériques associées, ont été récoltées en triplicat. Au total, 48 échantillons de 4 espèces hyperaccumulatrices de Ni appartenant à la famille des Brassicacées ont été récoltés sur 11 sites (Tableau 3 et Photographie 4). Les espèces sont *Noccaea ochroleuca*, *Odontarrhena chalcidica*, *O. rigida* et *O. smolikana*.

Tableau 3 : Sites en Albanie

Code site	Localisation	Altitude (m)	Exposition	Plantes collectées
01	Piskupat Agromine "bas"	715	Est	<i>O. chalcidica</i> (3)
02	Piskupat Agromine "haut"	720	Est	<i>O. chalcidica</i> (3)
03	Piskupat	735	Est	<i>O. chalcidica</i> (3)
04	Memëlisht	950	Est	<i>N. ochroleuca</i> (3)
05	Piskupat parcelle	735	Est	<i>O. chalcidica</i> (3)
06	Pishkash chemin	1500	Sud-Est	<i>O. smolikana</i> (3), <i>O. chalcidica</i> (3)
07	Pishkash haut	1525	Sud-Est	<i>O. chalcidica</i> (3), <i>N. ochroleuca</i> (3)
08	Pishkash route	1270	Sud	<i>O. chalcidica</i> (3), <i>O. rigida</i> (3), <i>O. smolikana</i> (3)
09	Skënderbej	935	Sud-Ouest	<i>O. chalcidica</i> (3), <i>O. rigida</i> (3)
10	Rrajcë	670	Sud-Est	<i>O. chalcidica</i> (3)
11	Përrenjas	590	Sud	<i>O. chalcidica</i> (3)

Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de plantes de chaque espèce prélevée



Photographie 4 : Échantillonnage en Albanie

(A) paysage albanais, (B) *O. smolikana*, (C) *O. chalcidica* et (D) *N. ochroleuca*

1.2. Les sites de Grèce

La mission en Grèce a eu lieu en juillet 2016. Au total, 12 échantillons comprenant 6 espèces hyperaccumulatrices de Ni appartenant à 2 familles botaniques (Brassicacées et Astéracées) ont été récoltés sur 5 sites différents (Tableau 4 et Photographie 5) ainsi que leurs terres rhizosphériques associées. Ces espèces sont *Bornmuellera tymphaea*, *Centaurea thracica*, *Leptoplax emarginata*, *Noccaea* sp., *O. chalcidica* et *O. muralis* s.l..

Tableau 4 : Sites en Grèce

Code site	Localisation	Altitude (m)	Exposition	Plantes collectées
01	Koutsoufliani	1000	Ouest	<i>O. chalcidica</i> (2)
02	Limni	5	Est	<i>O. muralis</i> s.l (3)
03	Malakasi	1680	Nord-Est	<i>B. tymphaea</i> (1)
04	Ile d'Eubée	35	Sud	<i>O. chalcidica</i> (1), <i>L. emarginata</i> (2), <i>Noccaea</i> sp. (1)
05	Trigona	860	Nord-Est	<i>C. thracica</i> (1), <i>L. emarginata</i> (1)

Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de plantes de chaque espèce prélevée



Photographie 5 : Échantillonnage en Grèce
(A) et (B) Sites d'échantillonnages, (C) *C. thracica*, (D) *L. emarginata* et (E) *A. murale* s.l.

©Photographies : E. Benizri

1.3. Les sites de Malaisie

Une mission a eu lieu en Malaisie en Juillet 2017. Au total, 72 échantillons de 15 espèces de plantes hyperaccumulatrices de Ni appartenant à 9 familles botaniques ont été récoltés sur 10 sites (Tableau 5 et Photographie 6) ainsi que leurs terres rhizosphériques associées. Ces espèces sont *Actephila alanbakeri*, *Flacourtia kinabaluensis*, *Glochidion* sp., *Glochidion* cf. *rubrum*, *Macaranga* cf. *lowii*, *Mischocarpus sundaikus*, *Phyllanthus balgooyi*, *Phyllanthus securinegoides*, *Psychotria sarmentosa*, *Rinorea* sp., *Rinorea bengalensis*, *Rinorea javanica*, *Timonius* sp., *Walsura pinnata*, *Xylosma luzonensis*.

Tableau 5 : Sites en Malaisie

Code site	Localisation	Altitude (m)	Exposition	Nombre d'échantillons
01	Bukit Kulung	1410	Sud-Ouest	<i>P. balgooyi</i> (3)
02	Pahu	340	Sud	<i>P. securinegoides</i> (6), <i>R. bengalensis</i> (6)
03	Monggis	420	Nord	<i>M. sundaikus</i> (1), <i>R. bengalensis</i> (3), <i>R. javanica</i> (1)
04	Wuluh River	780	Nord	<i>F. kinabaluensis</i> (1), <i>G. cf. rubrum</i> (1), <i>M. sundaikus</i> (1), <i>R. javanica</i> (1)
05	Wuluh River Km 7	905	Nord-Ouest	<i>P. balgooyi</i> (3), <i>P. sarmentosa</i> (1), <i>Timonius</i> sp. (1), <i>X. luzonensis</i> (1)
06	Wuluh River Km 3	680	Sud-Est	<i>F. kinabaluensis</i> (1), <i>M. sundaikus</i> (1), <i>P. sarmentosa</i> (1), <i>R. bengalensis</i> (3), <i>R. javanica</i> (1), <i>W. pinnata</i> (1)
07	Lobou	385	Sud-Ouest	<i>A. alanbakeri</i> (1), <i>F. kinabaluensis</i> (1), <i>M. sundaikus</i> (1), <i>R. javanica</i> (1), <i>W. pinnata</i> (1)
08	Panataran River	470	Nord-Est	<i>Macaranga</i> cf. <i>lowii</i> (1), <i>M. sundaikus</i> (1), <i>P. balgooyi</i> (2), <i>P. sarmentosa</i> (1), <i>Rinorea</i> sp. (1), <i>F. kinabaluensis</i> (1)
09	Bukit Mongilan	750	Sud-Ouest	<i>F. kinabaluensis</i> (1), <i>Glochidion</i> sp. (1), <i>M. sundaikus</i> (1), <i>P. balgooyi</i> (1), <i>P. sarmentosa</i> (1), <i>Rinorea</i> sp. (1)
10	Bukit Lompouyu	700	Ouest	<i>A. alanbakeri</i> (1), <i>F. kinabaluensis</i> (1), <i>Glochidion</i> sp. (1), <i>P. balgooyi</i> (4), <i>P. securinegoides</i> (6), <i>P. sarmentosa</i> (1), <i>Rinorea</i> sp. (1), <i>W. pinnata</i> (1)

Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de plantes de chaque espèce prélevée



Photographie 6 : Echantillonnage en Malaisie (Sabah, île de Bornéo)

(A) Wuluh River, (B) Panataran River, (C) Forêt malaisienne, (D) *R. javanica*, (E) *P. balgooyi*, (F) *R. bengalensis*, (G) *P. securinegoides* et (H) *M. cf. lowii*

1.4. Les sites d'Indonésie

Une mission en Indonésie avait eu lieu en Mars 2015 avant le commencement de la thèse. Cette mission a permis la collaboration entre des chercheurs du LSE, de l'Université de Queensland et le groupe PT Weda Bay Nickel (ERAMET). Il s'agissait d'étudier les hyperaccumulateurs de Ni endémiques de l'île d'Halmahera dans la région de Weda Bay. Ainsi, 45 échantillons comprenant 10 espèces de plantes hyperaccumulatrices de Ni, et leurs terres rhizosphériques associées, ont été récoltés sur 15 sites (Tableau 6 et Photographie 7). Ces espèces sont *Aristolchia* sp., *Barringtonia* sp., *Cerbera floribunda*, *Ficus trachypison*, *Glochidion moluccanum*, *Macaranga* sp., *Planchonella roxburghioides*, *Prunus* sp., *Rinorea* aff. *bengalensis* et *Trichospermum morotaiense*.

Tableau 6 : Sites en Indonésie

Code site	Localisation	Altitude (m)	Exposition	Plantes collectées
01	Casuarina site 1	209	Nord-Ouest	<i>P. roxburghioides</i> (1), <i>R. aff. bengalensis</i> (1), <i>T. morotaiense</i> (1)
02	Casuarina site 2	210	Nord-Ouest	<i>R. aff. bengalensis</i> (1)
03	Casuarina	208	Nord-Ouest	<i>F. trachypison</i> (1), <i>T. morotaiense</i> (1)
04	Before Casuarina	204	Nord-Ouest	<i>F. trachypison</i> (3), <i>G. moluccanum</i> (1), <i>P. roxburghioides</i> (1), <i>Prunus</i> sp. (1), <i>T. morotaiense</i> (1)
05	Doro Mesmesan	157	Nord	<i>T. morotaiense</i> (1)
06	Woi Mioseng	45	Ouest	<i>R. aff. bengalensis</i> (1), <i>T. morotaiense</i> (1)
07	Bukit Limber area1	981	Sud-Ouest	<i>T. morotaiense</i> (1)
08	Bukit Limber km3	183	Sud-Est	<i>F. trachypison</i> (2), <i>P. roxburghioides</i> (1), <i>T. morotaiense</i> (1)
09	Sake River	80	Est	<i>C. floribunda</i> (1), <i>F. trachypison</i> (1), <i>Macaranga</i> sp. (1), <i>T. morotaiense</i> (2)
10	Sake South	100	Sud	<i>Aristolchia</i> sp. (1), <i>C. floribunda</i> (2), <i>R. aff. bengalensis</i> (2), <i>T. morotaiense</i> (1)
11	Sake West	191	Sud	<i>F. trachypison</i> (1)
12	Uni Uni	239	Sud-Est	<i>G. moluccanum</i> (1)
13	Tanjung Ulie	18	Sud	<i>Barringtonia</i> sp. (1), <i>C. floribunda</i> (1), <i>F. trachypison</i> (2), <i>P. roxburghioides</i> (1), <i>R. aff. bengalensis</i> (2), <i>T. morotaiense</i> (2)
14	Location 2A	179	Sud	<i>R. aff. bengalensis</i> (1)
15	Location 2C	89	Sud-Ouest	<i>T. morotaiense</i> (1)

Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de plantes de chaque espèce prélevée



Photographie 7 : Echantillonnage en Indonésie (île d'Halmahera)

(A) Casuarina, (B) Sake River, (C) Uni Uni, (D) *F. trachypison*, (E) *R. aff. bengalensis*, (F) *T. morotaiense* et (G) *G. moluccanum*, ©Photographies : A. van der Ent

2. Caractérisation des échantillons végétaux et des terres

2.1. Concentrations élémentaires dans les plantes

Après leur acheminement au laboratoire, les différentes parties des plantes (feuilles, tiges, bois et racines) sont rincées à l'eau distillée, séparées et séchées 72 h à 70°C en étuve avant d'être finement broyées (< 500 µm). Cinq-cents mg de broyat végétal sont mis en solution durant 16 h dans 2,5 mL de HNO₃ 65% et 5 mL de H₂O₂ 30%. La minéralisation a lieu durant 2 h à 95°C. Après refroidissement, les solutions sont complétées à 20 mL avec de l'eau distillée puis filtrées à 0,45 µm. Elles sont ensuite réajustées à 25 mL et stockées à 4°C avant analyse. Une méthode miniaturisée est appliquée pour les échantillons en faible quantité (< 500 mg). La mise en solution se fait à partir de 50 mg de broyat mis dans 1 mL de HNO₃ 65% et 2 mL de H₂O₂ 30% pour un ajustement final à 10 mL.

Les éléments en traces (Al, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd et Pb) et les éléments majeurs (N, Mg P, K et Ca) en solution sont dosés par ICP-AES (*Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer*, Liberty II, Varian).

Les résultats sont exprimés en mg kg⁻¹ de matière sèche, selon l'équation :

$$\text{Quantité métaux (mg kg}^{-1}\text{)} = \frac{\text{valeur ICP (mg L}^{-1}\text{)} \times \text{volume solution (L)}}{\text{masse prise d'essai (g)} \times 10^{-3}}$$

2.2. Caractérisation physico-chimique des terres

2.2.1. Préparation des échantillons de terre

Les échantillons de terre rhizosphériques sont prétraités selon la norme ISO NF 11464. La terre est séchée en étuve à 40°C durant 48 h et est tamisée à 2 mm. Pour les analyses nécessitant la pesée de petites quantités (< 2 g), la terre est broyée et tamisée à 150 µm.

2.2.2. Mesure du pH des terres

Cinq mL de terre sont ajoutés à 25 mL d'eau distillée (rapport sol:eau de 1:5) d'après la norme NF ISO 10390. La solution est mise en agitation durant 1 h puis laissée au repos durant 1 h. La mesure du pH est effectuée avec un pH-mètre (HACH modèle HQ440d multi) dans un délai de 2 h au maximum, soit 3 h après la fin de l'agitation.

2.2.3. Mesure de la capacité d'échange cationique des terres

La mesure de la capacité d'échange cationique (CEC) est réalisée d'après la norme NF X31-130. Cinq g de terre sèche sont mélangés à 50 mL de solution de chlorure de cobaltihexamine à 0,0166 mol L⁻¹, puis mis en rotation orbitale (17 rpm) durant 1 h. Le surnageant est filtré à 0,45 µm. Une gamme étalon est préparée avec des solutions diluées de chlorure de cobaltihexamine. L'analyse au spectrophotomètre (SmartSpec Plus Spectrophotometer, BIO-RAD) est faite à 380 et 475 nm pour prendre en compte l'influence de la matière organique soluble. Les éléments en traces et les majeurs échangeables sont dosés par ICP-AES. Les résultats sont exprimés en cmol⁺ kg⁻¹ de terre sèche.

2.2.4. Mesure de la fraction des éléments des terres extractibles au DTPA

La solution d'extraction d'acide diéthylène tri-amine penta-acétique (DTPA) est préparée d'après la norme NF X31-121 : 0,005 M DTPA, 0,01 M CaCl₂, 0,1 M triéthanolamine et le pH est ajusté à 7,3. Cinq g de terre sont mis à agiter durant 2 h dans 10 mL de solution d'extraction. Après centrifugation 10 min à 3000 rpm, le surnageant est filtré à 0,45 µm. Le filtrat est dilué au 10^{ème} avec de l'eau distillée pour le dosage des éléments-traces et majeurs par ICP-AES. Les résultats obtenus sont exprimés en mg kg⁻¹ de terre sèche.

2.2.5. Mesure de la fraction extractible à l'eau régale des éléments des terres

La méthode effectuée en laboratoire utilise la norme ISO NF 11446 d'extraction des éléments-traces solubles dans l'eau régale. Cinq-cents mg de terre sont mis en solution durant 16 h dans 6 mL de HCl 37% et 2 mL de HNO₃ 65%. La minéralisation a ensuite lieu durant 2 h à 105°C. Après refroidissement, les solutions sont complétées à 45 mL avec de l'eau distillée puis filtrées à 0,45 µm. Une fois la filtration effectuée, elles sont ajustées à 50 mL et stockées à 4°C avant analyse par ICP-AES. Les résultats obtenus sont exprimés en mg kg⁻¹ de terre sèche.

2.2.6. Mesure de l'azote total et du carbone total et organique des terres

Soixante-quinze mg de terre sont placés dans des capsules en étain afin de subir une combustion à 900°C pour une mesure du C et N total. Pour la mesure du C organique, 75 mg de terre sont placés dans des capsules en argent avec un ajout d'un excès d'HCl (4 M). Après 4 h à température ambiante, les échantillons sont séchés 16 h en étuve à 60°C avant combustion à 900°C. Les mesures sont effectuées par un Analyseur CN (Vario MICRO cube, Elementar Analysensystem GmbH) pour obtenir le pourcentage de ces éléments. Le taux de matière organique est calculé par la formule C organique (%) × 1,72.

2.3. Facteurs de bioconcentration et de transfert chez les hyperaccumulateurs

Le facteur de bioconcentration (BCF) donne l'information sur l'accumulation d'ETM chez les hyperaccumulateurs, en comparant les concentrations dans les différentes parties de plantes (parties aériennes ou feuilles dans notre étude) et les concentrations dans les sols de l'ETM extractible au DTPA (Zayed *et al.*, 1998). Il est donné par la formule :

$$BCF = \frac{Ni_{PA}}{Ni_{DTPA}}$$

Avec Ni_{PA} : Ni dans les parties aériennes ou feuilles et Ni_{DTPA} : Ni extractible au DTPA.

Le facteur de transfert (TF) donne l'information de la capacité de l'hyperaccumulateur à transférer les ETM des racines aux parties aériennes (Stoltz et Greger, 2002). Sa formule est :

$$TF = \frac{Ni_{PA}}{Ni_{PR}}$$

Avec Ni_{PA} : Ni dans les parties aériennes ou feuilles et Ni_{PR} : Ni dans les parties racinaires.

3. Caractérisation de la diversité génétique des communautés bactériennes

3.1. Séquençage haut débit Illumina

3.1.1. Extraction de l'ADN des terres

L'extraction de l'ADN des terres est effectuée à partir de 0,5 g de terre, conservé à -80°C après prélèvement, en accordance avec le protocole d'utilisation du kit FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP BioMedicals). L'efficacité de l'extraction est vérifiée par une migration des acides nucléiques extraits sur gel d'agarose 1% dans du tampon Tris-Borate-EDTA (TBE) 1X. La quantification des ADNs extraits est effectuée en triplicat par une lecture au spectrophotomètre à la longueur d'onde 260 nm. Le rapport des lectures 260/280 est également évalué pour obtenir une indication sur la pureté de l'ADN des échantillons.

3.1.2. Préparation de la banque d'amplicons d'ARNr 16S

Les concentrations des solutions d'ADN sont ajustées à 1,66 ng μl^{-1} avec de l'eau ultrapure stérile à l'aide d'un robot (epMotion P5073, Eppendorf) dans des microplaques de 96 puits (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction plate). La paire d'amorces B4Ft (SD-Bact-0909-aS-18, 5'-ACTCAAAGKAATWGACGG-3') et B4Rt (S*-Univ-1392-a-A-15, 5'-ACGGGC GGTGTGTRC-3') qui cible environ 484 paires de base de la région V6-V8 de l'ARNr 16S bactérien a été utilisée (Goux *et al.*, 2016).

Les amplicons sont générés en utilisant la Q5 ADN-polymérase (High-Fidelity Hot Start, New England Biolabs Inc., Ipswich, USA). La première PCR, réalisée en triplicat sur chaque échantillon, comporte les phases suivantes : 30 s à 98°C, 22 cycles de 5 s à 98°C, 30 s à 58°C et 30 s à 72°C, et une dernière phase de 2 min à 72°C. La composition du mélange (25 µL final) de la PCR est présentée dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Composition du mix de la première PCR

Réactif	Volume (µL)
Q5 polymérase (2X)	12,5
BSA	2,5
Amorce F (10 µM)	1
Amorce R (10 µM)	1
ADN (1,66 ng µl ⁻¹)	1
H ₂ O ultra-pure stérile	7

Pour chaque réaction, la qualité d'ADN est évaluée par une électrophorèse avec migration sur un gel d'agarose à 3%. Les produits des trois PCR sont mélangés et l'ADN purifié avec des billes magnétiques AMPure (Agencourt, Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA). La quantification des ADNs purifiés est effectuée en triplicat par une lecture au NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Comme pour la première PCR, les amplicons quantifiés sont dilués à la concentration de 1,66 ng µl⁻¹ et les index Nextera XT[®] (Nextera XT Index Kit v2 Set A et Nextera XT Index Kit v2 Set B, Illumina Inc., San Diego, USA) nécessaires pour la deuxième PCR sont ajoutés à chaque amplicon afin d'augmenter la diversité nucléotidique et de codifier les échantillons.

Cette nouvelle PCR est réalisée avec le kit Nextera XT Index (Illumina Inc., San Diego, USA) selon les phases suivantes : 30 s à 98°C, 8 cycles de 10 s à 98°C, 30 s à 55°C et 30 s à 72°C, puis une dernière phase de 2 min à 72°C. La composition du mélange (50 µL final) de la deuxième PCR est présentée dans le Tableau 8.

Tableau 8: Composition du mix de la deuxième PCR

Réactif	Volume (µL)
Q5 polymérase (2X)	25
Index 1	5
Index 2	5
ADN (1,66 ng µl ⁻¹)	1
H ₂ O ultra-pure stérile	14

Comme précédemment, les amplicons sont purifiés et un mix final de la totalité des amplicons codés est effectué.

3.1.3. Vérification de la banque de clones

La concentration finale du mix d'amplicons est déterminée avec le KAPA SYBR® FAST Universal qPCR Kit (Kapa Biosystems, Wilmington, USA). La qPCR comporte les phases suivantes : 5 min à 95°C et 35 cycles de 30 s à 95°C et 45 s à 60°C. La composition du mélange de la qPCR (20 µL final) est présentée dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Composition du mix de qPCR

Réactif	Volume (µL)
Low rox	0,4
Kapa mix	12
ADN (1.66 ng µl ⁻¹)	4
H ₂ O ultra-pure stérile	3,6

3.1.4. Lancement du run de séquençage

Cinq µL du mix d'amplicons obtenu sont dénaturés avec ajout de 5 µL de NaOH 0,2 M suivi d'une phase d'incubation de 5 min à température ambiante. En parallèle, le contrôle d'ADN génomique PhiX est également dénaturé dans les mêmes conditions. Un mix final entre ces deux échantillons dénaturés a lieu par ajout de 5% du contrôle PhiX, suivi du séquençage sur le système MiSeq d'Illumina avec le kit MiSeq Reagent Kit V3-600 cycles (Illumina Inc., San Diego, USA).

3.2. Analyses bioinformatiques

3.2.1. Création de la table d'OTU

Le logiciel CLC Genomics Workbench 7 et le pipeline Usearch (v7.0.1090_win64) (Edgar, 2010) ont été utilisés. Les séquences bactériennes obtenues sont soumises à des étapes de "demultiplexing" et de "trimming" afin d'éliminer les séquences inférieures à 400 pb, possédant des bases ambiguës et de mauvaise qualité. Seules les séquences présentes au moins deux fois sont conservées pour construire la table d'OTU (*Operational Taxonomic Units* ou Unités Taxonomiques Opérationnelles) à 97% d'homologie. L'affiliation taxonomique est réalisée à partir de la base de données SILVA (Silva.nr_v128, <https://www.arb-silva.de/>) à un seuil de confiance de 80%.

3.2.2. Analyses bioinformatiques de la table d'OTU

L'analyse de la table d'OTU est effectuée à partir des logiciels QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*, version 1.8.0) (Caporaso *et al.*, 2010), XLSTAT (XLSTAT Ecology, version 18.07) et R (version 3.3.1).

3.2.3. Les indices de diversité

La diversité alpha (α -diversité) est la composante locale de la diversité. Elle est une mesure des espèces présentes sur un site à un moment donné. Elle est représentée par :

- L'indice de Chao1 (diversité taxonomique théorique) (Chao, 1984)

$$\text{Chao1} = n_{\text{obs}} + \frac{n_1^2}{2n_2}$$

Avec n_{obs} le nombre d'espèces observées, n_1 le nombre de singletons (séquences amplifiées une seule fois) et n_2 le nombre de doubletons (séquences amplifiées deux fois).

- L'indice de Shannon (hétérogénéité de la diversité) (Shannon et Weaver, 1964)

$$H' = \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

Avec H' l'indice de biodiversité de Shannon, i une espèce du milieu étudié, S le nombre total d'espèces du milieu (richesse spécifique) et p_i la proportion d'une espèce par rapport au nombre total d'espèces (S) dans le milieu.

La diversité bêta (β -diversité) permet de comparer plusieurs sites entre eux à un moment donné. Elle consiste ainsi à mesurer la diversité des espèces entre les échantillons. Elle est présente dans ce manuscrit sous la construction de graphiques basés sur les données phylogénétiques des différents échantillons avec la construction de nmDS (*non-metric multidimensional scaling*), PCoA (*principal coordinates analysis*) et d'UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean*).

3.2.4. La prédiction de la diversité fonctionnelle

Afin de prédire la diversité fonctionnelle sur la base des données de diversité taxonomique, le pipeline Tax4Fun (Aßhauer *et al.*, 2015) a été utilisé grâce au package R *themetagenomics* (version 0.1.0). Le profil taxonomique 16S basé sur la base de données Silva 123 est transformé en profil taxonomique des organismes procaryotes KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* ; <https://www.genome.jp/kegg>). Les KEGG sont regroupés en 6 voies liées i) au métabolisme, ii) au traitement de l'information génétique, iii) au traitement de l'information environnementale, iv) aux processus cellulaires, v) aux systèmes des organismes et vi) aux maladies humaines. Chacune de ces voies KEGG recense un ensemble de KO (*KEGG Orthology*) qui représentent des fonctions moléculaires. Parmi les 41 KO recensés, 11 sont liés au métabolisme, 4 au traitement de l'information génétique, 3 au traitement de l'information environnementale, 5 aux processus cellulaires, 10 aux systèmes des organismes et 8 aux maladies humaines.

3.3. Analyses statistiques

Les analyses statistiques des données de séquençage ont été effectuées avec les logiciels XLSTAT et R. Des analyses de variances (ANOVA) à un ou deux facteurs ont été conduites après vérification de la normalité du jeu de données avec le test de Shapiro Wilk et l'homogénéité des variances avec le test de Bartlett. Les moyennes ont ensuite été comparées à l'aide du test de comparaison multiple HSD (*Honest Significant Difference*) de Tukey. Les analyses multivariées ont consisté en des analyses en composantes principales (ACP) et des analyses de redondance (RDA). Pour cette dernière analyse, la fonction envfit du package vegan (version 2.5-2) a été utilisée afin de ne conserver que les variables corrélées significativement ($p < 0,10$) avec l'abondance relative des phyla bactériens majoritaires.

Pour mieux cerner le déterminisme de la diversité des communautés bactériennes étudiées, des analyses du type MRT (arbre de régression multivariée) et VPA (analyse de partition de variance) ont été conduites, respectivement avec les packages mvpart (version 1.6-2) et vegan (version 2.5-2).

Résultats

1. La diversité des communautés bactériennes en climat tempéré (Albanie)

1.1. La caractérisation des échantillons

1.1.1. Les sites sélectionnés

Les 48 plantes hyperaccumulatrices et leur terre rhizosphérique (Tableau 10) ont été échantillonnées sur les 11 sites retenus (Figure 10).

Tableau 10 : Sites, espèces et codes des plantes hyperaccumulatrices prélevées

Site	Appellation	Altitude (m)	Plante	Code des échantillons
01	Piskupat	715	<i>O. chalcidica</i>	Oc-01a, Oc-01b, Oc-01c
02	Piskupat	721	<i>O. chalcidica</i>	Oc-02a, Oc-02b, Oc-02c
03	Piskupat	737	<i>O. chalcidica</i>	Oc-03a, Oc-03b, Oc-03c
04	Memëlisht	950	<i>N. ochroleuca</i>	No-04a, No-04b, No-04c
05	Piskupat	735	<i>O. chalcidica</i>	Oc-05a, Oc-05b, Oc-05c
06	Pishkash	1500	<i>O. chalcidica</i>	Oc-06a, Oc-06b, Oc-06c
			<i>O. smolikana</i> ,	Os-06a, Os-06b, Os-06c
07	Pishkash	1524	<i>N. ochroleuca</i>	No-07a, No-07b, No-07c
			<i>O. chalcidica</i>	Oc-07a, Oc-07b, Oc-07c
08	Pishkash	1269	<i>O. chalcidica</i>	Oc-08a, Oc-08b, Oc-08c
			<i>O. rigida</i>	Or-08a, Or-08b, Or-08c
			<i>O. smolikana</i>	Os-08a, Os-08b, Os-08c
09	Skënderbej	934	<i>O. chalcidica</i>	Oc-09a, Oc-09b, Oc-09c
			<i>O. rigida</i>	Or-09a, Or-09b, Or-09c
10	Rrajcë	668	<i>O. chalcidica</i>	Oc-10a, Oc-10b, Oc-10c
11	Përrenjas	587	<i>O. chalcidica</i>	Oc-11a, Oc-11b, Oc-11c

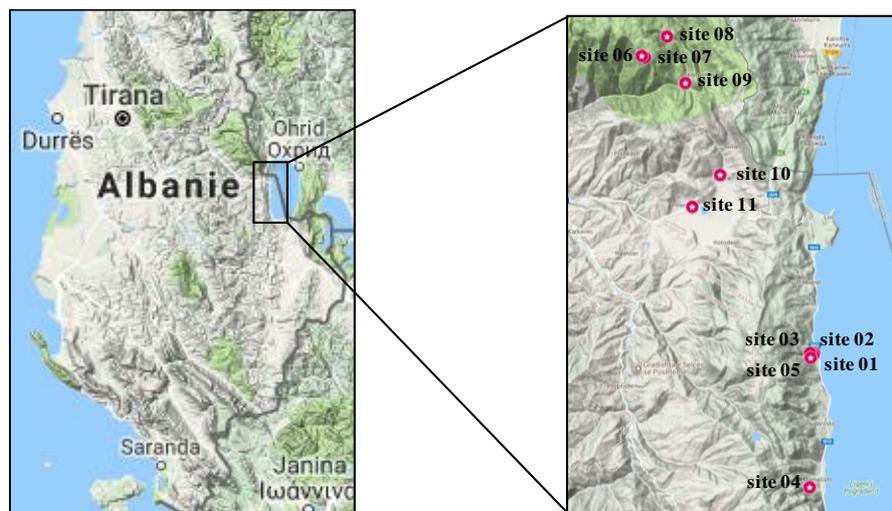


Figure 10 : Carte géographique des 11 sites de prélèvements

Le pH, l'azote et le carbone totaux, le carbone organique, les éléments totaux et métaux extractibles au DTPA ainsi que la CEC totale et les éléments échangeables des terres rhizosphériques ont été caractérisés (Tableau 11 à Tableau 15).

Le pH est de 6,75 en moyenne (de 5,78 à 7,93 ; Tableau 11). Alors que *O. chalcidica* se développe sur des sols présentant une large gamme de valeurs de pH, *N. ochroleuca* et *O. smolikana* sont retrouvées sur des sols à pH plutôt acide (6,13 et 6,61, respectivement). Ces terres sont bien pourvues en C avec un rapport C/N de l'ordre de 7,1 à 18 ; le C organique correspond en moyenne à 97% du C total.

Tableau 11 : pH, N et C totaux et C organique des terres rhizosphériques

la moyenne et l'écart type sont donnés pour les 3 répétitions, No : *N. ochroleuca*, Oc : *O. chalcidica*, Or : *O. rigida*, Os : *O. smolikana*, les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à $p = 0,05$ (TukeyHSD test)

Site	Plante	pH	%N	%C	%Corg
01	Oc	6,35 ± 0,57 abc	0,33 ± 0,04 bcde	3,60 ± 0,35 cdef	3,51 ± 0,34 cdef
02	Oc	6,62 ± 0,82 abc	0,25 ± 0,01 cde	2,80 ± 0,13 def	2,72 ± 0,13 def
03	Oc	5,78 ± 0,18 c	0,28 ± 0,03 bcde	3,33 ± 0,33 cdef	3,21 ± 0,31 def
04	No	5,84 ± 0,66 c	0,51 ± 0,22 b	6,46 ± 3,17 bc	6,26 ± 2,91 bc
05	Oc	6,25 ± 0,81 bc	0,30 ± 0,01 bcde	3,37 ± 0,15 cdef	3,28 ± 0,13 def
06	Oc	6,33 ± 0,11 abc	0,31 ± 0,14 bcde	5,10 ± 2,17 bcde	4,85 ± 2,06 bcde
	Os	6,24 ± 0,11 bc	0,41 ± 0,03 bc	7,07 ± 0,53 b	6,62 ± 0,06 b
07	No	6,42 ± 0,09 abc	0,79 ± 0,07 a	13,0 ± 1,67 a	11,7 ± 0,61 a
	Oc	6,51 ± 1,12 abc	0,38 ± 0,07 bcd	5,67 ± 0,80 bcd	5,54 ± 0,81 bcd
08	Os	6,98 ± 0,28 abc	0,20 ± 0,03 cde	2,26 ± 0,25 ef	2,26 ± 0,26 ef
	Oc	7,38 ± 0,04 abc	0,17 ± 0,01 de	2,10 ± 0,11 ef	2,02 ± 0,20 ef
	Or	7,26 ± 0,08 abc	0,19 ± 0,03 cde	2,34 ± 0,37 def	2,36 ± 0,34 ef
09	Or	6,63 ± 0,89 abc	0,09 ± 0,01 e	1,01 ± 0,12 f	0,95 ± 0,15 f
	Oc	7,70 ± 0,34 ab	0,20 ± 0,05 cde	2,24 ± 0,55 ef	2,21 ± 0,51 ef
10	Oc	7,74 ± 0,40 ab	0,32 ± 0,10 bcde	2,83 ± 0,44 def	2,72 ± 0,46 def
11	Oc	7,93 ± 0,53 a	0,19 ± 0,07 cde	2,28 ± 0,78 ef	2,20 ± 0,79 ef

Concernant les éléments totaux (Tableau 12), ces terres sont caractérisées par de faibles concentrations en Ca (2,9 mg g⁻¹), K (1,8 mg g⁻¹) et P (420 µg g⁻¹) avec un rapport Ca/Mg inférieur à 1. A l'inverse, elles présentent de fortes teneurs en Fe (101 mg g⁻¹), Mg (75 mg g⁻¹) et Al (17 mg g⁻¹). La concentration élevée en Ni (> 1,6 mg g⁻¹) confirme l'origine ultramafique de ces terres (0).

Tableau 12 : Eléments totaux des terres rhizosphériques

la moyenne et l'écart type sont donnés pour les 3 répétitions, No : *N. ochroleuca*, Oc : *O. chalcidica*, Or : *O. rigida*, Os : *O. smolikana*, les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à $p = 0,05$ (TukeyHSD test)

Site	Plante	Al (mg g ⁻¹)	Ca (mg g ⁻¹)	Fe (mg g ⁻¹)	K (mg g ⁻¹)	Mg (mg g ⁻¹)	P (µg g ⁻¹)
01	Oc	19 ± 0,2 cde	2,4 ± 0,8 bcde	110 ± 1,7 abc	2,4 ± 0,1 ab	67 ± 3,5 efg	706 ± 46 ab
02	Oc	19 ± 0,5 cde	1,7 ± 0,0 de	115 ± 0,4 ab	2,6 ± 0,1 a	77 ± 5,3 def	641 ± 40 abc
03	Oc	18 ± 0,8 cd	2,1 ± 0,2 cde	113 ± 1,1 abc	2,4 ± 0,2 ab	52 ± 4,8 fg	421 ± 42 cdef
04	No	11 ± 1,1 ghi	3,8 ± 1,9 abc	99 ± 3,9 abcde	2,1 ± 0,4 abcd	78 ± 11 def	569 ± 128 abcd
05	Oc	18 ± 0,7 cde	2,0 ± 0,1 cde	96 ± 0,7 bcde	2,3 ± 0,1 ab	56 ± 4,7 efg	504 ± 32 bcde
06	Oc	28 ± 1,5 a	2,8 ± 0,8 bcde	111 ± 11 abc	1,5 ± 0,2 cdef	20 ± 2,3 i	381 ± 75 def
	Os	27 ± 1,1 ab	3,3 ± 0,6 bcde	110 ± 8,4 abc	1,7 ± 0,1 bcde	20 ± 2,2 i	440 ± 27 cdef
07	No	22 ± 0,4 bcd	3,7 ± 0,3 bcd	64 ± 7,2 f	2,2 ± 0,2 abc	29 ± 6,4 hi	755 ± 31 a
	Oc	18 ± 5,8 cd	2,4 ± 0,5 bcde	98 ± 10 abcd	1,7 ± 0,2 bcde	62 ± 25 efg	404 ± 97 def
08	Os	12 ± 4,5 defg	2,1 ± 0,3 cde	88 ± 16 de	1,4 ± 0,3 def	134 ± 25 ab	247 ± 16 fg
	Oc	17 ± 0,8 cdef	1,7 ± 0,2 e	111 ± 2,0 abc	1,3 ± 0,1 ef	106 ± 3,8 bcd	285 ± 23 efg
	Or	14 ± 0,2 efgh	1,9 ± 0,3 cde	94 ± 1,7 cde	1,7 ± 0,3 bcde	123 ± 2,5 abc	281 ± 44 efg
09	Or	9,0 ± 0,1 hi	2,8 ± 0,1 bcde	113 ± 1,6 abc	0,8 ± 0,0 f	103 ± 3,4 bcd	94 ± 19 g
	Oc	16 ± 2,6 cdef	3,7 ± 0,3 bcde	118 ± 4,6 a	1,5 ± 0,3 cdef	89 ± 9,0 cde	271 ± 80 fg
10	Oc	7,0 ± 1,5 i	5,8 ± 0,9 a	76 ± 7,0 ef	2,1 ± 0,7 abcd	147 ± 17 a	538 ± 184 abcd
11	Oc	24 ± 1,1 abc	4,2 ± 0,5 ab	94 ± 5,3 cde	1,5 ± 0,1 cdef	42 ± 7,6 ghi	228 ± 68 fg

Tableau 13 : Eléments traces métalliques totaux des terres rhizosphériques

la moyenne et l'écart type sont donnés pour les 3 répétitions, No : *N. ochroleuca*, Oc : *O. chalcidica*, Or : *O. rigida*, Os : *O. smolikana*, les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à $p = 0,05$ (TukeyHSD test)

Site	Plante	Mn (µg g ⁻¹)	Co (µg g ⁻¹)	Cr (µg g ⁻¹)	Ni (mg g ⁻¹)	Zn (µg g ⁻¹)
01	Oc	2,2 ± 0,1 abc	217 ± 5,6 abcd	505 ± 3,4 bcde	3,7 ± 0,1 ab	124 ± 3,4 a
02	Oc	2,2 ± 0,1 abc	216 ± 5,4 abcd	534 ± 8,2 bcde	3,6 ± 0,1 ab	128 ± 3,3 a
03	Oc	2,4 ± 0,0 ab	252 ± 4,5 a	611 ± 12 b	4,0 ± 0,1 ab	123 ± 1,1 a
04	No	2,1 ± 0,1 abcd	229 ± 15 abc	570 ± 37 bc	3,6 ± 0,2 ab	118 ± 6,7 ab
05	Oc	1,7 ± 0,2 cd	195 ± 13 bcd	547 ± 10 bcd	3,3 ± 0,1 abc	123 ± 1,8 a
06	Oc	2,4 ± 0,2 ab	233 ± 27 ab	469 ± 59 cde	2,4 ± 0,4 cde	130 ± 3,8 a
	Os	2,4 ± 0,3 ab	225 ± 19 abc	453 ± 48 de	2,4 ± 0,4 de	128 ± 3,5 a
07	No	2,5 ± 0,3 a	122 ± 12 f	240 ± 34 f	2,1 ± 0,5 e	97 ± 7,0 bcd
	Oc	2,1 ± 0,2 abc	212 ± 37 abcd	426 ± 97 e	3,1 ± 0,9 bcde	105 ± 3,4 bc
08	Os	1,5 ± 0,3 de	169 ± 27 def	446 ± 25 de	3,3 ± 0,2 abc	83 ± 15 ef
	Oc	2,1 ± 0,1 abcd	208 ± 4,7 abcd	538 ± 45 bcde	3,0 ± 0,1 bcde	101 ± 3,8 bcde
	Or	1,7 ± 0,0 cd	180 ± 3,6 cde	442 ± 7,9 de	3,1 ± 0,2 abcde	87 ± 1,9 cde
09	Or	1,9 ± 0,0 bcd	219 ± 9,4 abc	900 ± 25 a	4,3 ± 0,1 a	91 ± 0,8 cdef
	Oc	2,4 ± 0,2 ab	251 ± 12 a	860 ± 28 a	3,6 ± 0,3 ab	103 ± 5,2 bcd
10	Oc	1,2 ± 0,1 e	141 ± 9,4 ef	268 ± 17 f	3,2 ± 0,3 abcd	83 ± 9,1 f
11	Oc	2,4 ± 0,0 ab	242 ± 9,2 ab	604 ± 37 b	3,0 ± 0,2 bcde	91 ± 3,2 cdef

Le Fe (Fe total) est l'élément le plus présent dans les rhizosphères (Tableau 12), mais le Ni est le plus disponible avec des concentrations allant de 1,0 à 15 mg g⁻¹ (Tableau 14).

Tableau 14 : Métaux extractibles au DTPA des terres rhizosphériques

la moyenne et l'écart type sont donnés pour les 3 répétitions, No : *N. ochroleuca*, Oc : *O. chalcidica*, Or : *O. rigida*, Os : *O. smolikana*, les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à $p = 0,05$ (TukeyHSD test)

Site	Plante	Fe (mg g ⁻¹)	Mn (µg g ⁻¹)	Zn (µg g ⁻¹)	Co (µg g ⁻¹)	Ni (mg g ⁻¹)
01	Oc	0,7 ± 0,1 cdef	53 ± 14 cd	100 ± 1,4 bcde	3,1 ± 5,3 bc	10 ± 0,8 bc
02	Oc	3,0 ± 0,7 def	106 ± 19 cd	102 ± 9,0 bcdef	12 ± 1,5 c	10 ± 1,2 bcde
03	Oc	1,4 ± 0,5 abcde	41 ± 15 cd	117 ± 17 bcdef	<LQ c	11 ± 2,0 bcd
04	No	0,7 ± 0,1 abcd	73 ± 12 bc	593 ± 253 b	18 ± 7,4 bc	13 ± 3,6 b
05	Oc	1,0 ± 0,3 abcd	43 ± 8,4 cd	153 ± 25 bcdef	7,2 ± 6,3 c	15 ± 3,4 bcde
06	Oc	0,8 ± 0,8 abcd	59 ± 26 a	119 ± 56 bcde	<LQ ab	5,4 ± 0,9 de
	Os	2,5 ± 2,0 a	154 ± 60 a	204 ± 87 bc	25 ± 16 a	12 ± 1,7 cde
07	No	1,3 ± 1,0 ab	86 ± 35 cd	638 ± 211 a	3,0 ± 5,3 bc	9,7 ± 3,7 a
	Oc	0,4 ± 0,1 abc	24 ± 4,0 ab	107 ± 22 bcd	<LQ bc	5,8 ± 1,4 bcd
08	Os	3,0 ± 0,9 def	118 ± 14 cd	88 ± 36 cdef	14 ± 4,4 c	11 ± 7,7 bcde
	Oc	1,4 ± 0,8 abcdef	54 ± 22 cd	<LQ def	<LQ c	1,0 ± 0,1 de
	Or	2,3 ± 0,3 def	75 ± 20 cd	38 ± 34 def	3,5 ± 6,0 c	4,8 ± 2,6 bcde
09	Or	7,9 ± 3,4 cdef	152 ± 58 d	92 ± 39 f	21 ± 6,8 c	13 ± 5,0 e
	Oc	6,2 ± 2,5 bcdef	183 ± 19 cd	114 ± 25 ef	20 ± 0,7 bc	12 ± 3,3 cde
10	Oc	2,9 ± 0,5 ef	85 ± 19 d	53 ± 47 cdef	9,9 ± 8,6 c	4,8 ± 3,2 e
11	Oc	3,3 ± 1,1 f	83 ± 26 d	89 ± 9,3 f	10 ± 8,9 c	10 ± 1,9 e

La CEC est comprise entre 16 et 58 cmol⁺ kg⁻¹ (Tableau 15). Les valeurs des différents éléments échangeables sont relativement basses, à l'exception du Mg et Ca. Le Mg échangeable est en moyenne de 21 cmol⁺ kg⁻¹, les valeurs les plus faibles étant notées pour les terres rhizosphériques de *O. smolikana*. Les teneurs moyennes en Ca échangeable sont de 7,0 cmol⁺ kg⁻¹, avec des valeurs extrêmes pour les terres rhizosphériques de *O. rigida* (3,1 cmol⁺ kg⁻¹) et de *N. ochroleuca* (11,4 cmol⁺ kg⁻¹).

Tableau 15 : CEC totale et éléments échangeables des terres rhizosphériques

la moyenne et l'écart type sont donnés pour les 3 répétitions, No : *N. ochroleuca*, Oc : *O. chalcidica*, Or : *O. rigida*, Os : *O. smolikana*, les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à $p = 0,05$ (TukeyHSD test)

Site	Plante	CEC (cmol ⁺ kg ⁻¹)	Ca (cmol ⁺ kg ⁻¹)	K (cmol ⁺ kg ⁻¹)	Mg (cmol ⁺ kg ⁻¹)	Mn (cmol ⁺ kg ⁻¹)	Ni (cmol ⁺ kg ⁻¹)
01	Oc	28 ± 1,2 def	7,3 ± 2,9 abc	0,40 ± 0,07 a	18 ± 3,9 c	0,04 ± 0,03 b	0,14 ± 0,10 b
02	Oc	28 ± 1,0 def	4,4 ± 0,2 bc	0,39 ± 0,02 a	20 ± 0,3 c	0,02 ± 0,00 b	0,06 ± 0,00 b
03	Oc	44 ± 5,3 bc	7,0 ± 0,8 abc	0,74 ± 0,10 a	34 ± 2,5 ab	0,04 ± 0,01 b	0,15 ± 0,05 b
04	No	35 ± 7,6 cd	13 ± 7,6 a	0,68 ± 0,38 a	17 ± 1,8 cd	0,08 ± 0,02 b	0,16 ± 0,09 b
05	Oc	47 ± 1,7 ab	6,2 ± 0,3 abc	0,49 ± 0,05 a	36 ± 1,4 ab	0,01 ± 0,00 b	0,08 ± 0,02 b
06	Oc	17 ± 5,3 fg	7,5 ± 3,9 abc	0,26 ± 0,07 a	6,6 ± 0,3 f	0,21 ± 0,09 a	0,11 ± 0,04 b
	Os	21 ± 3,5 efg	10 ± 2,5 abc	0,32 ± 0,05 a	7,3 ± 1,2 f	0,28 ± 0,13 a	0,13 ± 0,08 b
07	No	49 ± 6,5 ab	10 ± 1,7 abc	0,45 ± 0,06 a	31 ± 4,4 b	0,25 ± 0,01 a	0,34 ± 0,10 a
	Oc	33 ± 0,5 de	7,0 ± 0,1 abc	0,52 ± 0,12 a	21 ± 1,1 c	0,09 ± 0,04 b	0,11 ± 0,02 b
08	Os	17 ± 3,4 fg	4,6 ± 0,7 bc	0,55 ± 0,20 a	10 ± 4,3 ef	0,01 ± 0,01 b	0,09 ± 0,01 b
	Oc	24 ± 3,0 defg	3,1 ± 0,5 c	0,26 ± 0,02 a	17 ± 3,1 cde	0,01 ± 0,00 b	0,03 ± 0,01 b
	Or	16 ± 0,7 g	3,4 ± 0,8 c	0,62 ± 0,28 a	10 ± 0,6 def	0,02 ± 0,01 b	0,07 ± 0,01 b
09	Or	35 ± 2,1 cd	2,8 ± 0,3 c	0,36 ± 0,01 a	30 ± 3,3 b	0,01 ± 0,00 b	0,06 ± 0,00 b
	Oc	32 ± 3,3 de	5,0 ± 1,0 abc	0,35 ± 0,02 a	23 ± 1,9 c	0,02 ± 0,01 b	0,11 ± 0,02 b
10	Oc	18 ± 2,8 fg	9,7 ± 1,8 abc	0,69 ± 0,32 a	6,9 ± 1,2 f	0,01 ± 0,00 b	0,02 ± 0,02 b
11	Oc	58 ± 3,5 a	12 ± 2,9 ab	0,56 ± 0,03 a	40 ± 1,2 a	0,01 ± 0,02 b	0,02 ± 0,02 b

1.1.2. L'hyperaccumulation de Ni par les plantes échantillonnées

Les concentrations du Mg dans les parties aériennes sont élevées (de 1,7 à 12 mg g⁻¹) avec un rapport Ca/Mg de 0,9 à 8,2 (Tableau 16). Quels que soient les sites, c'est le Ni qui est le plus concentré dans les parties aériennes, selon l'ordre : *O. smolikana* (11,5 mg g⁻¹) > *N. ochroleuca* (11,4 mg g⁻¹) > *O. rigida* (8,6 mg g⁻¹) > *O. chalcidica* (8,5 mg g⁻¹) (Tableau 17). En moyenne, *O. chalcidica* est l'espèce hyperaccumulatrice qui présente les plus faibles concentrations en Ni, mais c'est elle qui possède la concentration la plus élevée (15 mg g⁻¹).

Tableau 16 : Macronutriments des parties aériennes des plantes hyperaccumulatrices

la moyenne et l'écart type sont donnés pour les 3 répétitions, No : *N. ochroleuca*, Oc : *O. chalcidica*, Or : *O. rigida*, Os : *O. smolikana*, les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à p = 0,05 (TukeyHSD test)

Site	Plante	Ca (mg g ⁻¹)	K (mg g ⁻¹)	Mg (mg g ⁻¹)	P (µg g ⁻¹)	S (µg g ⁻¹)
01	Oc	17 ± 2,1 abcde	13 ± 0,7 bcde	6,2 ± 3,1 abcde	2596 ± 139 abcd	2770 ± 555 bcde
02	Oc	13 ± 1,4 bcde	15 ± 1,2 abcde	9,4 ± 1,1 abc	3079 ± 306 abc	3791 ± 219 abcde
03	Oc	15 ± 2,3 abcde	13 ± 4,6 bcde	6,0 ± 1,2 abcde	1563 ± 244 bcde	3673 ± 1380 abcde
04	No	12 ± 1,9 cde	31 ± 14 a	4,4 ± 0,8 bcde	1920 ± 338 bcde	4920 ± 2229 abc
05	Oc	19 ± 1,8 abcd	23 ± 2,8 abc	9,5 ± 3,7 abc	4019 ± 671 a	4486 ± 683 abcd
06	Oc	7,0 ± 2,0 cde	6,1 ± 1,7 de	1,7 ± 0,3 e	541 ± 109 e	2257 ± 493 cde
	Os	29 ± 4,4 a	12 ± 0,5 bcde	3,6 ± 0,5 cde	1406 ± 47 cde	6748 ± 708 a
07	No	6,3 ± 0,2 de	25 ± 11 ab	7,8 ± 2,3 abcde	1834 ± 876 bcde	5750 ± 1271 ab
	Oc	4,4 ± 0,5 de	3,4 ± 0,3 de	1,3 ± 0,3 e	454 ± 179 e	1539 ± 314 de
08	Os	15 ± 4,6 abcde	6,9 ± 0,9 cde	8,7 ± 2,9 abcd	1113 ± 524 de	5873 ± 741 ab
	Oc	3,5 ± 0,6 e	0,5 ± 0,4 e	2,7 ± 0,0 de	255 ± 38 e	850 ± 229 e
	Or	7,9 ± 2,5 cde	3,8 ± 0,9 de	5,8 ± 1,3 abcde	718 ± 146 e	2376 ± 719 cde
09	Or	13 ± 3,8 bcde	7,9 ± 3,4 cde	12 ± 5,7 a	1046 ± 395 de	3762 ± 1164 abcde
	Oc	16 ± 1,8 abcde	12 ± 2,8 bcde	11 ± 1,3 ab	1694 ± 303 bcde	3321 ± 704 bcde
10	Oc	27 ± 16 ab	16 ± 9,7 abcde	7,2 ± 0,7 abcde	3135 ± 1640 ab	3859 ± 1798 abcde
11	Oc	21 ± 3,9 abc	18 ± 3,1 abcd	5,7 ± 1,1 bcde	3680 ± 506 a	3278 ± 787 bcde

Tableau 17 : Micronutriments des parties aériennes des plantes hyperaccumulatrices

la moyenne et l'écart type sont donnés pour les 3 répétitions, No : *N. ochroleuca*, Oc : *O. chalcidica*, Or : *O. rigida*, Os : *O. smolikana*, les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à p = 0,05 (TukeyHSD test)

Site	Plante	Mn (µg g ⁻¹)	Co (µg g ⁻¹)	Ni (mg g ⁻¹)	Zn (µg g ⁻¹)
01	Oc	53 ± 14 cd	3,1 ± 5,3 bc	10 ± 0,8 abc	100 ± 1,4 b
02	Oc	106 ± 19 abcd	12 ± 1,5 abc	10 ± 1,2 abc	102 ± 9,0 b
03	Oc	41 ± 15 cd	<LQ c	11 ± 2,0 ab	117 ± 17 b
04	No	73 ± 12 bcd	18 ± 7,4 abc	13 ± 3,6 ab	593 ± 253 a
05	Oc	43 ± 8,4 cd	7,2 ± 6,3 abc	15 ± 3,4 a	153 ± 25 b
06	Oc	59 ± 26 cd	<LQ c	5,4 ± 0,9 abc	119 ± 56 b
	Os	154 ± 60 ab	25 ± 16 a	12 ± 1,7 ab	204 ± 87 b
07	No	86 ± 35 bcd	3,0 ± 5,3 bc	9,7 ± 3,7 abc	638 ± 211 a
	Oc	24 ± 4,0 d	<LQ c	5,8 ± 1,4 abc	107 ± 22 b
08	Os	118 ± 14 abc	14 ± 4,4 abc	11 ± 7,7 abc	88 ± 36 b
	Oc	54 ± 22 cd	<LQ c	1,0 ± 0,1 c	<LQ b
	Or	75 ± 20 bcd	3,5 ± 6,0 bc	4,8 ± 2,6 bc	38 ± 34 b
09	Or	152 ± 58 ab	21 ± 6,8 ab	13 ± 5,0 ab	92 ± 39 b
	Oc	183 ± 19 a	20 ± 0,7 ab	12 ± 3,3 ab	114 ± 25 b
10	Oc	85 ± 19 bcd	9,9 ± 8,6 abc	4,8 ± 3,2 bc	53 ± 47 b
11	Oc	83 ± 26 bcd	10 ± 8,9 abc	10 ± 1,9 abc	89 ± 9,3 b

Les facteurs de bioconcentration ont été calculés pour les échantillons prélevés (Tableau 18). *O. chalcidica* prélevé sur site 11 possède la plus grande capacité à prélever le Ni du sol (facteur de 507) et se distingue statistiquement des autres plantes étudiées hormis *O. rigida*, prélevé sur site 09 dont le facteur est également élevé (facteur de 277). Les autres échantillons présentent des aptitudes plus faibles (facteurs de 11 à 135).

Tableau 18 : Facteur de bioconcentration (BCF) des hyperaccumulateurs

la moyenne et l'écart type sont donnés pour les 3 répétitions, No : *N. ochroleuca*, Oc : *O. chalcidica*, Or : *O. rigida*, Os : *O. smolikana*, les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à $p = 0,05$ (TukeyHSD test)

Site	Plante	BCF	
01	Oc	$36 \pm 2,1$	b
02	Oc	$57 \pm 5,3$	b
03	Oc	46 ± 19	b
04	No	48 ± 31	b
05	Oc	78 ± 17	b
06	Oc	65 ± 25	b
	Os	113 ± 27	b
07	No	$18 \pm 2,5$	b
	Oc	$24 \pm 7,8$	b
08	Os	49 ± 22	b
	Oc	$11 \pm 2,0$	b
	Or	35 ± 22	b
09	Or	277 ± 134	ab
	Oc	109 ± 57	b
10	Oc	135 ± 153	b
11	Oc	507 ± 343	a

Les racines des plantes hyperaccumulatrices n'ayant pas été conservées lors de l'échantillonnage, il n'est pas possible de calculer le facteur de translocation pour ces échantillons.

1.2. La diversité bactérienne rhizosphérique

A l'issue de l'analyse bioinformatique des données obtenues par séquençage à haut débit des 48 échantillons d'ADNs rhizosphériques, 6 241 304 séquences ont été obtenues et regroupées sous 8 646 OTUs différentes appartenant à 40 phyla. Les abondances relatives de chaque phylum ont été calculées et les phyla représentés à moins de 1% dans les différents échantillons ont été regroupés sous la dénomination "Autres (<1%)" (*BJ-169*, *BRC1*, *Candidatus_Berkelbacteria*, *Chlamydiae*, *Chlorobi*, *Deinococcus-Thermus*, *Elusimicrobia*, *FBP*, *FCPU426*, *Fibrobacteres*, *GAL15*, *Gracilibacteria*, *Hydrogenedentes*, *Ignavibacteriae*, *Microgenomates*, *Omnitrophica*, *Peregrinibacteria*, *RBG-1*, *Saccharibacteria*, *Spirochaetae*, *Tectomicrobia*, *Tenericutes*, *TM6*, *WS2*, *WS6* et *WWE3*). Enfin, 0,50% des séquences n'ont pu être affiliées taxonomiquement.

Les sept phyla les mieux représentés suivent l'ordre : *Proteobacteria* (32%) > *Acidobacteria* (19%) > *Actinobacteria* (16%) > *Gemmatimonadetes* (10%) > *Chloroflexi* (7,8%) > *Bacteroidetes* (7,4%) > *Nitrospirae* (2,4%) (Figure 11). C'est pour les rhizosphères de *O. chalcidica* prélevées sur les sites 03 et 05 que le phylum des *Acidobacteria* est le plus abondant, alors qu'il est le moins représenté dans la rhizosphère de *O. smolikana* prélevée sur le site 08. C'est sur le site 11 que le phylum des *Chloroflexi* est le plus abondant dans la rhizosphère de *O. chalcidica* alors qu'inversement c'est sur ce site que celui des *Planctomycetes* est le moins abondant. Aucune différence significative n'est observée entre les différents échantillons pour les phyla des *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Parcubacteria* et *Proteobacteria*.

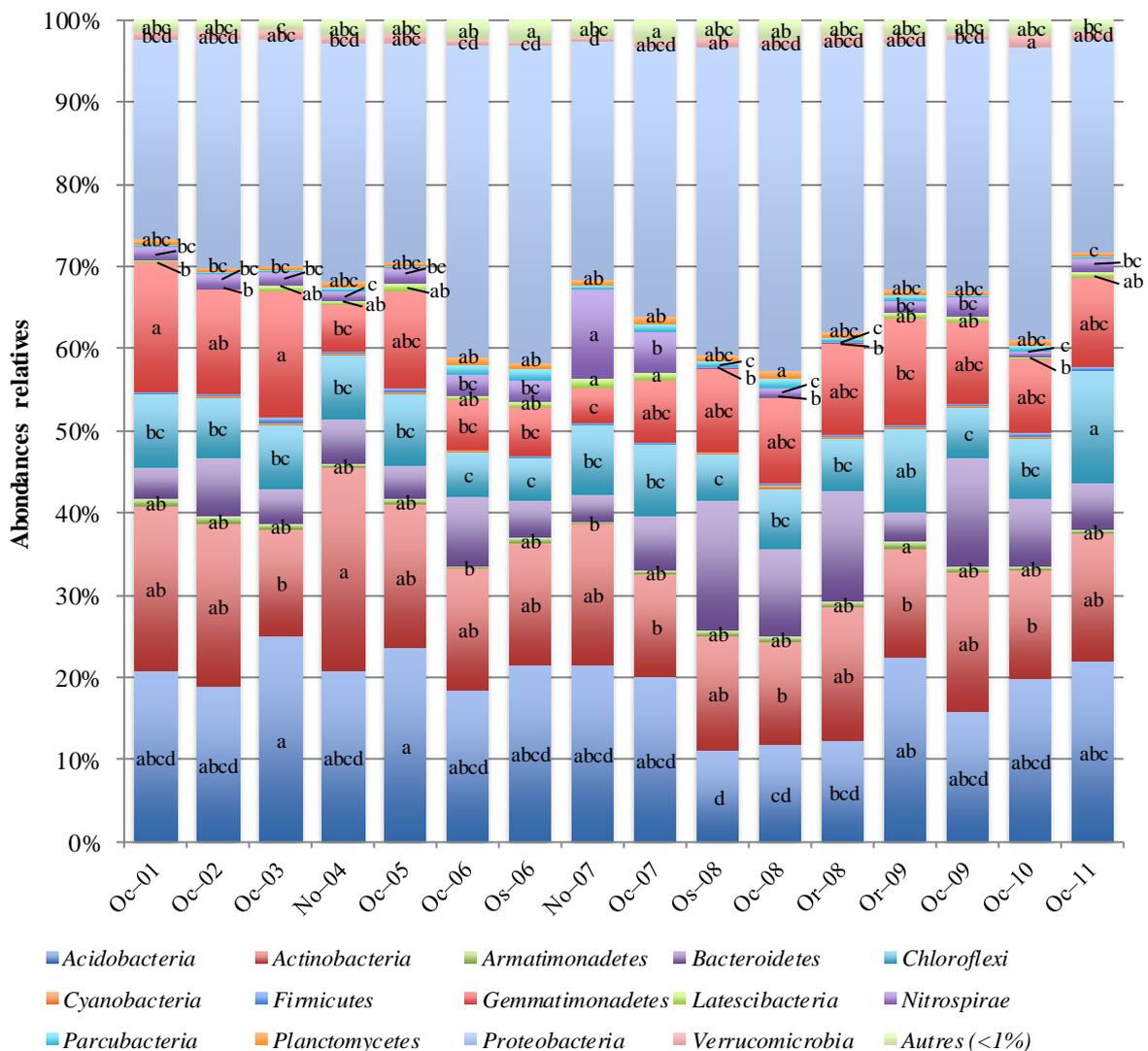


Figure 11 : Abondance relative des phyla majoritaires des terres rhizosphériques moyennes pour les 3 répétitions, les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à $p = 0,05$ (TukeyHSD test)

Les indices d' α -diversité (OTUs observées, Chao1 et Shannon) ont été calculés pour les terres rhizosphériques (Tableau 19). Les échantillons comprennent entre 1 888 et 4 759 OTUs sur les 8 646 OTUs observées. Le Chao1 est compris entre 2 401 et 5 402. C'est pour les échantillons de *O. chalcidica* prélevés sur le site 07 que les indices sont les plus élevés alors qu'ils sont les plus faibles pour les échantillons de terre rhizosphérique de *O. chalcidica* prélevés sur le site 11. Ainsi, au minimum, 78,6% de la diversité réelle de nos échantillons est représentée ($\frac{\text{OTUs observées}}{\text{Chao1}} \times 100$). Aucune différence significative n'est notable pour l'indice de Shannon, compris entre 8,32 et 9,83.

Tableau 19 : Indices d' α -diversité

la moyenne et l'écart type sont donnés pour les 3 répétitions, No : *N. ochroleuca*, Oc : *O. chalcidica*, Or : *O. rigida*, Os : *O. smolikana*, les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à $p = 0,05$ (TukeyHSD test)

Site	Plante	OTUs	Chao1	Shannon
01	Oc	3069 ± 210 bc	3631 ± 201 bcd	9,18 ± 0,06 a
02	Oc	3297 ± 108 b	3819 ± 176 bc	9,49 ± 0,06 a
03	Oc	3458 ± 439 bc	3993 ± 488 cd	9,41 ± 0,26 a
04	No	3714 ± 303 ab	4395 ± 235 ab	9,55 ± 0,12 a
05	Oc	3327 ± 166 bc	3954 ± 121 bcd	9,46 ± 0,18 a
06	Oc	3349 ± 176 b	3837 ± 248 bc	9,44 ± 0,22 a
	Os	3424 ± 555 bc	4021 ± 565 bcd	9,43 ± 0,48 a
07	No	3431 ± 202 b	4090 ± 139 bc	8,78 ± 0,25 a
	Oc	4086 ± 374 a	4763 ± 346 a	9,41 ± 0,21 a
08	Os	3860 ± 377 ab	4364 ± 290 abc	9,80 ± 0,40 a
	Oc	4052 ± 220 ab	4659 ± 185 abc	9,10 ± 0,41 a
	Or	3743 ± 136 ab	4228 ± 135 bc	9,59 ± 0,19 a
09	Or	3449 ± 291 b	4091 ± 268 bc	9,54 ± 0,06 a
	Oc	3699 ± 422 b	4140 ± 350 bc	9,43 ± 0,60 a
10	Oc	4052 ± 306 ab	4568 ± 369 abc	9,69 ± 0,15 a
11	Oc	1888 ± 458 c	2401 ± 471 d	9,19 ± 0,11 a

Pour mettre en évidence les liens entre la diversité bactérienne et les paramètres abiotiques des différents sites, une Analyse de Redondance (RDA) a été conduite en se basant, d'une part, sur l'abondance relative des 14 phyla majoritaires et, d'autre part, sur les paramètres physico-chimiques des terres rhizosphériques (Tableau 11, Tableau 14 et Tableau 15). La fonction *envfit* du package Vegan a été utilisée pour ne conserver que les variables abiotiques corrélées significativement avec l'abondance relative des phyla bactériens majoritaires. Ainsi, parmi l'ensemble des paramètres abiotiques mesurés, seuls seront conservés : le pH, les pourcentages d'azote total, de carbone total et de C organique, les teneurs en Al, Co, Fe, Mn, Ni, Pb et Zn extractibles au DTPA, les concentrations en Ca, Mg, Mn et Ni échangeables et la CEC totale.

Le plan F1-F2 explique 81,7% de la variabilité totale (Figure 12). L'axe F1, qui explique 61,6% de la variabilité, discrimine les échantillons issus des rhizosphères de *N. ochroleuca* (en vert) de ceux de *O. smolikana* (en violet). Cette discrimination repose sur les valeurs de la CEC totale (Total-CEC), Mg échangeable (Mg-CEC) et Ni et Mg extractibles au DTPA. Les échantillons de *N. ochroleuca* se distinguent également de ceux de *O. rigida* (en orange) suivant l'axe F2, qui explique 20,1% de la variabilité totale. A l'inverse de *N. ochroleuca*, *O. rigida* est caractérisé par des altitudes basses, de faibles teneurs en Zn, Mn, Co et Fe extractibles au DTPA (Zn-DTPA, Mn-DTPA, Co-DTPA et Fe-DTPA), de plus faibles proportions en N total et C total et organique, et un pH basique. Les échantillons qui proviennent des rhizosphères de *O. chalcidica* (en bleu) sont répartis sur l'ensemble du plan principal, ne permettant pas de mettre en évidence une discrimination précise.

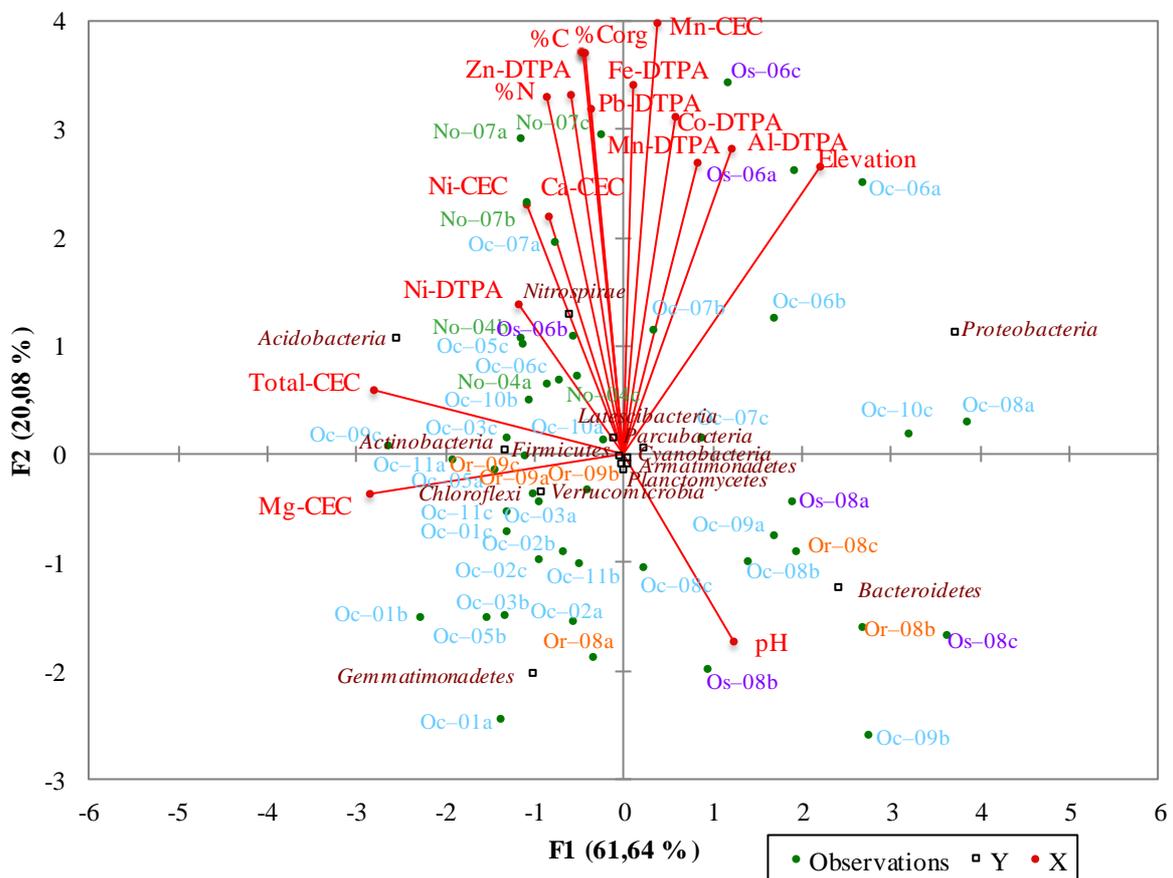


Figure 12 : Analyse de redondance entre les abondances relatives des 14 phyla majoritaires et les variables abiotiques des sites

%N : % d'azote total, %C : % de carbone total, %Corg : % de C organique, xx-DTPA : éléments biodisponibles, XX-CEC : éléments échangeables, Total-CEC : capacité d'échange cationique totale, les vecteurs des variables abiotiques ont été multipliés par un facteur 5

1.3. Les facteurs influençant la diversité bactérienne

Des corrélations de Spearman ont été calculées entre l'abondance relative des sept phyla majoritaires et les paramètres abiotiques des terres rhizosphériques (Figure 13). Seules les corrélations significatives ($p < 0,1$) ont été retenues. Le phylum des *Proteobacteria* montre des corrélations négatives avec Mg-DTPA ($p < 0,001$), Ni-DTPA ($p = 0,038$), Total-CEC ($p < 0,001$) et Mg-CEC ($p < 0,001$). Inversement, il présente des corrélations positives avec K-DTPA (0,073) et l'altitude ($p = 0,001$). Le phylum des *Acidobacteria* est corrélé négativement avec le pH ($p = 0,024$) et l'altitude ($p = 0,059$). Le phylum des *Actinobacteria* est corrélé positivement avec Ni-DTPA ($p = 0,016$), Zn-DTPA ($p = 0,061$) et %N ($p = 0,062$). Le phylum des *Gemmatimonadetes* est corrélé négativement avec pratiquement toutes les variables abiotiques, alors qu'il est corrélé positivement avec Mg-DTPA ($p < 0,001$) et Mg-CEC ($p = 0,047$). Le phylum des *Chloroflexi* est corrélé positivement avec Mg-DTPA ($p < 0,001$), Total-CEC ($p < 0,001$) et Mg-CEC ($p < 0,001$), alors qu'il est négativement corrélé avec Al-DTPA ($p = 0,012$), Co-DTPA ($p = 0,013$), Mn-DTPA ($p = 0,008$) et l'altitude ($p = 0,011$). Le phylum des *Bacteroidetes* présente des corrélations négatives avec Mg-DTPA ($p = 0,030$), Pb-DTPA ($p = 0,043$), Pb-DTPA ($p = 0,043$), Total CEC ($p = 0,001$), Mg-CEC ($p = 0,003$) et Ni-CEC ($p = 0,084$), et des corrélations positives avec le pH ($p = 0,063$) et K-DTPA ($p = 0,097$). Le phylum des *Nitrospirae* présente des corrélations négatives avec le pH ($p = 0,036$), Al-DTPA ($p = 0,001$), Co-DTPA ($p < 0,001$) et K-DTPA ($p = 0,020$), alors qu'il est corrélé positivement à pratiquement tous les autres paramètres abiotiques.

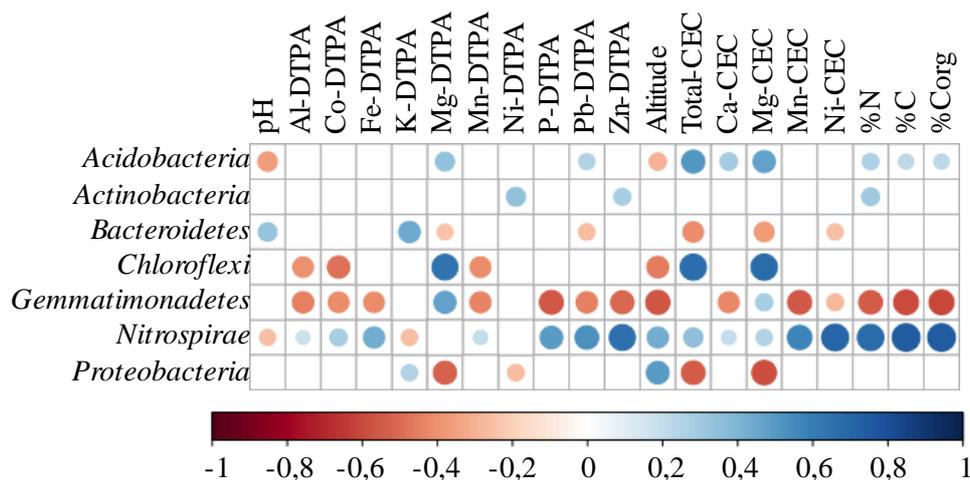


Figure 13 : Matrice de corrélations entre les paramètres abiotiques et les sept phyla bactériens majoritaires

basée sur le coefficient de corrélation r de Spearman, les blancs correspondent à un coefficient non significatif ($p > 0,1$) ; %N : % d'azote total, %C : % de carbone total, %Corg : % de C organique, xx-DTPA : éléments extractibles au DTPA, XX-CEC : éléments échangeables

Pour cerner le déterminisme de la diversité bactérienne rhizosphérique de plantes collectées, une analyse de partition de variance (VPA) a été effectuée entre le jeu de données des OTUs et les données abiotiques (pH, éléments échangeables, métaux extractibles au DTPA, Corg - 13 variables), les données topographiques (altitude et exposition - 2 variables) et les différentes espèces de plantes (4 espèces). Les variables colinéaires entres-elles ont été éliminées pour n'en conserver qu'une seule (conservation du Corg colinéaire avec C total et N total). Il ressort que 55% de la variabilité de la diversité bactérienne de nos échantillons est expliquée par l'ensemble de ces 3 types de données, avec 45% de cette variabilité non expliquée (résidus) (Figure 14). Ce sont les données abiotiques des terres rhizosphériques qui expliquent au mieux la diversité bactérienne des échantillons prélevés en Albanie, avec 16% d'explication spécifiquement liée à ces variables et au total 46% d'explication en considérant l'influence des paramètres abiotiques en association avec les autres variables. Ainsi, la diversité bactérienne rhizosphérique est expliquée à 83% par les données physico-chimiques des terres, en association avec les deux autres types de variables. La topographie participe également, en association avec les autres variables, à l'explication de la diversité bactérienne, avec 35% d'explication. Par contre, le pourcentage d'explication relatif à l'espèce de plante considéré seul (2,0%) ou en association avec les autres variables (11%) est faible, ce qui souligne sa faible influence dans le déterminisme de la diversité bactérienne.

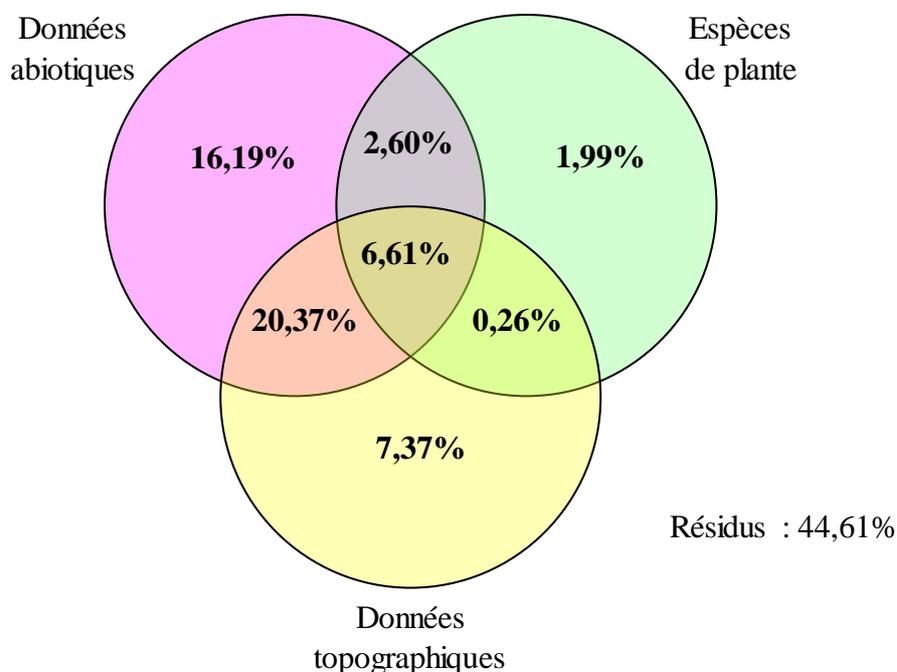


Figure 14 : Analyse de partition de la variance bactérienne au niveau OTUs en fonction des données abiotiques, topographiques et de l'espèce de plante

2. La diversité des communautés bactériennes en climat de mousson (Malaisie)

2.1. Caractérisation des échantillons

2.1.1. Les sites sélectionnés

Soixante plantes hyperaccumulatrices de Ni et leur terre rhizosphérique ont été échantillonnées (Tableau 20) sur les dix sites retenus (Figure 15).

Tableau 20 : Sites, espèces et codes des plantes hyperaccumulatrices prélevées

Site	Appellation	Altitude (m)	Plantes et codes
01	Bukit Kulung	1410	<i>P. balgooyi</i> (Phyb-01a, Phyb-01b, Phyb-01c)
02	Pahu	340	<i>P. securinegoides</i> (Phys-02a, Phys-02b, Phys-02c), <i>R. bengalensis</i> (Rinb-02a, Rinb-02b, Rinb-02c)
03	Monggis	420	<i>M. sundaikus</i> (Mis-03), <i>R. javanica</i> (Rinj-03), <i>R. bengalensis</i> (Rinb-03a, Rinb-03b, Rinb-03c)
04	Wuluh River	780	<i>F. kinabaluensis</i> (Fla-04), <i>G. cf. rubrum</i> (Glor-04), <i>M. sundaikus</i> (Mis-04), <i>R. javanica</i> (Rinj-04)
05	Wuluh River Km 7	905	<i>P. balgooyi</i> (Phyb-05a, Phyb-05b, Phyb-05c), <i>P. sarmentosa</i> (Psy-05), <i>Timonius</i> sp. (Tim-05), <i>X. luzonensis</i> (Xyl-05)
06	Wuluh River Km 3	680	<i>F. kinabaluensis</i> (Fla-06), <i>M. sundaikus</i> (Mis-06), <i>P. sarmentosa</i> (Psy-06), <i>R. javanica</i> (Rinj-06), <i>W. pinnata</i> (Wal-06), <i>R. bengalensis</i> (Rinb-06a, Rinb-06b, Rinb-06c)
07	Lobou	385	<i>A. alanbakeri</i> (Act-07), <i>F. kinabaluensis</i> (Fla-07), <i>M. sundaikus</i> (Mis-07), <i>R. javanica</i> (Rinj-07), <i>W. pinnata</i> (Wal-07)
08	Panataran River	470	<i>Macaranga cf. lowii</i> (Mac-08), <i>M. sundaikus</i> (Mis-08), <i>P. balgooyi</i> (Phyb-08a, Phyb-08b), <i>Rinorea</i> sp. (Rin-08), <i>P. sarmentosa</i> (Psy-08), <i>F. kinabaluensis</i> (Fla-08)
09	Bukit Mongilan	750	<i>F. kinabaluensis</i> (Fla-09), <i>Glochidion</i> sp. (Glo-09), <i>Rinorea</i> sp. (Rin-09), <i>M. sundaikus</i> (Mis-09), <i>P. balgooyi</i> (Phyb-09), <i>P. sarmentosa</i> (Psy-09)
10	Bukit Lompouyu	700	<i>A. alanbakeri</i> (Act-10), <i>F. kinabaluensis</i> (Fla-10), <i>P. balgooyi</i> (Phyb-10), <i>P. securinegoides</i> (Phys-10a, Phys-10b, Phys-10c), <i>Rinorea</i> sp. (Rin-10), <i>P. sarmentosa</i> (Psy-10), <i>Glochidion</i> sp. (Glo-10), <i>W. pinnata</i> (Wal-10)

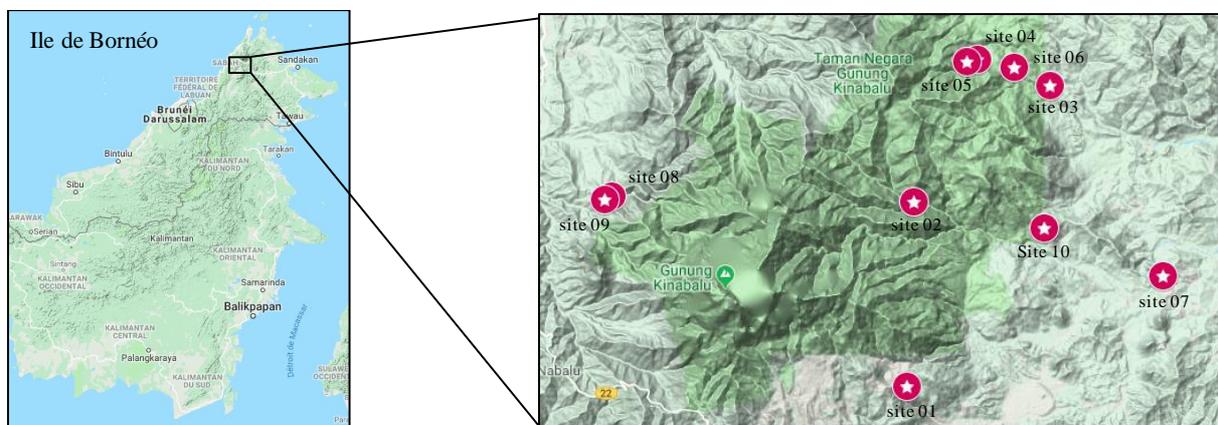


Figure 15 : Carte géographique des 10 sites de prélèvement

Les paramètres abiotiques des terres ont été mesurés (Tableau 21 à Tableau 25). La gamme de pH varie de 6,0 à 7,4 avec un pH moyen de 6,6 (Tableau 21). Les terres rhizosphériques sont bien pourvues en C avec un rapport Corg/N qui montre des différences importantes selon le site (10 à 23) ; le C organique correspond en moyenne à 96% du C total.

Tableau 21 : pH, N et C totaux et C organique des terres rhizosphériques

la moyenne et l'écart type sont donnés pour les répétitions, n correspond au nombre d'échantillons, les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à $p = 0,05$ (TukeyHSD test)

Site	n	pH	%N	%C	%Corg
01	3	6,0 ± 0,4 d	0,4 ± 0,2 a	7,4 ± 3,0 ab	6,3 ± 4,3 ab
02	6	6,8 ± 0,2 abc	0,5 ± 0,1 a	6,6 ± 2,2 ab	6,4 ± 2,2 ab
03	5	7,0 ± 0,2 ab	0,5 ± 0,1 a	5,9 ± 1,0 b	5,7 ± 1,0 ab
04	4	6,9 ± 0,3 ab	0,5 ± 0,2 a	7,2 ± 3,9 ab	7,2 ± 3,5 ab
05	6	6,2 ± 0,5 cd	0,8 ± 0,2 a	17 ± 6,8 a	15 ± 6,1 a
06	8	6,4 ± 0,3 bcd	0,6 ± 0,2 a	8,0 ± 4,1 ab	7,8 ± 4,1 ab
07	5	7,4 ± 0,4 a	0,6 ± 0,3 a	8,1 ± 4,1 ab	7,9 ± 4,0 ab
08	7	6,4 ± 0,2 bcd	0,8 ± 0,6 a	13 ± 13 ab	13 ± 12 ab
09	6	6,1 ± 0,3 d	0,5 ± 0,1 a	7,1 ± 2,5 ab	6,8 ± 2,4 ab
10	10	6,7 ± 0,2 bc	0,4 ± 0,1 a	6,0 ± 2,7 b	5,8 ± 2,7 b

Les métaux sont présents à forte concentration (Fe : 133 mg g⁻¹, Al : 18 mg g⁻¹, Cr : 2,8 mg g⁻¹ et Ni : 2,2 mg g⁻¹) (Tableau 22 et Tableau 23). La concentration du Mg est très élevée et le rapport Ca/Mg est inférieur à 1, quel que soit le site, montrant la nature ultramafique des sites.

Tableau 22 : Eléments totaux des terres rhizosphériques

la moyenne et l'écart type sont donnés pour les répétitions, n correspond au nombre d'échantillons, les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à $p = 0,05$ (TukeyHSD test)

Site	n	Al (mg g ⁻¹)	Ca (mg g ⁻¹)	Fe (mg g ⁻¹)	K (µg g ⁻¹)	Mg (mg g ⁻¹)	P (µg g ⁻¹)
01	3	34 ± 7,1 a	1,8 ± 1,5 bc	145 ± 19 bc	114 ± 37 bc	50 ± 10 bcd	76 ± 14 c
02	6	18 ± 2,0 bc	7,4 ± 1,6 ab	136 ± 15 b	204 ± 59 bc	61 ± 7,1 bcd	257 ± 25 bc
03	5	3,4 ± 0,5 e	4,0 ± 2,2 bc	154 ± 42 b	143 ± 17 bc	71 ± 14 bc	262 ± 34 bc
04	4	4,6 ± 3,5 de	4,2 ± 7,6 bc	94 ± 54 bc	192 ± 158 bc	168 ± 85 a	222 ± 181 bc
05	6	5,1 ± 3,4 de	3,8 ± 1,3 bc	120 ± 19 bc	304 ± 81 abc	74 ± 29 bc	489 ± 138 a
06	8	8,3 ± 4,0 cde	1,6 ± 1,3 c	129 ± 33 b	341 ± 222 ab	45 ± 22 cd	325 ± 114 ab
07	5	5,5 ± 2,3 de	3,4 ± 1,0 bc	90 ± 40 bc	352 ± 138 abc	108 ± 53 ab	305 ± 94 abc
08	7	11 ± 5,7 cde	10 ± 3,6 a	50 ± 27 c	508 ± 299 a	28 ± 11 cd	503 ± 190 a
09	6	25 ± 5,2 ab	1,5 ± 2,3 c	268 ± 60 a	112 ± 44 bc	9,5 ± 9,3 d	246 ± 37 bc
10	10	14 ± 11 cd	3,2 ± 2,7 bc	140 ± 67 b	102 ± 41 c	13 ± 11 d	157 ± 52 c

Tableau 23 : Eléments traces métalliques totaux des terres rhizosphériques

la moyenne et l'écart type sont donnés pour les répétitions, n correspond au nombre d'échantillons, les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à $p = 0,05$ (TukeyHSD test)

Site	n	Mn (mg g ⁻¹)	Co (µg g ⁻¹)	Cr (mg g ⁻¹)	Cu (µg g ⁻¹)	Ni (mg g ⁻¹)	Zn (µg g ⁻¹)
01	3	2,9 ± 0,1 bcd	250 ± 34 de	2,9 ± 0,5 bc	148 ± 43 a	1,7 ± 0,1 cde	136 ± 15 ab
02	6	7,2 ± 1,4 a	563 ± 76 ab	5,1 ± 0,4 ab	28 ± 3,6 cd	3,5 ± 0,2 a	141 ± 4,4 a
03	5	2,8 ± 0,8 cd	298 ± 76 d	2,0 ± 0,4 c	6,4 ± 0,9 d	2,0 ± 0,3 bcd	68 ± 15 c
04	4	1,8 ± 1 cd	170 ± 94 de	1,4 ± 0,7 c	8,7 ± 5,2 d	2,0 ± 0,3 bcd	50 ± 20 c
05	6	2,3 ± 1,1 cd	216 ± 48 de	1,6 ± 0,3 c	12 ± 5,1 d	1,7 ± 0,5 de	60 ± 19 c
06	8	3,6 ± 1,2 bc	299 ± 80 d	1,5 ± 0,4 c	14 ± 4,0 d	2,0 ± 0,6 cd	63 ± 11 c
07	5	3,2 ± 1,8 cd	305 ± 195 cd	2,0 ± 1,1 c	22 ± 7,4 cd	2,7 ± 0,9 abcd	75 ± 25 bc
08	7	1 ± 0,6 d	90 ± 52 e	1,0 ± 0,6 c	29 ± 7,2 cd	0,9 ± 0,4 e	49 ± 8,8 c
09	6	5,9 ± 1,4 ab	696 ± 125 a	4,0 ± 1,0 ab	65 ± 13 b	3,1 ± 0,4 ab	178 ± 27 a
10	10	6,1 ± 2 a	488 ± 137 bc	5,1 ± 1,9 a	45 ± 23 bc	2,7 ± 0,7 abc	163 ± 54 a

Les éléments les plus extractibles au DTPA dans les terres rhizosphériques sont le Ni ($193 \mu\text{g g}^{-1}$), le Fe ($140 \mu\text{g g}^{-1}$) et le Mn ($102 \mu\text{g g}^{-1}$) (Tableau 24). Bien que le Cr soit bien présent dans les rhizosphères (Cr total), il est par contre faiblement disponible ($< 1 \mu\text{g g}^{-1}$).

Tableau 24 : Métaux extractibles au DTPA des terres rhizosphériques

la moyenne et l'écart type sont donnés pour les répétitions, n correspond au nombre d'échantillons, les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à $p = 0,05$ (TukeyHSD test)

Site	n	Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Co ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Ni ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$)
01	3	$68 \pm 7,5$ cd	152 ± 103 ab	$8,7 \pm 3,9$ b	110 ± 33 a	$14 \pm 7,3$ a	$6,1 \pm 2,9$ a	$5,8 \pm 3,8$ a
02	6	140 ± 26 abc	67 ± 12 b	$4,5 \pm 1,2$ b	295 ± 71 a	$1,6 \pm 0,2$ b	$3,3 \pm 0,6$ a	$0,1 \pm 0,1$ b
03	5	68 ± 31 cd	96 ± 42 b	$2,9 \pm 1,6$ b	206 ± 53 a	$0,6 \pm 0,2$ b	$2,9 \pm 1,0$ a	$0,3 \pm 0,1$ b
04	4	33 ± 28 d	84 ± 52 b	$2,1 \pm 2,5$ b	198 ± 96 a	$0,6 \pm 0,5$ b	$2,0 \pm 1,0$ a	$0,2 \pm 0,0$ b
05	6	94 ± 61 bcd	443 ± 310 a	$10 \pm 5,7$ b	209 ± 77 a	$1,5 \pm 0,3$ b	$3,6 \pm 1,5$ a	$0,2 \pm 0,1$ b
06	8	101 ± 33 bcd	122 ± 48 b	$5,0 \pm 2,2$ b	228 ± 79 a	$1,1 \pm 0,4$ b	$3,8 \pm 2,9$ a	$0,3 \pm 0,1$ b
07	5	39 ± 31 d	76 ± 29 b	$1,9 \pm 2,3$ b	164 ± 125 a	$1,1 \pm 0,4$ b	$2,7 \pm 1,7$ a	$0,2 \pm 0,1$ b
08	7	47 ± 11 d	246 ± 256 ab	$2,8 \pm 0,8$ b	159 ± 84 a	$2,0 \pm 0,5$ b	$6,4 \pm 8,0$ a	$1,2 \pm 1,0$ b
09	6	166 ± 51 ab	104 ± 102 b	31 ± 16 a	180 ± 166 a	$1,4 \pm 0,2$ b	$3,2 \pm 1,7$ a	$0,1 \pm 0,0$ b
10	10	173 ± 61 a	$39 \pm 9,9$ b	$7,5 \pm 3,9$ b	158 ± 53 a	$1,4 \pm 0,7$ b	$2,0 \pm 0,5$ a	$0,2 \pm 0,1$ b

La CEC totale moyenne est de $27 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$ avec les plus fortes valeurs pour les sites 05 ($43 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$) et 08 ($39 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$), en comparaison des sites 09 ($11 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$) et 10 ($18 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$) (Tableau 25). Les valeurs des différents éléments échangeables sont relativement basses, à l'exception du Mg ($15 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$) et du Ca ($6,9 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$). Le site 05 présente les plus fortes concentrations en éléments échangeables, alors que les sites 09 et 10 offrent les plus faibles.

Tableau 25 : CEC totale et éléments échangeables des terres rhizosphériques

la moyenne et l'écart type sont donnés pour les répétitions, n correspond au nombre d'échantillons, les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à $p = 0,05$ (TukeyHSD test)

Site	n	CEC totale ($\text{cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$)	Ca ($\text{cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$)	K ($\text{cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$)	Mg ($\text{cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$)	Mn ($\text{cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$)	Ni ($\text{cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$)
01	3	17 ± 12 ab	$5,7 \pm 7,5$ a	$0,15 \pm 0,10$ ab	$7,9 \pm 3,3$ bc	$0,40 \pm 0,20$ a	$0,19 \pm 0,10$ a
02	6	$27 \pm 5,3$ ab	$11 \pm 6,6$ a	$0,28 \pm 0,10$ ab	$12 \pm 2,2$ bc	$0,18 \pm 0,06$ a	$0,20 \pm 0,15$ a
03	5	$25 \pm 2,8$ ab	$3,6 \pm 1,7$ a	$0,25 \pm 0,04$ ab	$18 \pm 1,9$ bc	$0,11 \pm 0,06$ a	$0,07 \pm 0,04$ a
04	4	28 ± 15 ab	$8,0 \pm 14$ a	$0,21 \pm 0,18$ ab	$17 \pm 5,0$ bc	$0,10 \pm 0,15$ a	$0,06 \pm 0,07$ a
05	6	$43 \pm 9,2$ a	$2,7 \pm 4,1$ a	$0,50 \pm 0,21$ a	$33 \pm 8,6$ a	$0,29 \pm 0,14$ a	$0,13 \pm 0,10$ a
06	8	$30 \pm 9,0$ ab	$5,8 \pm 6,0$ a	$0,37 \pm 0,17$ ab	$19 \pm 4,9$ b	$0,31 \pm 0,23$ a	$0,16 \pm 0,06$ a
07	5	33 ± 10 ab	$6,6 \pm 4,0$ a	$0,35 \pm 0,22$ ab	$22 \pm 6,5$ ab	$0,07 \pm 0,09$ a	$0,05 \pm 0,06$ a
08	7	39 ± 25 a	12 ± 11 a	$0,32 \pm 0,35$ ab	18 ± 15 b	$0,07 \pm 0,04$ a	$0,05 \pm 0,02$ a
09	6	$11 \pm 6,6$ b	$2,3 \pm 2,0$ a	$0,14 \pm 0,08$ b	$4,6 \pm 4,2$ c	$0,29 \pm 0,50$ a	$0,20 \pm 0,13$ a
10	10	$18 \pm 7,8$ b	$8,7 \pm 6,1$ a	$0,15 \pm 0,08$ b	$5,8 \pm 2,7$ c	$0,05 \pm 0,04$ a	$0,12 \pm 0,07$ a

2.1.2. L'hyperaccumulation de Ni par les plantes échantillonnées

Toutes espèces de plantes confondues, les concentrations les plus élevées observées dans les feuilles et tiges concernent le Ca (13 et $9,5 \text{ mg g}^{-1}$, respectivement), le K (11 et $6,6 \text{ mg g}^{-1}$, respectivement) et le Mg ($5,3$ et $1,7 \text{ mg g}^{-1}$, respectivement) (Tableau 26).

Tableau 26 : Macronutriments des différentes parties des plantes hyperaccumulatrices

la moyenne est suivie par le rang pour les répétitions, n correspond au nombre d'échantillons,

Act : *A. alanbakeri*, Fla : *F. kinabaluensis*, Glor : *G. cf. rubrum*, Glo : *Glochidion* sp.,Mac : *M. cf. lowii*, Mis : *M. sundaukus*, Phyb : *P. balgooyi*, Phys : *P. securinegoides*,Psy : *P. sarmentosa*, Rinb : *R. bengalensis*, Rinj : *R. javanica*, Rin : *Rinorea* sp., Tim : *Timonius* sp.,Wal : *W. pinnata*, Xyl : *X. luzonensis*

Plante	n	Partie	Ca (mg g ⁻¹)	K (mg g ⁻¹)	Mg (mg g ⁻¹)	P (µg g ⁻¹)	S (µg g ⁻¹)
Act	2	Feuilles	11 [7,8–15]	31 [29–32]	2,9 [1,2–4,7]	832 [766–899]	1408 [1159–1656]
		Tiges	3,6 [3,2–4,1]	9,6 [8,6–11]	1,6 [1,3–1,9]	854 [413–1296]	454 [387–522]
		Racines	1,8 [1,5–2,0]	8,9 [8,7–9,0]	1,2 [0,9–1,6]	622 [400–843]	391 [383–398]
Fla	6	Feuilles	14 [4,4–30]	15 [12–19]	4,7 [2,7–6,4]	560 [364–635]	1382 [1030–1607]
		Tiges	6,7 [1,4–13]	6,7 [2,7–9,3]	1,5 [0,7–2,1]	284 [185–434]	442 [364–506]
		Racines	2,1 [1,5–3,7]	4,0 [1,2–6,5]	1,5 [0,9–1,9]	196 [117–293]	347 [290–498]
Glor	1	Feuilles	2,0	2,1	10	354	<LQ
		Tiges	1,1	1,3	3,8	124	299
		Racines	0,9	1,1	4,2	118	329
Glo	2	Feuilles	8,6 [6,7–10]	8,8 [7,9–9,7]	5,1 [3,5–6,8]	370 [351–390]	1210 [1045–1375]
		Tiges	6,9 [5,3–8,4]	5,6 [3,9–7,4]	2,2 [1,8–2,7]	218 [218–218]	610 [545–675]
		Racines	5,4 [3,8–7,0]	2,5 [1,6–3,3]	1,6 [1,5–1,7]	136 [127–145]	460 [351–570]
Mac	1	Feuilles	6,2	3,3	2,3	350	720
		Tiges	9,0	6,7	2,1	260	558
		Racines	2,4	1,9	1,4	199	<LQ
Mis	6	Feuilles	14 [8,3–18]	5,4 [2,5–7,6]	4,4 [2,6–8,1]	597 [428–764]	1 073 [674–1 393]
		Tiges	9,9 [5,3–15]	3,1 [1,1–5,6]	1,0 [0,4–1,8]	330 [197–557]	411 [<LQ–701]
		Racines	5,1 [2,7–7,6]	1,9 [0,6–2,9]	1,5 [0,8–1,8]	206 [110–316]	424 [264–660]
Phyb	10	Feuilles	11 [4,6–17]	5,5 [1,7–8,3]	7,2 [3,5–12]	457 [308–762]	1293 [805–1735]
		Tiges	2,3 [1,4–3,7]	3,8 [2,5–5,3]	1,5 [0,9–2,4]	241 [119–417]	558 [<LQ–991]
		Racines	1,1 [0,6–1,9]	2,2 [1,1–3,1]	1,7 [0,9–4,8]	161 [61–304]	571 [413–873]
Phys	6	Feuilles	23 [13–33]	11 [6,0–15]	3,1 [1,9–4,6]	661 [479–775]	1704 [1502–1822]
		Tiges	23 [9,7–36]	7,2 [5,0–9,1]	0,7 [0,4–1,0]	324 [217–492]	436 [<LQ–862]
		Racines	8,0 [7,0–9,6]	4,6 [2,9–6,3]	1,5 [0,8–2,4]	175 [<LQ–327]	353 [<LQ–729]
Psy	5	Feuilles	11 [7,0–16]	8,0 [4,8–9,1]	9,6 [5,7–13]	622 [330–852]	1915 [1598–2422]
		Tiges	7,0 [4,1–12]	13 [9,4–19]	4,6 [2,0–7,3]	320 [<LQ–567]	647 [<LQ–1075]
		Racines	5,2 [3,2–6,5]	7,5 [5,1–14]	3,4 [1,3–4,8]	240 [202–267]	873 [557–1472]
Rinb	9	Feuilles	12 [8,9–17]	13 [9,4–18]	5,4 [2,3–7,4]	835 [703–1055]	1988 [1675–2337]
		Tiges	11 [4,7–18]	7,8 [5,4–13]	1,8 [0,8–4,1]	456 [184–696]	714 [552–858]
		Racines	3,4 [0,7–8,4]	5,6 [3,5–7,2]	2,0 [1,2–3,6]	311 [134–474]	631 [438–942]
Rinj	4	Feuilles	12 [10–17]	12 [10–15]	4,4 [2,0–6,1]	834 [758–880]	1532 [975–1978]
		Tiges	14 [11–17]	8,2 [5,7–10]	1,8 [0,8–3,2]	591 [431–684]	885 [590–1175]
		Racines	5,1 [3,1–8,8]	3,9 [3,3–4,6]	1,8 [1,4–2,0]	396 [218–535]	802 [437–1163]
Rin.	3	Feuilles	18 [13–24]	11 [8,0–13]	3,9 [3,8–4,0]	612 [496–745]	1532 [1311–1958]
		Tiges	19 [13–25]	5,1 [2,9–7,0]	1,3 [0,9–1,6]	389 [253–544]	959 [782–1205]
		Racines	12 [5,3–16]	2,9 [1,9–4,6]	1,7 [1,1–2,4]	272 [184–435]	1332 [1087–1814]
Tim	1	Feuilles	2,5	9,0	5,3	556	1104
		Tiges	0,7	7,7	1,5	333	368
		Racines	0,5	2,6	0,6	137	182
Wal	3	Feuilles	9,9 [9,4–11]	18 [15–19]	2,7 [0,7–3,7]	712 [582–787]	1577 [1408–1682]
		Tiges	9,3 [6,4–14]	5,8 [4,7–6,6]	0,8 [0,4–1,5]	298 [250–359]	521 [424–662]
		Racines	4,2 [3,0–5,4]	4,7 [3,9–6,0]	1,4 [0,7–2,4]	220 [191–271]	331 [255–414]
Xyl	1	Feuilles	13	15	5,7	720	1926
		Tiges	5,8	8,6	1,5	684	565
		Racines	1,8	6,0	1,7	280	<LQ

Le caractère d'hyperaccumulation du Ni est présent chez la plupart des plantes échantillonnées, avec toutefois une forte variabilité pour une même espèce (Tableau 27). C'est le cas de *M. sundaiikus* pouvant accumuler dans ses feuilles de 600 à 3 600 $\mu\text{g g}^{-1}$. De la même façon, chez *P. sarmentosa*, l'accumulation de Ni varie de 42 à 20 800 $\mu\text{g g}^{-1}$. Les plus fortes concentrations moyennes en Ni dans les feuilles sont retrouvées pour *P. securinegoides* (19 000 $\mu\text{g g}^{-1}$), *R. bengalensis* (16 100 $\mu\text{g g}^{-1}$) et *R. javanica* (15 200 $\mu\text{g g}^{-1}$). Les espèces *M. cf. lowii* et *Timonius* sp., bien qu'ayant montré une réaction positive lors du test avec le papier imprégné de DMG durant la campagne de prélèvement sur le terrain, possèdent des concentrations trop faibles en Ni pour être considérées comme hyperaccumulatrices (9,0 et 42 $\mu\text{g g}^{-1}$ dans leurs feuilles, respectivement). De plus, la liane *P. Sarmentosa*, prélevée sur le site 10, possède de fortes concentrations en Al (1 700 $\mu\text{g g}^{-1}$ dans les feuilles, 800 $\mu\text{g g}^{-1}$ dans les tiges et 1 500 $\mu\text{g g}^{-1}$ dans les racines).

Tableau 27 : Micronutriments des différentes parties des plantes hyperaccumulatrices

la moyenne est suivie par le rang pour les répétitions, n correspond au nombre d'échantillons,

Act : *A. alanbakeri*, Fla : *F. kinabaluensis*, Glor : *G. cf. rubrum*, Glo : *Glochidion* sp.,Mac : *M. cf. lowii*, Mis : *M. sundaukus*, Phyb : *P. balgooyi*, Phys : *P. securinegoides*,Psy : *P. sarmentosa*, Rinb : *R. bengalensis*, Rinj : *R. javanica*, Rin : *Rinorea* sp., Tim : *Timonius* sp.,Wal : *W. pinnata*, Xyl : *X. luzonensis*

Plante	n	Partie	Al ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cr ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Co ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Ni (mg g^{-1})	Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Act	2	Feuilles	<LQ	1,2 [$<\text{LQ}-2,4$]	31 [21–40]	3,0 [2,1–3,9]	4,7 [4,6–4,7]
		Tiges	<LQ	<LQ	4,0 [2,0–5,9]	1,0 [0,7–1,2]	2,3 [1,9–2,6]
		Racines	33 [31–34]	9,1 [7,8–10]	4,2 [2,5–5,9]	0,5 [0,3–0,6]	4,8 [4,0–5,6]
Fla	6	Feuilles	6,1 [$<\text{LQ}-19$]	3,5 [$<\text{LQ}-8,0$]	11 [3,6–21]	5,2 [2,2–8,1]	3,3 [2,2–4,6]
		Tiges	6,6 [$<\text{LQ}-14$]	1,3 [$<\text{LQ}-2,9$]	2,2 [$<\text{LQ}-4,5$]	1,2 [0,2–2,8]	2,3 [1,6–3,1]
		Racines	48 [$<\text{LQ}-129$]	11 [3,1–21]	4,1 [$<\text{LQ}-9,3$]	0,7 [0,2–1,3]	1,4 [$<\text{LQ}-3,2$]
Glor	1	Feuilles	<LQ	8,4	<LQ	1,1	<LQ
		Tiges	<LQ	<LQ	2,2	0,3	2,7
		Racines	<LQ	6,7	2,3	0,2	2,6
Glo	2	Feuilles	35 [12–58]	22 [21–22]	42 [28–56]	4,1 [3,9–4,3]	2,8 [2,5–3,0]
		Tiges	<LQ	1,5 [$<\text{LQ}-3,0$]	28 [8,0–48]	0,8 [0,6–1,0]	4,2 [$<\text{LQ}-8,5$]
		Racines	69 [37–102]	14 [13–15]	19 [6,8–32]	0,3 [0,2–0,3]	1,0 [$<\text{LQ}-2,1$]
Mac	1	Feuilles	15	<LQ	<LQ	0,009	4,6
		Tiges	<LQ	<LQ	<LQ	0,02	6,2
		Racines	<LQ	5,7	<LQ	0,03	6,7
Mis	6	Feuilles	5,8 [$<\text{LQ}-20$]	3,2 [$<\text{LQ}-7,7$]	12 [$<\text{LQ}-37$]	2,2 [0,6–3,6]	4,8 [$<\text{LQ}-7,2$]
		Tiges	8,3 [$<\text{LQ}-50$]	1,1 [$<\text{LQ}-2,3$]	<LQ	0,3 [0,06–0,5]	2,5 [$<\text{LQ}-4,5$]
		Racines	84 [$<\text{LQ}-222$]	20 [5,1–33]	4,0 [$<\text{LQ}-9,4$]	0,2 [0,08–0,4]	4,2 [3,4–6,6]
Phyb	10	Feuilles	51 [$<\text{LQ}-165$]	8,8 [1,9–15]	113 [12–554]	5,0 [1,8–11]	3,0 [$<\text{LQ}-5,1$]
		Tiges	77 [$<\text{LQ}-228$]	9,0 [$<\text{LQ}-19$]	67 [7,2–295]	2,2 [0,8–4,2]	4,6 [$<\text{LQ}-7,0$]
		Racines	173 [38–437]	21 [5,6–60]	123 [6,8–797]	2,8 [0,6–6,3]	5,9 [2,3–10]
Phys	6	Feuilles	33 [$<\text{LQ}-98$]	14 [5,3–25]	37 [9,1–72]	19 [6,9–34]	2,7 [$<\text{LQ}-4,2$]
		Tiges	32 [$<\text{LQ}-137$]	10 [3,6–27]	8,8 [$<\text{LQ}-21$]	3,8 [1,0–6,1]	4,6 [$<\text{LQ}-8,1$]
		Racines	357 [151–718]	98 [46–163]	17 [6,4–33]	4,9 [2,8–6,4]	7,4 [2,9–18]
Psy	5	Feuilles	691 [102–1721]	68 [$<\text{LQ}-213$]	37 [$<\text{LQ}-73$]	12 [0,04–21]	8,4 [4,2–11]
		Tiges	251 [$<\text{LQ}-827$]	31 [$<\text{LQ}-112$]	40 [6,6–101]	4,9 [0,03–8,0]	4,1 [$<\text{LQ}-8,6$]
		Racines	456 [$<\text{LQ}-1518$]	36 [$<\text{LQ}-83$]	65 [13–128]	3,8 [0,2–6,8]	4,0 [$<\text{LQ}-7,1$]
Rinb	9	Feuilles	36 [$<\text{LQ}-137$]	17 [$<\text{LQ}-41$]	19 [8,9–34]	16 [6,1–30]	4,5 [$<\text{LQ}-6,4$]
		Tiges	5,1 [$<\text{LQ}-46$]	4,9 [$<\text{LQ}-16$]	3,9 [$<\text{LQ}-7,7$]	4,4 [0,8–7,2]	3,7 [$<\text{LQ}-7,7$]
		Racines	112 [$<\text{LQ}-561$]	41 [6,9–189]	7,5 [2,5–21]	5,1 [2,5–7,6]	7,9 [$<\text{LQ}-49$]
Rinj	4	Feuilles	48 [$<\text{LQ}-123$]	15 [5,1–36]	48 [18–100]	15 [10–21]	5,0 [3,7–7,3]
		Tiges	11 [$<\text{LQ}-32$]	3,7 [$<\text{LQ}-9,6$]	5,7 [2,9–7,5]	4,0 [2,9–5,4]	3,6 [3,2–3,9]
		Racines	64 [40,9–110]	22 [9,1–43]	7,5 [5,5–9,0]	3,1 [1,4–5,1]	3,6 [2,1–4,4]
Rin.	3	Feuilles	14 [$<\text{LQ}-26$]	4,5 [3,0–5,4]	68 [8,5–181]	7,5 [3,9–14]	4,9 [4,2–6,1]
		Tiges	15 [$<\text{LQ}-27$]	2,7 [1,6–3,8]	6,2 [$<\text{LQ}-16$]	1,5 [0,7–2,5]	3,7 [3,0–4,8]
		Racines	212 [116–394]	33 [11–69]	15 [3,3–22]	1,9 [1,1–2,6]	3,8 [2,9–4,3]
Tim	1	Feuilles	143	19	3,0	0,04	13
		Tiges	26	4,4	<LQ	0,01	8,0
		Racines	<LQ	2,2	<LQ	0,01	3,2
Wal	3	Feuilles	50 [$<\text{LQ}-135$]	10 [$<\text{LQ}-23$]	14,5 [4,4–24,6]	3,1 [1,8–4,1]	4,3 [3,7–4,9]
		Tiges	6,3 [$<\text{LQ}-19$]	1,7 [$<\text{LQ}-3,7$]	2,1 [$<\text{LQ}-3,4$]	0,4 [0,1–0,6]	2,8 [2,6–3,1]
		Racines	48 [13–66]	28 [8,4–39]	3,0 [$<\text{LQ}-6,1$]	0,3 [0,1–0,5]	2,5 [2,2–2,7]
Xyl	1	Feuilles	<LQ	4,5	3,5	1,9	3,5
		Tiges	<LQ	<LQ	<LQ	0,3	<LQ
		Racines	<LQ	8,6	<LQ	0,2	<LQ

Les facteurs de bioconcentrations et de transfert ont été calculés pour les échantillons prélevés (Tableau 28). Les plantes *A. alanbakeri*, *G. cf. rubrum*, *Glochidion* sp., *M. cf. lowii*, *Timonius* sp. et *X. luzionensis* n'ont pas été conservées pour les calculs de BCF, le nombre d'échantillons (inférieur à 3) étant trop faible pour les retenir dans l'analyse statistique.

Phyllanthus securinegoides possède le meilleur BCF (facteur de 95) et statistiquement plus élevé que celui de *M. sundaikus* (facteur de 16). Cependant, c'est *M. sundaikus* qui possède un des meilleurs TF (facteur de 9,6), tout comme *F. kinabaluensis* (facteur de 9,3) et *W. pinnata* (facteur de 11). Les différentes espèces de *Rinorea* et de *Phyllanthus* montrent des valeurs de BCF et TF intermédiaires.

Tableau 28 : Facteur de bioconcentration (BCF) et de transfert (TF) des hyperaccumulateurs la moyenne et l'écart type sont donnés pour les répétitions, n correspond au nombre d'échantillons, les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à $p = 0,05$ (TukeyHSD test)

Plante	n	BCF	TF
<i>F. kinabaluensis</i>	6	27 ± 15 ab	9,3 ± 4,8 a
<i>M. sundaikus</i>	6	16 ± 11 b	9,6 ± 2,5 a
<i>P. balgooyi</i>	10	44 ± 38 ab	2,0 ± 0,8 b
<i>P. securinegoides</i>	6	95 ± 74 a	3,7 ± 1,6 b
<i>P. sarmentosa</i>	5	62 ± 39 ab	2,8 ± 1,8 b
<i>Rinorea</i> sp.	3	79 ± 53 ab	3,7 ± 1,7 b
<i>R. bengalensis</i>	9	63 ± 27 ab	3,1 ± 0,9 b
<i>R. javanica</i>	4	66 ± 28 ab	5,5 ± 2,1 ab
<i>W. pinnata</i>	3	18 ± 2,6 ab	11 ± 5,1 a

2.2. La diversité bactérienne rhizosphérique

A l'issue de l'analyse bioinformatique des données obtenues par séquençage à haut débit des 60 échantillons d'ADNs rhizosphériques, 2 660 788 séquences ont été obtenues et regroupées sous 2 477 OTUs différentes appartenant à 23 phyla. Les abondances relatives de chaque phylum ont été calculées (Figure 16) et les phyla représentés à moins de 1% dans les différents échantillons ont été regroupés sous la dénomination "Autres (<1%)" (*Armatimonadetes*, *BRC1*, *Cyanobacteria*, *Dependentiae*, *Elusimicrobia*, *Entotheonellaeota*, *GAL15*, *Nitrospirae*, *Patescibacteria*, *Spirochaetes*, *Verrucomicrobia*, *WPS-2* et *Zixibacteria*). Enfin, 1,2% des séquences n'ont pu être affiliées taxonomiquement.

Sur les dix phyla les plus abondants, les *Proteobacteria* (46%) et les *Acidobacteria* (21%) sont, en moyenne, les mieux représentés, tous sites confondus et quelles que soient les plantes présentes. Viennent ensuite, en proportions globalement équivalentes, les *Actinobacteria* (6,3%), les *Rokubacteria* (5,5%) et les *Bacteroidetes* (4,3%). Les *Firmicutes* sont significativement plus abondants sur le site 07 (17%) que sur les autres sites (1,8%). A l'inverse, ce site possède les plus faibles proportions en *Acidobacteria* (12% pour une moyenne de 22% pour les autres sites), *Chloroflexi* (2,5% contre 3,3%) et *Planctomycetes* (1,9% contre 4,0%). Aucune différence significative n'est observée entre les différents sites pour les phyla des *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* et *Latescibacteria*.

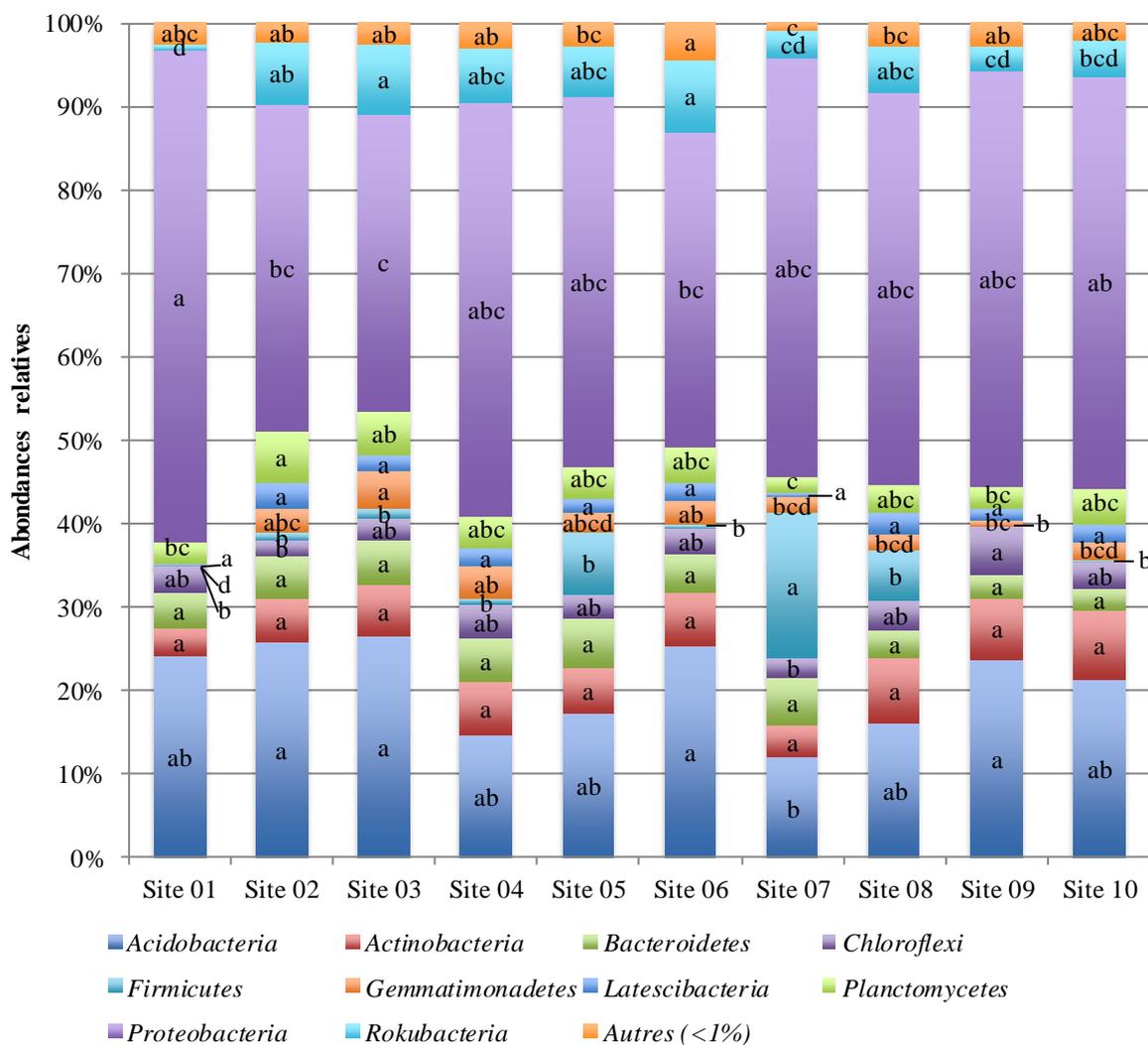


Figure 16 : Abondance relative des phyla majoritaires des terres rhizosphériques en fonction des sites

les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à $p = 0,05$ (TukeyHSD test)

Lors d'un regroupement des différentes abondances relatives des phyla majoritaires en fonction non pas du site d'échantillonnage mais de l'espèce de plante, il ressort que, quelle que soit la plante considérée, les *Proteobacteria* est le phylum le mieux représenté, suivi des *Acidobacteria* et des *Actinobacteria* (Figure 17). En outre, des différences significatives ont été mises en évidence pour le phylum des *Bacteroidetes* avec une abondance relative supérieure pour *M. sundaiikus* (7,8%) en comparaison de *P. securinegoides* (3,1%) et *P. sarmentosa* (2,5%). De plus, les phyla des *Rokubacteria* et *Gemmatimonadetes* possèdent des abondances relatives supérieures pour *R. bengalensis* (8,6 pour *Rokubacteria* et 3,6% pour *Gemmatimonadetes*) en comparaison de *P. balgooyi* (3,6 et 1,2%) et *P. sarmentosa* (3,3 et 1,0%). Les échantillons rhizosphériques issus de *A. alanbakeri*, *Glochidion* sp., *G. cf. rubrum*, *M. cf. lowii*, *Timonius* sp. et *X. luzoniensis* n'ont pas été conservés pour ces analyses statistiques, le nombre d'échantillons étant inférieur à 3.

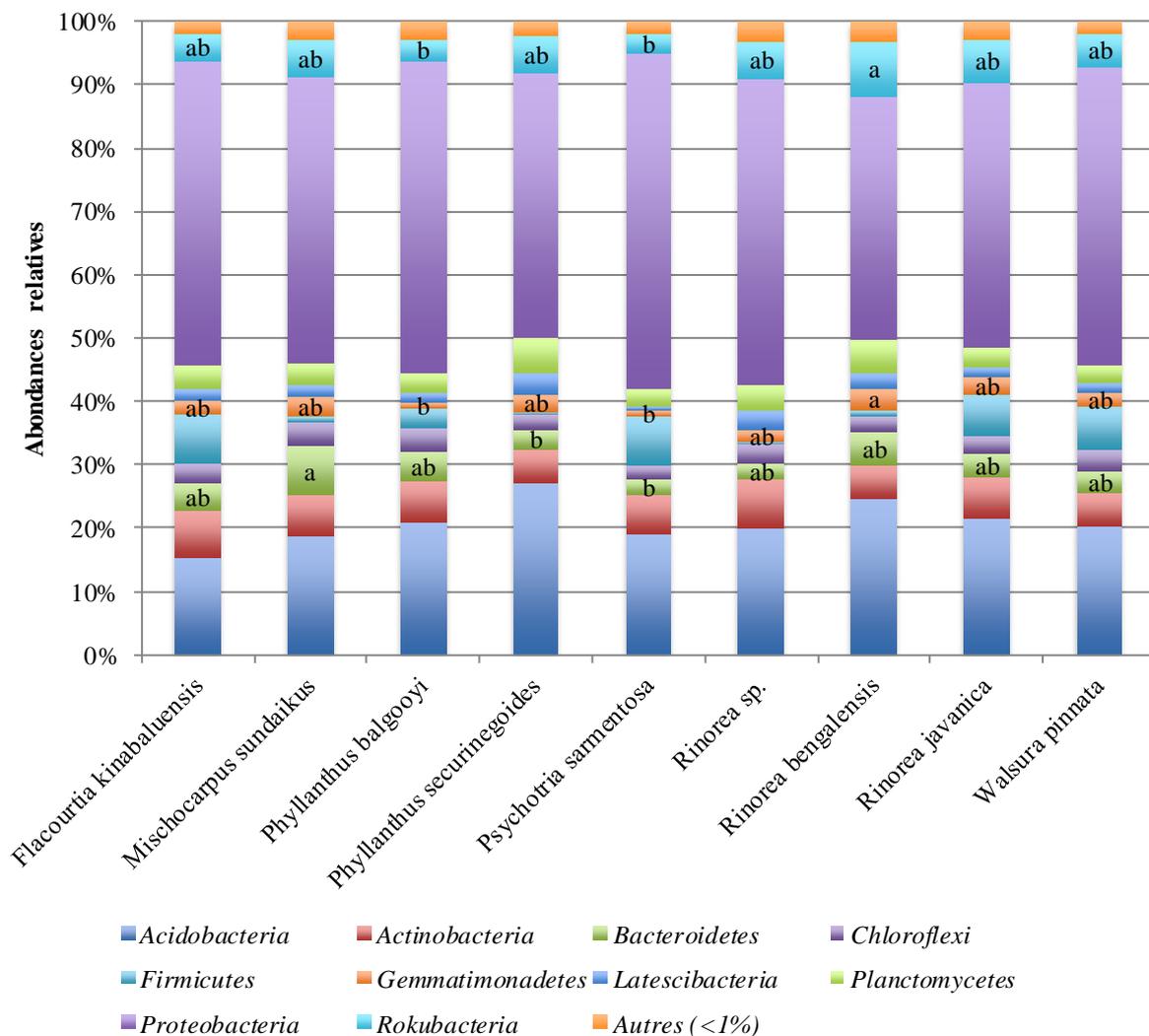


Figure 17 : Abondance relative des phyla majoritaires des terres rhizosphériques en fonction des plantes

les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à $p = 0,05$ (TukeyHSD test)

Les indices d' α -diversité (OTUs observées, Chao1 et Shannon) pour les terres rhizosphériques ne montrent aucune différence significative entre les différentes espèces échantillonnées. Par contre, des différences sont notables si l'on considère l' α -diversité de chaque site (Tableau 29). Les sites comprennent entre 853 (Site 01) et 1748 (Site 06) OTUs sur les 2 477 OTUs observées. Au minimum, 82,6% de la diversité réelle de nos échantillons est représentée ($\frac{\text{OTUs observées}}{\text{Chao1}} \times 100$). L'indice de Shannon est compris entre 7.34 (Site 07) et 9.40 (Site 06).

Tableau 29 : Indices d' α -diversité

la moyenne et l'écart type sont donnés pour les répétitions, n correspond au nombre d'échantillons, les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à $p = 0,05$ (TukeyHSD test)

Site	n	OTUs	Chao1	Shannon
01	3	853 ± 123 d	930 ± 137 c	8,25 ± 0,19 ab
02	6	1574 ± 128 ab	1709 ± 90 ab	8,82 ± 0,85 a
03	5	1682 ± 136 ab	1806 ± 126 ab	9,34 ± 0,31 a
04	4	1328 ± 304 abcd	1452 ± 320 abc	8,76 ± 0,67 ab
05	6	1459 ± 195 abc	1611 ± 179 ab	8,89 ± 0,60 a
06	8	1748 ± 140 a	1867 ± 128 a	9,40 ± 0,32 a
07	5	1247 ± 225 bcd	1437 ± 233 bc	7,34 ± 1,04 b
08	7	1527 ± 146 ab	1680 ± 106 ab	8,76 ± 1,13 a
09	6	1128 ± 361 cd	1201 ± 394 c	8,38 ± 0,52 ab
10	10	1526 ± 209 ab	1643 ± 230 ab	9,01 ± 0,33 a

Pour mettre en évidence les liens entre la diversité bactérienne et les paramètres abiotiques des différents sites, une analyse de redondance (RDA) a été conduite en se fondant, d'une part, sur l'abondance relative des dix phyla majoritaires et, d'autre part, sur les paramètres physico-chimiques des terres rhizosphériques (Tableau 21, Tableau 24 et Tableau 25). La fonction *envfit* du package Vegan a été utilisée pour ne conserver que les variables abiotiques corrélées significativement ($p < 0,10$) avec l'abondance relative des phyla bactériens majoritaires. Ainsi, parmi l'ensemble des paramètres abiotiques mesurés, seuls seront conservés : les pourcentages d'azote total, de carbone total et de C organique, les teneurs en Cu, Mn, Co, Pb, Fe et Zn extractibles au DTPA, les concentrations en Ni, K et Mg échangeables, la CEC totale et enfin le pH.

Le plan principal F1-F2 explique 89% de la variabilité totale (Figure 18). La plupart des échantillons correspondant aux terres rhizosphériques de *R. bengalensis* (Rinb) présentent à la fois des abscisses et ordonnées négatives. Leur discrimination repose sur des pH basiques, un fort Ni échangeable et à l'inverse de faibles concentrations en Cu, Co et Pb extractibles au DTPA. De plus, ces échantillons possèdent de plus faibles abondances relatives en *Proteobacteria* et *Firmicutes*. Par contre, aucune discrimination claire ne peut être établie pour les échantillons rhizosphériques des autres espèces de *Rinorea* (*R. javanica* : Rinj et *Rinorea* sp. : Rin). Les échantillons issus des rhizosphères de *P. securinegoides* (Phys) sont corrélés négativement avec les pourcentages en N, C, C organique, la CEC totale, les teneurs en Mg et K échangeables. De plus, ces échantillons présentent de fortes abondances en *Proteobacteria* et *Acidobacteria*. Enfin, pour les échantillons issus des rhizosphères de *P. balgooyi*, comme ceux des autres plantes hyperaccumulatrices, il n'est pas possible de les corrélés avec des paramètres physico-chimiques des sols, dans la mesure où ils sont répartis sur l'ensemble du plan F1-F2.

Les échantillons rhizosphériques ont été comparés entre eux (β -diversité) avec la méthode "Unweighted Unifrac". Elle permet de dessiner un arbre phylogénétique UPGMA basé sur les séquences des OTUs (Figure 19). Il ressort que les échantillons des terres rhizosphériques de *R. bengalensis* (en rose foncé) sont regroupés ensemble (hormis l'échantillon Rinb-02b). Ils possèdent donc une diversité bactérienne proche, quel que soit le site d'échantillonnage (sites 02, 03, 06). Pour les échantillons provenant des autres espèces de plantes, il semble que les rhizosphères prélevées sur un même site présentent une diversité bactérienne proche. En effet, si nous prenons comme exemple l'échantillon rhizosphérique de *W. pinnata* prélevé sur le site 06, la diversité bactérienne retrouvée est plus proche de celle de l'échantillon de *F. kinabaluensis* prélevé sur le même site que de celle de l'échantillon de terre rhizosphérique de *W. pinnata* prélevé sur le site 07. De même, il existe une proximité entre les échantillons Phys-10, Rin-10, Phyb-10, Wal-10, Phy-10b, Phys-10c et Glo-10.

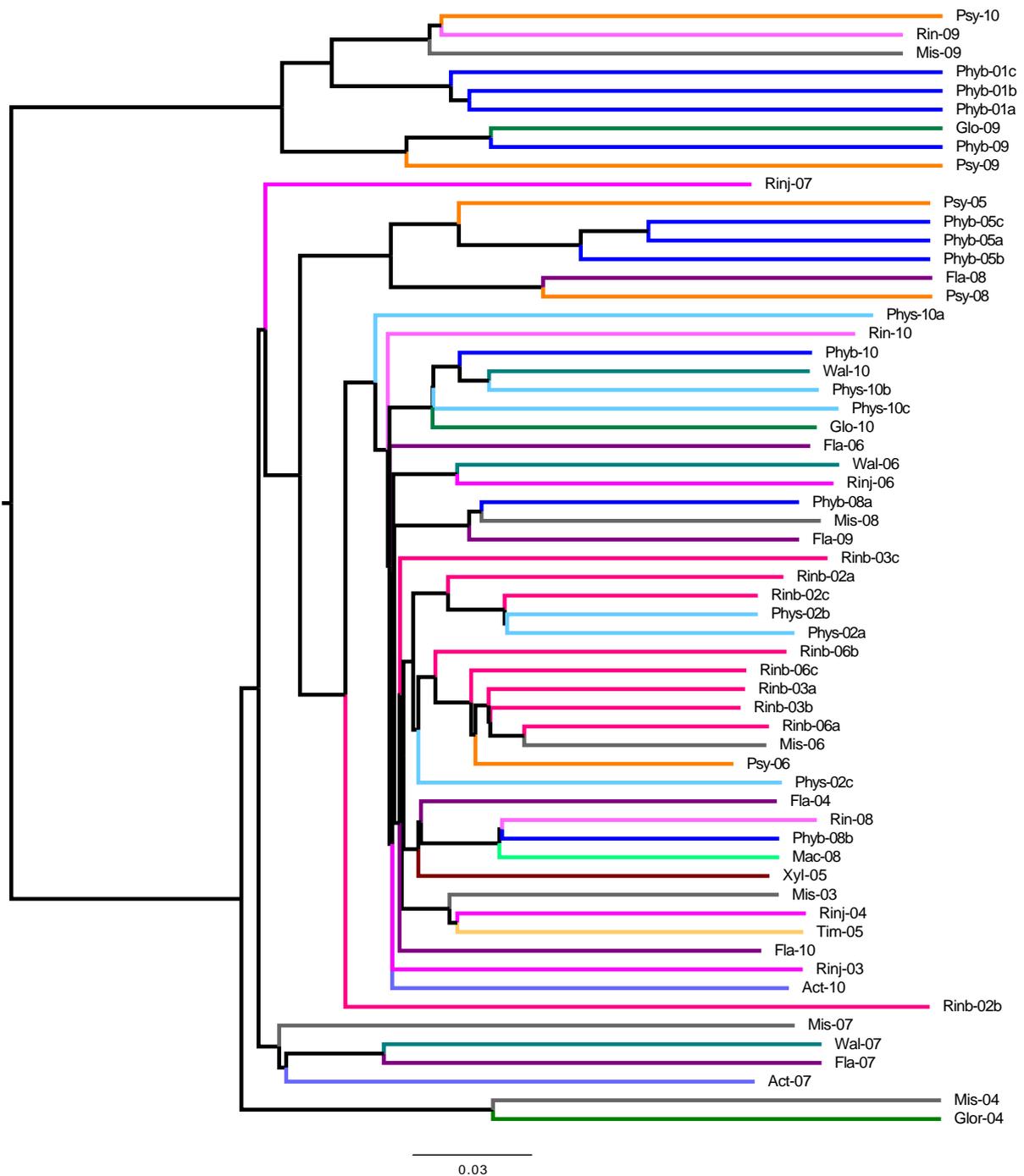


Figure 19 : Arbre phylogénétique UPGMA des terres rhizosphériques basé sur la métrique de phylogénie Unweighted UniFrac

Act : *A. alanbakeri*, Fla : *F. kinabaluensis*, Glor : *G. cf. rubrum*, Glo : *Glochidion* sp.,
 Mac : *M. cf. lowii*, Mis : *M. sundaikus*, Phyb : *P. balgooyi*, Phys : *P. securinegoides*,
 Psy : *P. sarmentosa*, Rinb : *R. bengalensis*, Rinj : *R. javanica*, Rin : *Rinorea* sp., Tim : *Timonius* sp.,
 Wal : *W. pinnata*, Xyl : *X. luzonensis*

2.3. L'impact de l'âge de la plante sur la diversité des communautés bactériennes

Afin de cerner si la taille de la plante et donc son âge pouvait induire un biais lors de l'analyse de la diversité des communautés bactériennes de la rhizosphère des hyperaccumulateurs de Ni, des plantes d'âge différents de 2 espèces différentes ont été récoltées sur 2 sites :

- *R. bengalensis* et *P. securinegoides* sur le site 02 (Tableau 30)

Tableau 30 : Echantillons de tailles différentes prélevés sur le site 02 (Pahu)

Code échantillon	Plante	Taille arbre (cm)	Ni-DTPA (mg kg ⁻¹)	Ni feuilles (µg mg ⁻¹)
Rinb-500	<i>Rinorea bengalensis</i>	500	166	20949
Rinb-200	<i>Rinorea bengalensis</i>	200	515	17640
Rinb-100	<i>Rinorea bengalensis</i>	100	411	10587
Rinb-30a	<i>Rinorea bengalensis</i>	30	297	24575
Rinb-30b	<i>Rinorea bengalensis</i>	30	267	29629
Rinb-30c	<i>Rinorea bengalensis</i>	30	266	23150
Phys-500	<i>Phyllanthus securinegoides</i>	500	253	27751
Phys-300	<i>Phyllanthus securinegoides</i>	300	255	24106
Phys-120	<i>Phyllanthus securinegoides</i>	120	329	24644
Phys-30a	<i>Phyllanthus securinegoides</i>	30	243	12548
Phys-30b	<i>Phyllanthus securinegoides</i>	30	261	7598
Phys-30c	<i>Phyllanthus securinegoides</i>	30	436	6894

- *P. securinegoides* et *P. balooyi* sur le site 10 (Tableau 31)

Tableau 31 : Echantillons de tailles différentes prélevés sur le site 10 (Bukit Lompouyu)

Code échantillon	Plante	Taille arbre (cm)	Ni-DTPA (mg kg ⁻¹)	Ni feuilles (µg mg ⁻¹)
Phys-400	<i>Phyllanthus securinegoides</i>	400	383	20731
Phys-300	<i>Phyllanthus securinegoides</i>	300	249	24805
Phys-100	<i>Phyllanthus securinegoides</i>	100	270	22968
Phys-30d	<i>Phyllanthus securinegoides</i>	30	239	26975
Phys-30e	<i>Phyllanthus securinegoides</i>	30	161	26280
Phys-30f	<i>Phyllanthus securinegoides</i>	30	172	33595
Phyb-600	<i>Phyllanthus balgooyi</i>	600	165	14082
Phyb-400	<i>Phyllanthus balgooyi</i>	400	280	13479
Phyb-200	<i>Phyllanthus balgooyi</i>	200	175	5732
Phyb-30	<i>Phyllanthus balgooyi</i>	30	150	7344

Sur la base des informations phylogénétiques, une analyse en coordonnées principales (PCoA) a été établie pour comparer les échantillons entre eux *via* la méthode "Unweighted UniFrac". Cette méthode utilise les informations phylogénétiques pour comparer des échantillons et expliquer les différences entre les communautés bactériennes (Lozupone *et al.*, 2011). Dans cette analyse (Figure 20), les grandes ellipses indiquent une communauté bactérienne plus diverse et les chevauchements entre les ellipses représentent une communauté partagée entre les différents échantillons (Schloss, 2008). Cette analyse permet de mettre en évidence un effet du site de prélèvement, quelles que soient les espèces végétales collectées et leur âge, supérieur à un éventuel effet âge, pour une même espèce d'un site donné. En effet, en prenant pour exemple *P. balgooyi* sur le site 02 (en vert), l'arbre le plus grand échantillonné (Phyb-600) possède une diversité bactérienne proche de l'arbre le plus petit (Phyb-30), les deux échantillons étant proches sur l'analyse PCoA. La même proximité peut se visualiser pour les échantillons de *R. bengalensis* prélevés sur le site 10 (en rose), avec un regroupement sur le plan principal du plus grand spécimen prélevé (Rinb-500) avec un des plus petits et donc plus jeunes (Rinb-30a). L'âge des plantes échantillonnées semble donc avoir une faible influence sur les communautés bactériennes en comparaison des paramètres physico-chimiques et topographiques propres à chaque site.

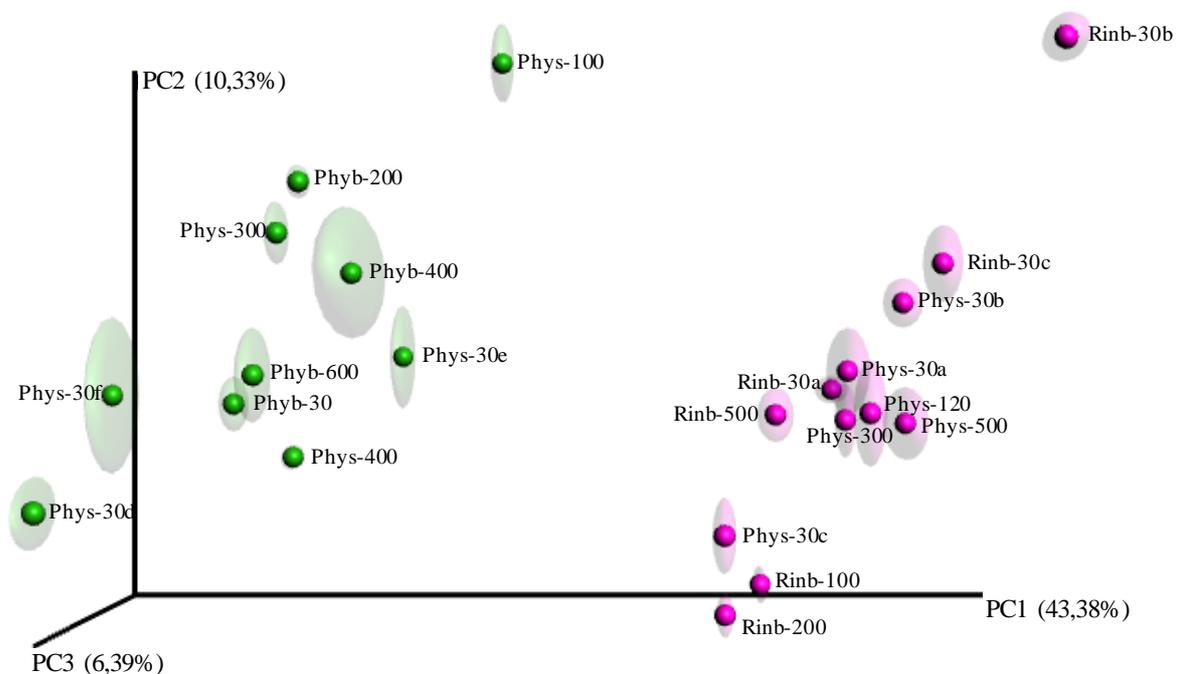


Figure 20 : Analyse en coordonnées principales (PCoA) en 3D fondée sur la métrique de phylogénie Unweighted UniFrac des terres rhizosphériques de plantes d'âges différents prélevées sur le site 02 (en vert) et le site 10 (en rose)

2.4. Les facteurs influençant la diversité bactérienne

Des corrélations de Spearman ont été calculées entre l'abondance relative des dix phyla majoritaires et les paramètres abiotiques des terres rhizosphériques (Figure 21). Seules les corrélations significatives ($p < 0,1$) ont été retenues. Le Ni extractible au DTPA est corrélé positivement avec les phyla des *Firmicutes* ($p = 0,003$), *Gemmatimonadetes* ($p = 0,012$), *Latescibacteria* ($p = 0,007$), *Planctomycetes* ($p = 0,003$), *Rokubacteria* ($p = 0,002$) mais négativement avec les *Chloroflexi* ($p = 0,046$) et *Proteobacteria* ($p = 0,009$). Il est intéressant de constater que lorsque ces différents phyla sont corrélés positivement avec le Ni-DTPA, leur corrélation est par contre négative avec l'altitude, et inversement. En plus de leur corrélation positive avec le Ni extractible au DTPA, les *Gemmatimonadetes* et *Rokubacteria*, phyla dont les abondances relatives sont les plus élevées dans les rhizosphères de *R. bengalensis* en comparaison à celles des autres espèces, montrent le même type de corrélations avec les autres paramètres physico-chimiques. Ces deux phyla sont, en effet, corrélés positivement avec le pH ($p < 0,001$ et $p = 0,013$) et le Mg échangeable ($p = 0,038$ et $p = 0,021$), mais sont corrélés négativement avec le Co ($p < 0,001$ et $p = 0,023$) et Cu ($p < 0,001$ et $p = 0,010$) extractibles au DTPA et l'altitude ($p = 0,019$ et $p = 0,019$). Le C et C organique sont corrélés positivement avec les *Bacteroidetes* ($p = 0,015$ et $p = 0,007$), *Firmicutes* ($p < 0,001$ et $p < 0,001$) et *Proteobacteria* ($p = 0,069$ et $p = 0,069$) alors que les autres phyla sont globalement corrélés négativement avec ces paramètres.

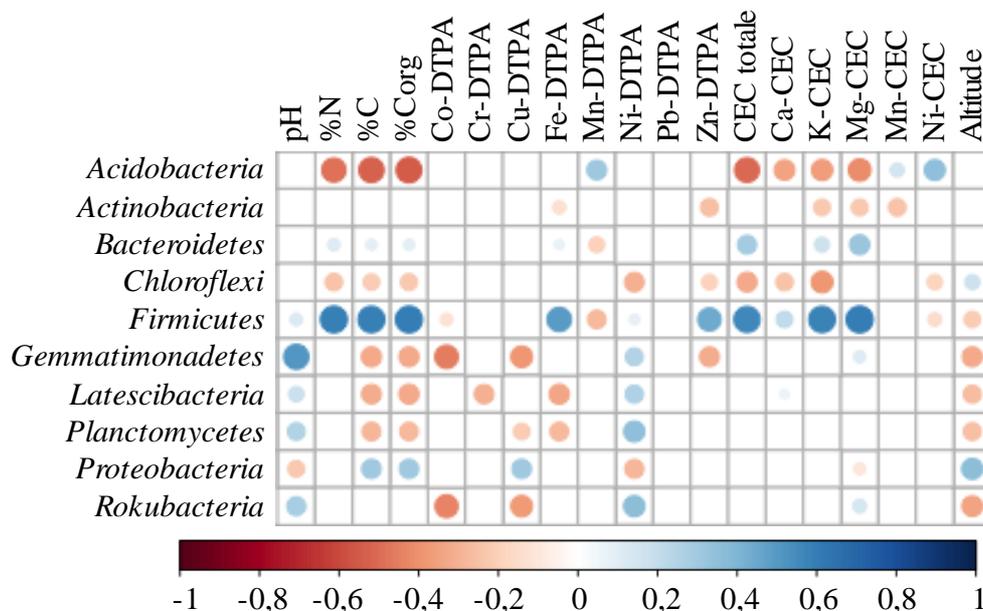


Figure 21 : Matrice de corrélations entre les paramètres abiotiques et les dix phyla bactériens majoritaires

basée sur le coefficient de corrélation r de Spearman, les blancs correspondent à un coefficient non significatif ($p > 0,1$), %N : % d'azote total, %C : % de carbone total, %Corg : % de C organique, xx-DTPA : éléments extractibles au DTPA, XX-CEC : éléments échangeables

Pour cerner quel est le déterminisme de la diversité bactérienne rhizosphérique de plantes collectées en Malaise, une analyse de partition de variance (VPA) a été effectuée entre le jeu de données des OTUs et les données abiotiques (pH, éléments échangeables, métaux extractibles au DTPA, Corg - 13 variables), les données topographiques des sites de prélèvements (altitude et exposition - 2 variables) et les différentes espèces de plantes (15 espèces différentes). Suite à cette analyse (Figure 22), il ressort que 49% de la variabilité de la diversité bactérienne de nos échantillons est expliquée par l'ensemble de ces 3 types de données, avec 51% de cette variabilité non expliquée (résidus). Ce sont les données abiotiques des terres rhizosphériques qui permettent d'expliquer au mieux la diversité bactérienne des échantillons, avec d'une part, 15% d'explication spécifiquement liée à ces variables physico-chimiques et d'autre part, 38% d'explication si l'on considère l'influence des paramètres abiotiques en association avec les autres variables. Ainsi, la diversité bactérienne rhizosphérique des plantes hyperaccumulatrices de Ni prélevées en Malaisie est expliquée à 76% par les données physico-chimiques des terres, en association avec les deux autres types de variables. Les données topographiques expliquent seules 10% de la diversité bactérienne et 28%, associées aux autres variables. Enfin, l'espèce de plante n'a qu'une faible influence : 1,5% considérée seule contre 11% en association avec les autres paramètres.

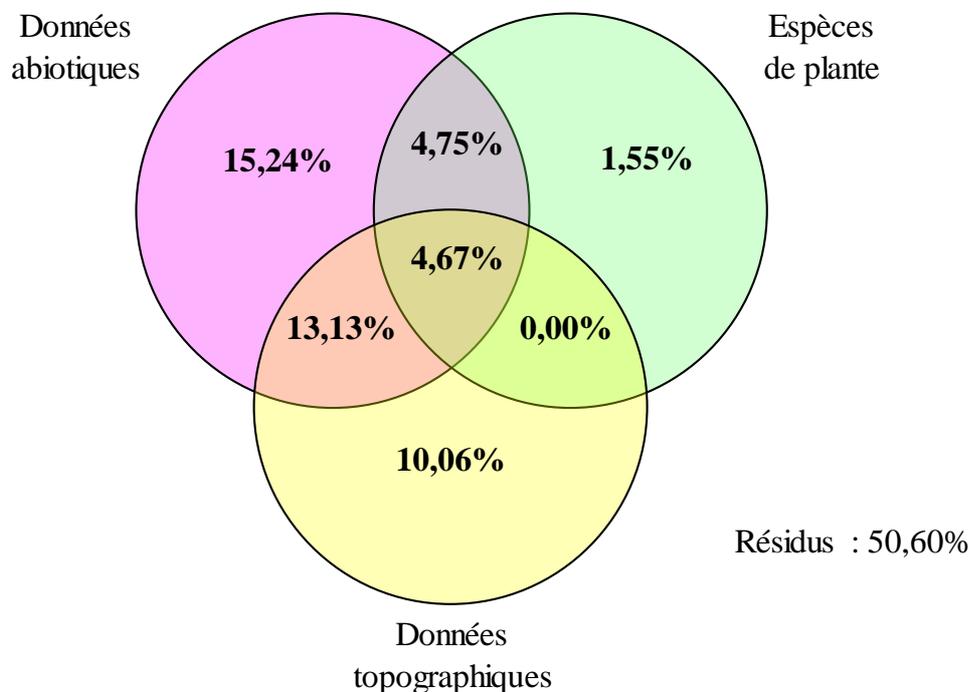


Figure 22 : Analyse de partition de la variance bactérienne au niveau OTUs en fonction des données abiotiques, topographiques et de l'espèce de plante

3. La diversité des communautés bactériennes en climat tropical humide (Indonésie)

3.1. Caractérisation des échantillons

3.1.1. Les sites sélectionnés

Quarante-cinq plantes hyperaccumulatrices et leur terre rhizosphérique ont été échantillonnées (Tableau 32) sur les 15 sites retenus (Figure 23).

Tableau 32 : Sites, espèces et codes des plantes hyperaccumulatrices prélevées

Site	Appellation	Altitude (m)	Plantes et codes
01	Casuarina site 1	209	<i>Macaranga</i> sp. (Mac-01), <i>P. roxburghioides</i> (Pla-01), <i>R. aff. bengalensis</i> (Rin-01)
02	Casuarina site 2	0	<i>R. aff. bengalensis</i> (Rin-02)
03	Casuarina	205	<i>F. trachypison</i> (Fic-03), <i>T. morotaiense</i> (Tri-03)
04	Before Casuarina	204	<i>F. trachypison</i> (Fic-04a, Fic-04b, Fic-04c), <i>G. moluccanum</i> (Glo-04), <i>P. roxburghioides</i> (Pla-04), <i>Prunus</i> sp. (Pru-04), <i>T. morotaiense</i> (Tri-04)
05	Doro Mesmesan	157	<i>T. morotaiense</i> (Tri-05)
06	Woi Mioseng	45	<i>R. aff. bengalensis</i> (Rin-06), <i>T. morotaiense</i> (Tri-06)
07	Bukit Limber area	981	<i>T. morotaiense</i> (Tri-07)
08	Bukit Limber KM3	183	<i>F. trachypison</i> (Fic-08), <i>P. roxburghioides</i> (Pla-08a, Pla-08b), <i>T. morotaiense</i> (Tri-08)
09	Sake River	80	<i>F. trachypison</i> (Fic-09a, Fic-09b), <i>Macaranga</i> sp. (Mac-09), <i>T. morotaiense</i> (Tri-09a, Tri-09b)
10	Sake South	100	<i>Aristolchia</i> sp. (Ari-10), <i>C. floribunda</i> (Cer-10a, Cer-10b), <i>Macaranga</i> sp. (Mac-10), <i>R. aff. bengalensis</i> (Rin-10a, Rin-10b)
11	Sake West	191	<i>F. trachypison</i> (Fic-11)
12	Uni Uni	239	<i>G. moluccanum</i> (Glo-12)
13	Tanjung Ulie	18	<i>Barringtonia</i> sp. (Bar-13), <i>C. floribunda</i> (Cer-13), <i>F. trachypison</i> (Fic-13a, Fic-13b), <i>P. roxburghioides</i> (Pla-13), <i>R. aff. bengalensis</i> (Rin-13a, Rin-13b), <i>T. morotaiense</i> (Tri-13a, Tri-13b)
14	Location 2A	179	<i>R. aff. bengalensis</i> (Rin-14)
15	Location 2C	89	<i>T. morotaiense</i> (Tri-15)

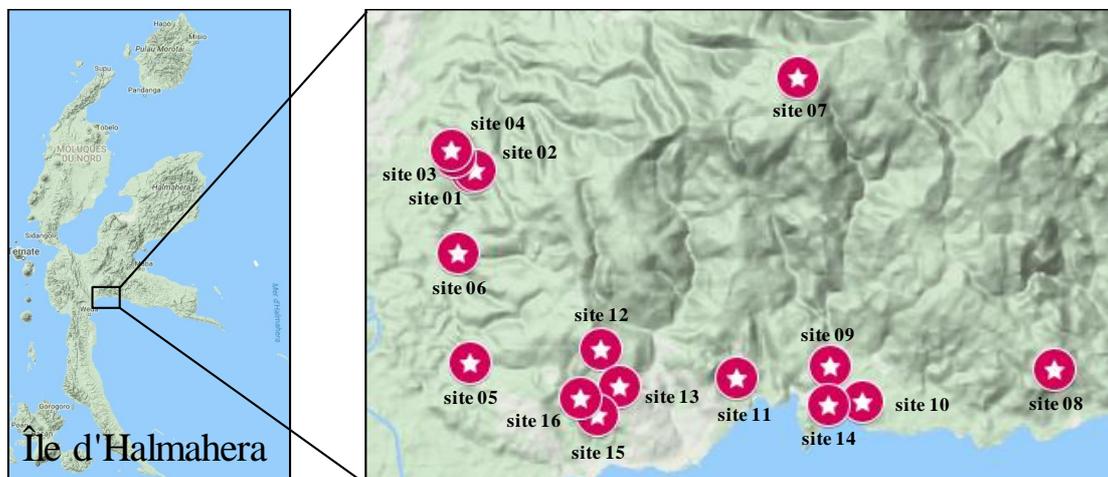


Figure 23 : Carte géographique des 15 sites de prélèvements

Les paramètres abiotiques des terres rhizosphériques ont été mesurés (Tableau 33 à Tableau 37). Pour l'ensemble de ces tableaux, il n'a pas été possible de réaliser de tests statistiques afin de comparer les moyennes des valeurs car pour de nombreux sites, nous n'avions réalisé qu'un seul prélèvement.

La gamme de pH des terres collectées varie de 5,7 à 8,2 avec un pH moyen de 6,7 (Tableau 33). Les terres rhizosphériques sont bien pourvues en C avec un rapport Corg/N de 12 en moyenne ; le C organique correspond en moyenne à 89% du C total, hormis sur le site 05 (10,3% du C total).

Tableau 33 : pH, N et C totaux et C organique des terres rhizosphériques
la moyenne et l'écart type sont donnés pour les répétitions, n correspond au nombre d'échantillons

Site	n	pH	%N	%C	%Corg
01	3	6,39 ± 0,33	0,43 ± 0,11	6,02 ± 1,49	5,42 ± 1,06
02	1	7,54	0,57	8,37	7,98
03	2	6,87 ± 0,03	0,21 ± 0,14	2,79 ± 1,89	2,62 ± 1,65
04	7	6,69 ± 0,68	0,25 ± 0,28	3,82 ± 4,23	3,57 ± 3,98
05	1	6,66	0,62	8,79	8,69
06	2	6,74 ± 0,17	0,46 ± 0,07	6,21 ± 0,73	5,54 ± 0,37
07	1	6,66	0,65	10,24	7,9
08	4	6,42 ± 0,26	0,53 ± 0,08	7,22 ± 1,26	6,44 ± 0,97
09	5	6,43 ± 0,39	0,55 ± 0,09	7,75 ± 1,55	6,74 ± 1,38
10	6	6,72 ± 0,61	0,46 ± 0,1	6,06 ± 0,91	5,23 ± 0,58
11	1	6,63	0,39	4,8	4,51
12	1	6,36	0,52	8,17	6,99
13	9	6,97 ± 0,64	0,30 ± 0,2	4,86 ± 3,16	3,53 ± 2,28
14	1	6,81	0,12	1,53	1,42
15	1	7,91	0,16	3,51	2,75

Concernant les éléments totaux (Tableau 34 et Tableau 35), ces terres sont caractérisées en moyenne par de fortes teneurs en Fe (233 mg g^{-1}), Mg (32 mg g^{-1}) et Al (18 mg g^{-1}) et en ETM, tels le Ni ($7,0 \text{ mg g}^{-1}$) et le Cr ($1,7 \text{ mg g}^{-1}$). Le rapport Ca/Mg est inférieur à 1 à l'exception des sites 05 (rapport de 34) et 11 (rapport de 1,1).

Tableau 34 : Eléments totaux des terres rhizosphériques

la moyenne et l'écart type sont donnés pour les répétitions, n correspond au nombre d'échantillons

Site	n	Al (mg g^{-1})	Ca (mg g^{-1})	Fe (mg g^{-1})	K ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Mg (mg g^{-1})	Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	P (mg g^{-1})
01	3	$14 \pm 0,00$	$2,52 \pm 1,28$	156 ± 126	425 ± 529	35 ± 38	161 ± 35	$3,4 \pm 3,0$
02	1	22	14	45	218	26	107	0,8
03	2	$12 \pm 0,00$	$1,8 \pm 0,81$	310 ± 84	430 ± 298	$76 \pm 2,48$	96 ± 34	$3,8 \pm 0,49$
04	7	$27 \pm 0,00$	$0,31 \pm 0,20$	313 ± 21	73 ± 43	$4,7 \pm 3,1$	116 ± 38	$4,0 \pm 2,8$
05	1	14	395	19	91	12	174	0,28
06	2	$8,5 \pm 0,00$	$5,1 \pm 0,17$	$73 \pm 1,1$	178 ± 15	$124 \pm 3,1$	156 ± 14	$1,0 \pm 0,05$
07	1	53	0,22	305	48	12	374	1,6
08	4	$11 \pm 0,00$	$4,5 \pm 2,8$	155 ± 27	114 ± 86	46 ± 21	141 ± 51	$3,4 \pm 0,59$
09	5	$15 \pm 0,00$	$0,78 \pm 0,32$	259 ± 35	141 ± 79	57 ± 50	115 ± 54	$5,0 \pm 2,0$
10	6	$16 \pm 0,00$	$1,1 \pm 0,56$	260 ± 37	118 ± 42	14 ± 10	337 ± 26	$6,9 \pm 2,0$
11	1	52	1,5	244	101	1,4	168	2,8
12	1	10	8,7	216	184	27	111	4,3
13	9	$18 \pm 0,00$	$1,8 \pm 1,2$	284 ± 55	65 ± 38	18 ± 13	248 ± 67	$3,3 \pm 0,92$
14	1	5,8	2,7	109	151	22	128	8,9
15	1	20	35	77	860	87	137	1,4

Tableau 35 : Eléments traces métalliques totaux des terres rhizosphériques

la moyenne et l'écart type sont donnés pour les répétitions, n correspond au nombre d'échantillons

Site	n	Co ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cr (mg g^{-1})	Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Ni (mg g^{-1})	Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)
01	3	397 ± 170	$1,3 \pm 0,16$	21 ± 12	$4,0 \pm 3,3$	107 ± 59
02	1	387	1,9	30	0,49	32
03	2	543 ± 145	$2,1 \pm 0,38$	$24 \pm 6,6$	$10,5 \pm 1,9$	265 ± 45
04	7	315 ± 217	$2,1 \pm 0,88$	32 ± 12	$7,1 \pm 1,0$	259 ± 22
05	1	486	1,4	20	0,33	18
06	2	523 ± 64	$1,9 \pm 1,0$	22 ± 15	$2,2 \pm 0,07$	$61 \pm 1,5$
07	1	463	1,8	16	4,3	182
08	4	540 ± 188	$1,9 \pm 0,64$	31 ± 11	$5,2 \pm 0,19$	$103 \pm 7,4$
09	5	519 ± 157	$1,6 \pm 0,48$	28 ± 16	$13 \pm 3,8$	269 ± 36
10	6	413 ± 363	$1,1 \pm 0,40$	$22 \pm 7,4$	$10 \pm 2,2$	262 ± 44
11	1	402	2,5	41	4,9	171
12	1	157	4,2	27	5,3	144
13	9	446 ± 295	$1,2 \pm 0,56$	21 ± 12	$7,0 \pm 1,7$	230 ± 45
14	1	368	3,7	11	2,9	67
15	1	89	0,44	32	1,8	80

Les éléments les plus disponibles (extractibles au DTPA) (Tableau 36) dans les terres rhizosphériques sont le Ni ($232 \mu\text{g g}^{-1}$), le Fe ($63 \mu\text{g g}^{-1}$) et le Mn ($54 \mu\text{g g}^{-1}$). Bien que le Cr soit présent dans les rhizosphères, il est par contre faiblement disponible ($< 1 \mu\text{g g}^{-1}$).

Tableau 36 : Métaux extractibles au DTPA des terres rhizosphériques

la moyenne et l'écart type sont donnés pour les répétitions, n correspond au nombre d'échantillons

Site	n	Al ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Co ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Ni ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)
01	3	$3,2 \pm 3,3$	$4,9 \pm 6,3$	93 ± 36	60 ± 70	288 ± 243	$2,8 \pm 1,2$
02	1	15	1,1	199	24	92	1,8
03	2	$0,11 \pm 0,01$	$1,3 \pm 0,11$	$23 \pm 0,17$	$12 \pm 0,03$	128 ± 13	$2,2 \pm 0,01$
04	7	$5,6 \pm 2,3$	16 ± 17	41 ± 32	83 ± 63	91 ± 95	$2,5 \pm 2,2$
05	1	0,07	0,04	8,2	2,8	3,9	0,25
06	2	$0,23 \pm 0,03$	$1,1 \pm 0,16$	$95 \pm 0,02$	$17 \pm 2,2$	138 ± 22	$1,7 \pm 0,38$
07	1	10	1,1	51	8,2	27	0,49
08	4	$0,51 \pm 0,60$	$2,7 \pm 1,9$	84 ± 12	44 ± 27	266 ± 107	$2,4 \pm 0,81$
09	5	$1,6 \pm 2,5$	18 ± 24	64 ± 15	56 ± 72	271 ± 134	$3,2 \pm 0,64$
10	6	$1,6 \pm 2,6$	13 ± 11	46 ± 19	76 ± 80	469 ± 242	$4,9 \pm 1,7$
11	1	14	17	89	147	69	1,6
12	1	0,52	1,8	85	14	404	3,9
13	9	$3,5 \pm 3,4$	14 ± 11	47 ± 14	53 ± 40	259 ± 128	$4,0 \pm 0,82$
14	1	0,67	1,7	242	25	215	2,2
15	1	<LQ	0,34	18	8,8	25	1,1

La CEC totale moyenne est de $19 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$ avec de plus fortes valeurs pour les sites 05 et 08 (43 et $39 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$, respectivement) en comparaison des sites 15 ($41 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$) et 08 ($37 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$) (Tableau 37). Les valeurs des différents éléments échangeables sont relativement basses, à l'exception du Ca ($5,7 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$) et du Mg ($1,2 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$). Le site 05 possède une forte quantité de Ca échangeable ($25 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$).

Tableau 37 : CEC totale et éléments échangeables des terres rhizosphériques

la moyenne et l'écart type sont donnés pour les répétitions, n correspond au nombre d'échantillons

Site	n	CEC totale ($\text{cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$)	Ca ($\text{cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$)	K ($\text{cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$)	Mg ($\text{cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$)	Mn ($\text{cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$)	Ni ($\text{cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$)
01	3	$21 \pm 4,3$	$2,8 \pm 1,7$	$0,02 \pm 0,01$	$1,5 \pm 0,50$	$0,02 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,02$
02	1	29	4,8	0,03	2,1	0,02	0,01
03	2	$12 \pm 0,29$	$5,9 \pm 4,1$	$0,01 \pm 0,00$	$0,59 \pm 0,25$	$0,00 \pm 0,00$	$0,01 \pm 0,00$
04	7	$7,8 \pm 9,0$	$0,53 \pm 0,33$	$0,01 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,17$	$0,03 \pm 0,04$	$0,02 \pm 0,02$
05	1	24	25	0,01	0,09	0,00	0,00
06	2	$22 \pm 1,9$	$1,5 \pm 0,74$	$0,01 \pm 0,00$	$2,0 \pm 0,30$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
07	1	17	0,30	0,01	0,47	0,00	0,00
08	4	37 ± 10	$20 \pm 7,2$	$0,02 \pm 0,01$	$2,6 \pm 0,45$	$0,01 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,02$
09	5	23 ± 15	$2,4 \pm 0,70$	$0,03 \pm 0,02$	$1,4 \pm 1,1$	$0,05 \pm 0,08$	$0,05 \pm 0,02$
10	6	$15 \pm 6,3$	$3,4 \pm 2,2$	$0,02 \pm 0,01$	$1,3 \pm 0,88$	$0,03 \pm 0,02$	$0,05 \pm 0,04$
11	1	19	2,7	0,02	0,12	0,02	0,01
12	1	19	6,3	0,03	3,9	0,01	0,04
13	9	$18 \pm 8,2$	$5,4 \pm 3,8$	$0,02 \pm 0,01$	$0,98 \pm 0,58$	$0,02 \pm 0,03$	$0,03 \pm 0,02$
14	1	29	5,4	0,03	2,1	0,01	0,01
15	1	41	26	0,02	2,2	0,00	0,00

3.1.2. L'hyperaccumulation du Ni par les plantes échantillonnées

Toutes espèces de plantes confondues, les concentrations les plus élevées observées dans les feuilles et tiges concernent le Ca (17 et 15 mg g⁻¹), le K (9,8 et 8,1 mg g⁻¹) et le Mg (5,9 et 2,8 mg g⁻¹) (0). Le Ca est fortement concentré dans les écorces de *P. roxburghioides* (41 mg g⁻¹), *R. aff. bengalensis* (52 mg g⁻¹) et *Macacaranga* sp. (58 mg g⁻¹).

Tableau 38 : Macronutriments des différentes parties des plantes hyperaccumulatrices
 la moyenne est suivie par le rang pour les répétitions, n correspond au nombre d'échantillons,
 Ari : *Aristolochia* sp., Bar : *Barringtonia* sp., Cer : *C. floribunda*, Fic : *F. trachypison*,
 Glo : *G. moluccanum*, Mac : *Macaranga* sp., Pla : *P. roxburghioides*, Pru : *Prunus* sp.,
 Rin : *R. aff. bengalensis*, Tri : *T. morotaiense*

Plante	Partie	n	Ca (mg g ⁻¹)	K (mg g ⁻¹)	Mg (mg g ⁻¹)	P (µg g ⁻¹)	S (µg g ⁻¹)
Ari	Feuilles	3	17 [16–19]	20 [18–22]	10 [9,6–11]	622 [499–763]	6561 [4918–7802]
	Tiges	1	12	20	3,7	430	767
	Racines	1	6,7	28	5,9	461	676
Bar	Feuilles	1	22	9,7	4,1	568	1431
	Tiges	1	21	16	2,6	615	762
	Ecorce	1	35	5,0	2,7	283	755
	Bois	1	11	2,0	1,4	214	363
Cer	Feuilles	1	9,6	2,3	1,7	175	459
	Racines	1	9,6	2,3	1,7	175	459
Cer	Feuilles	4	13 [10–17]	14 [11–20]	5,8 [4,4–8,1]	783 [536–894]	1557 [1218–1845]
	Tiges	3	6,1 [5,5–6,5]	15 [9,6–19]	5,1 [2,9–6,2]	533 [415–725]	833 [549–1026]
	Ecorce	2	10 [7,0–14]	8,2 [3,0–13]	3,9 [2,5–5,4]	297 [267–327]	406 [314–499]
	Bois	3	2,3 [1,5–3,2]	2,9 [1,8–3,5]	1,7 [1,2–2,1]	104 [100–111]	172 [<LQ–327]
	Racines	3	2,1 [1,6–2,8]	2,3 [1,2–3,0]	3,7 [1,7–5,6]	181 [165–208]	382 [268–603]
Fic	Feuilles	11	17 [8,2–26]	4,7 [1,3–10]	8,5 [1,3–18]	429 [283–598]	1843 [932–3 962]
	Fruits	6	7,9 [2,9–11]	8,7 [3,1–14]	5,0 [2,2–7,9]	1275 [646–1695]	1115 [459–2 111]
	Tiges	10	15 [2,9–32]	5,0 [1,4–9,9]	2,8 [1,4–3,9]	735 [210–2253]	1327 [676–2065]
	Ecorce	5	26 [15–44]	4,1 [0,8–11]	1,9 [0,8–3,1]	242 [223–290]	487 [448–556]
	Bois	7	8,7 [4,5–19]	1,4 [0,5–3,8]	1,0 [0,8–1,3]	130 [84–201]	372 [203–528]
	Racines	8	13 [3,8–29]	2,2 [1,6–4,3]	1,7 [0,5–4,7]	161 [100–282]	290 [<LQ–439]
	Feuilles	2	11 [9,5–12]	11 [10–12]	5,6 [2,0–9,3]	351 [272–430]	1682 [1419–1945]
	Tiges	2	6,0 [4,5–7,5]	12 [11–12]	3,9 [3,1–4,7]	380 [287–474]	1237 [897–1576]
Glo	Bois	2	6,5 [4,9–8,0]	3,1 [2,7–3,4]	2,0 [1,1–3,0]	107 [68–146]	539 [473–605]
	Racines	2	4,5 [3,5–5,5]	2,0 [1,5–2,5]	1,7 [1,5–1,9]	110 [102–118]	567 [469–665]
Mac	Feuilles	2	24 [12–37]	6,1 [4,7–7,5]	4,7 [2,6–6,9]	315 [265–366]	1688 [1458–1919]
	Tiges	1	28	2,2	1,7	86	428
	Ecorce	1	58	6,5	0,8	163	778
	Racines	1	17	1,6	0,9	97	520
Pla	Feuilles	4	28 [16–36]	9,0 [4,9–11]	4,6 [3,6–6,2]	437 [405–512]	2311 [2027–2859]
	Fruits	2	11 [6,7–14]	9,9 [6,2–13]	1,5 [0,9–2,0]	666 [496–836]	1235 [945–1525]
	Tiges	4	20 [2,3–29]	9,1 [3,9–19]	1,6 [0,6–3,8]	305 [114–518]	1152 [769–1401]
	Ecorce	3	41 [35–46]	5,7 [2,1–9,9]	0,9 [0,8–1,1]	219 [163–324]	1295 [1173–1513]
	Bois	4	5,6 [1,0–8,9]	1,7 [1,2–2,7]	0,3 [0,2–0,4]	115 [36–303]	386 [216–553]
	Racines	4	11 [6,2–19]	2,7 [0,7–4,4]	1,3 [1,0–1,7]	177 [67–406]	706 [455–929]
Pru	Feuilles	1	12	12	5,4	355	1854
	Bois	1	8,5	2,6	2,3	104	376
	Racines	1	7,4	3,3	4,6	119	657
Rin	Feuilles	8	20 [17–24]	12 [7,0–17]	3,6 [1,4–6,0]	750 [582–907]	4021 [3266–4758]
	Tiges	7	24 [16–37]	8,3 [3,1–11]	1,6 [1,2–2,4]	482 [361–635]	1323 [937–1615]
	Ecorce	6	52 [42–61]	7,7 [5,9–9,3]	1,4 [0,7–2,8]	304 [241–460]	815 [636–976]
	Bois	8	13 [4,4–17]	3,6 [1,9–6,3]	0,7 [0,5–1,0]	158 [75–235]	579 [257–738]
	Racines	8	11 [4,3–17]	3,9 [2,9–5,0]	2,5 [0,9–8,4]	214 [119–326]	809 [666–1302]
Tri	Feuilles	14	14 [8,7–29]	9,6 [4,9–18]	5,0 [3,0–7,1]	482 [265–750]	2125 [1633–2949]
	Fruits	5	6,3 [3,0–11]	11 [8,1–16]	2,3 [1,4–3,2]	263 [64–925]	544 [374–922]
	Tiges	14	11 [5,2–23]	7,0 [1,4–16]	3,1 [1,1–5,1]	348 [154–890]	719 [522–1032]
	Ecorce	12	8,6 [4,2–18]	4,3 [1,5–7,4]	1,7 [0,9–2,8]	105 [57–161]	336 [275–386]
	Bois	14	4,0 [0,7–9,5]	2,6 [0,4–9,8]	1,5 [0,8–2,4]	92 [<LQ–263]	249 [<LQ–499]
	Racines	14	7,5 [1,7–20]	2,8 [0,8–7,5]	4,5 [1,5–14]	224 [67–714]	440 [183–601]

Les espèces de plantes telles *Barringtonia* sp., *C. cf. floribunda* et *Prunus* sp. possèdent des concentrations en Ni, retrouvées dans leurs feuilles, inférieures à 1 000 $\mu\text{g g}^{-1}$ (0). A l'inverse, *Aristolchia* sp., *G. moluccanum*, *P. roxburghioides* et *R. aff. bengalensis* présentent des teneurs en Ni très élevées dans leurs feuilles, quel que soit le site d'échantillonnage. Les concentrations en Ni dans ces plantes hyperaccumulatrices suivent l'ordre : feuilles > écorce > tiges > fruits > racines > bois. Certains spécimens de *F. trachypison*, *Macaranga* sp. et *T. morotaiense* pourraient être considérés comme hyperaccumulateurs de Ni, mais ce caractère semble très variable chez ces espèces selon les individus avec parfois des concentrations inférieures à 1 000 $\mu\text{g g}^{-1}$ mesurées dans leurs feuilles (11 $\mu\text{g g}^{-1}$ pour *F. trachypison*, 414 $\mu\text{g g}^{-1}$ pour *Macaranga* sp. et 8 $\mu\text{g g}^{-1}$ pour *T. morotaiense*). Enfin, *R. aff. bengalensis* pourrait être considéré comme hyperaccumulateur de Co du fait d'une concentration de 575 $\mu\text{g g}^{-1}$ mesurée dans ses feuilles.

Tableau 39 : Micronutriments des différentes parties des plantes hyperaccumulatrices
 la moyenne est suivie par le rang pour les répétitions, n correspond au nombre d'échantillons,
 Ari : *Aristolochia* sp., Bar : *Barringtonia* sp., Cer : *C. floribunda*, Fic : *F. trachypison*,
 Glo : *G. moluccanum*, Mac : *Macaranga* sp., Pla : *P. roxburghioides*, Pru : *Prunus* sp.,
 Rin : *R. aff. bengalensis*, Tri : *T. morotaiense*

Plante	Partie	n	Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Co ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Ni ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Ari	Feuilles	3	44 [42–48]	189 [145–232]	83 [62–94]	<LQ	1989 [1212–2853]
	Tiges	1	992	148	264	7,4	824
	Racines	1	<LQ	29	77	<LQ	354
Bar	Feuilles	1	44	27	15	61	229
	Tiges	1	224	53	28	20	136
	Ecorce	1	259	25	14	13	79
	Bois	1	63	5,7	5,9	5,6	83
Cer	Racines	1	4 561	55	13	23	294
	Feuilles	4	46 [38–61]	602 [234–1320]	12 [10–15]	0,5 [<LQ–1,9]	67 [25–104]
	Tiges	3	137 [41–320]	948 [197–2141]	46 [42–50]	1,2 [<LQ–3,5]	35 [29–41]
Fic	Ecorce	2	810 [99–1521]	188 [134–243]	31 [18–44]	5,2 [<LQ–10]	52 [18–87]
	Bois	3	19 [<LQ–37]	104 [21–238]	14 [11–16]	<LQ	11 [9,4–14]
	Racines	3	13896 [6948–18183]	306 [202–406]	28 [13–39]	42 [15–64]	583 [128–944]
	Feuilles	11	81 [23–140]	158 [17–495]	38 [11–105]	6,8 [<LQ–29]	260 [11–1 56]
	Fruits	6	6885 [21–40761]	162 [19–406]	31 [21–46]	15 [<LQ–58]	276 [41–793]
Glo	Tiges	10	55 [<LQ–115]	45 [3,8–177]	22 [6,8–59]	7,1 [<LQ–30]	156 [16–534]
	Ecorce	5	134 [23–485]	64 [13–142]	24 [10–39]	9,1 [<LQ–30]	38 [10–90]
	Bois	7	78 [<LQ–235]	28 [3,3–91]	6,7 [<LQ–24]	3,7 [<LQ–14]	43 [3,9–158]
	Racines	8	9106 [2219–29568]	150 [50–422]	19 [7,8–36]	32 [4,8–87]	370 [135–943]
	Feuilles	2	35 [30–40]	556 [56–1056]	79 [67–90]	21 [20–21]	3203 [1 392–5014]
Mac	Tiges	2	51 [33–69]	268 [56–481]	154 [144–165]	15 [14–16]	1204 [429–1979]
	Bois	2	19 [<LQ–38]	110 [11–209]	103 [71–136]	3,9 [2,4–5,4]	335 [187–483]
	Racines	2	24122 [1711–46532]	1042 [58–2025]	57 [25–89]	211 [6,9–415]	814 [370–1259]
	Feuilles	2	49 [27–71]	2373 [664–4082]	22 [16–29]	48 [2,7–93]	737 [414–1060]
Pla	Tiges	1	<LQ	2 466	48	20	435
	Ecorce	1	42	2 268	8,7	6,2	91
	Racines	1	2138	655	15	30	198
	Feuilles	4	48 [33–84]	272 [120–424]	102 [58–127]	53 [20–139]	15020 [8310–18760]
Pru	Fruits	2	<LQ	104 [38–169]	22 [15–30]	1,4 [<LQ–2,9]	2722 [1685–3759]
	Tiges	4	34 [<LQ–52]	44 [16–95]	34 [19–50]	7,5 [2,9–18]	3889 [1654–5918]
	Ecorce	3	91 [29–190]	58 [23–125]	49 [36–71]	3,2 [<LQ–6,1]	3989 [1920–6058]
	Bois	4	30 [<LQ–74]	18 [6,1–30]	13 [<LQ–28]	0,6 [<LQ–2,3]	882 [186–1829]
	Racines	4	3253 [855–7870]	227 [35–661]	31 [23–49]	26 [3–60]	1798 [584–2292]
Rin	Feuilles	1	36	402	73	<LQ	636
	Bois	1	29	153	87	2,3	168
	Racines	1	1 716	238	202	17	384
	Feuilles	8	58 [39–99]	217 [70–400]	141 [94–217]	120 [12–575]	14980 [10728–22178]
	Tiges	7	62 [23–149]	59 [19–108]	126 [87–196]	30 [5,5–93]	8254 [3649–12045]
Tri	Ecorce	6	312 [28–939]	141 [30–441]	335 [163–434]	33 [10–74]	9065 [2685–13944]
	Bois	8	41 [<LQ–128]	31 [6,9–48]	80 [12–199]	7,8 [<LQ–23]	2571 [911–5043]
	Racines	8	4335 [1572–8565]	141 [91–249]	183 [98–252]	30 [7,9–94]	3744 [2320–6679]
	Feuilles	14	86 [32–346]	278 [25–1443]	34 [16–60]	39 [1,2–132]	1684 [8,1–5179]
Tri	Fruits	5	29 [21–41]	96 [8,4–269]	17 [12–28]	5,9 [<LQ–17]	213 [8,1–371]
	Tiges	14	49 [<LQ–133]	95 [5,3–509]	33 [10–69]	4,3 [<LQ–17]	334 [8,5–940]
	Ecorce	12	148 [<LQ–670]	42 [2,9–104]	7,0 [<LQ–14]	1,5 [<LQ–8,2]	91 [6,8–174]
	Bois	14	62 [<LQ–467]	39 [<LQ–198]	6,1 [<LQ–19]	0,5 [<LQ–3,9]	72 [<LQ–183]
	Racines	14	6333 [180–17509]	142 [5,8–302]	15 [<LQ–25]	22 [<LQ–77]	309 [7,0–726]

Les facteurs de bioconcentrations (Tableau 40) et de transfert (Tableau 41) ont été calculés pour les échantillons prélevés. Seules les plantes, pour lesquelles au moins 3 prélèvements avaient été effectués, ont été conservées pour le calcul de ces indices, permettant de réaliser des tests statistiques.

C. floribunda possède le meilleur BCF (facteur de 128), statistiquement plus élevé que ceux de *T. morotaiense* (facteur de 21), *R. aff. bengalensis* (facteur de 10) et *P. roxburghoides* (facteur de 21). Néanmoins, c'est *P. roxburghoides* qui possède le meilleur TF (facteur de 9,5), statistiquement plus élevé que ceux de *C. floribunda* (facteur de 0,2) et *F. trachypison* (facteur de 0,7).

Tableau 40 : Facteur de bioconcentration (BCF) des hyperaccumulateurs

la moyenne et l'écart type sont donnés pour les répétitions, n correspond au nombre d'échantillons, les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à $p = 0,05$ (TukeyHSD test)

Plante	n	BCF
<i>C. floribunda</i>	3	128 ± 133 a
<i>F. trachypison</i>	10	42 ± 67 ab
<i>P. roxburghoides</i>	5	10 ± 8,0 b
<i>R. aff. bengalensis</i>	8	10 ± 11 b
<i>T. morotaiense</i>	11	21 ± 25 b

Tableau 41 : Facteur de transfert (TF) des hyperaccumulateurs

la moyenne et l'écart type sont donnés pour les répétitions, n correspond au nombre d'échantillons, les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à $p = 0,05$ (TukeyHSD test)

Plante	n	TF
<i>C. floribunda</i>	3	0,2 ± 0,2 bc
<i>F. trachypison</i>	8	0,7 ± 0,5 c
<i>P. roxburghoides</i>	4	9,5 ± 3,4 a
<i>R. aff. bengalensis</i>	8	4,3 ± 1,7 abc
<i>T. morotaiense</i>	13	6,1 ± 5,0 ab

3.2. La diversité bactérienne rhizosphérique

A l'issue de l'analyse bioinformatique des données obtenues par séquençage à haut débit des 45 échantillons d'ADNs rhizosphériques, 2 881 580 séquences ont été obtenues et regroupées sous 6 645 OTUs différentes appartenant à 36 phyla. Les abondances relatives de chaque phylum ont été calculées et les phyla représentés à moins de 1% dans les différents échantillons ont été regroupés sous la dénomination "Autres (<1%)" (*Candidate division OP3*, *Candidate division WS6*, *Chlamydiae*, *Chlorobi*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Elusimicrobia*, *Fibrobacteres*, *Firmicutes*, *GOUTA4*, *Gracilibacteria*, *Hydrogenedentes*, *JL-ETNP-Z39*, *Omnitrophica*, *Parcubacteria*, *Saccharibacteria*, *SHA-109*, *SM2F11*, *Spirochaetae*, *TA06*, *TM6*, *WCHB1-60*, *WD272*). Enfin, 1,30% des séquences n'ont pu être affiliées taxonomiquement.

Sur les 13 phyla les plus abondants, quelles que soient les espèces végétales, les *Proteobacteria* (34%), les *Acidobacteria* (21%) et les *Actinobacteria* (19%) sont, en moyenne, les mieux représentés (Figure 24). Viennent ensuite, les *Chloroflexi* (8,4%), les *Nitrospirae* (4,2%) et les *Planctomycetes* (3,3%).

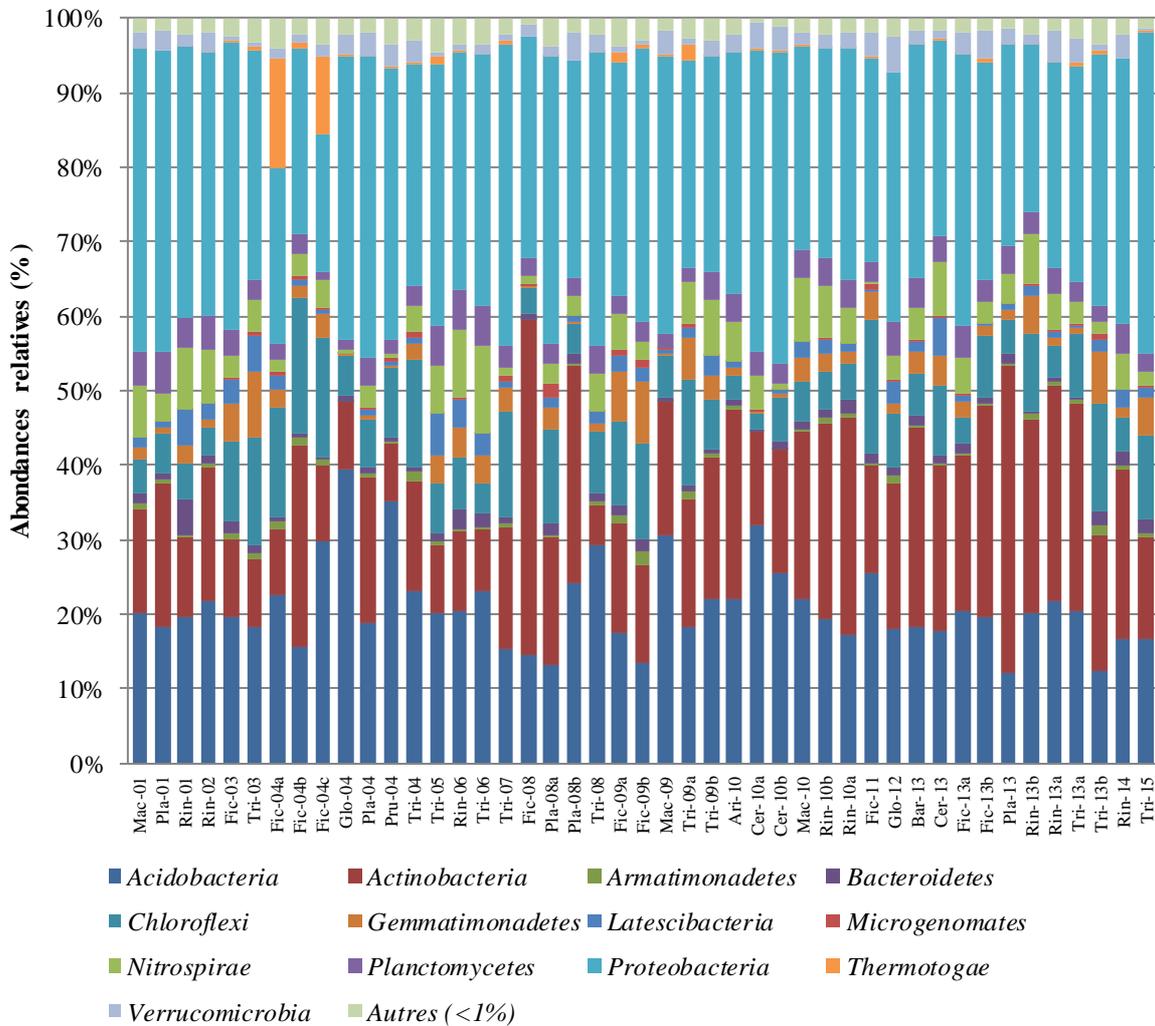


Figure 24 : Abondance relative des phyla majoritaires des terres rhizosphériques
 Ari : *Aristolchia* sp., Bar : *Barringtonia* sp., Cer : *C. floribunda*, Fic : *F. trachypison*,
 Glo : *G. moluccanum*, Mac : *Macaranga* sp., Pla : *P. roxburghioides*, Pru : *Prunus* sp.,
 Rin : *R. aff. bengalensis*, Tri : *T. morotaiense*

Les indices d' α -diversité (OTUs observées, Chao1 et Shannon) ont été calculés pour les terres rhizosphériques, par espèce végétale, tous sites confondus (Tableau 42). Le nombre d'OTUs observées est compris entre 431 (*T. morotaiense* site 03) et 3 105 (*T. morotaiense* site 05) sur les 6 645 OTUs observées. Au minimum, 74% de la diversité réelle de nos échantillons est représentée ($\frac{\text{OTUs observées}}{\text{Chao1}} \times 100$). En moyenne, l'indice de Shannon est le plus élevé pour *Prunus* sp. (9,26) alors qu'il est le plus faible pour *Barringtonia* sp. (8,42).

Tableau 42 : Indices d' α -diversité par plante

la moyenne et l'écart type sont donnés pour les répétitions, n correspond au nombre d'échantillons

Plante	n	OTUs	Chao1	Shannon
<i>Aristolchia</i> sp.	1	2806	3216	9,29
<i>Barringtonia</i> sp.	1	2005	2310	8,42
<i>Cerbera floribunda</i>	3	1338 ± 756	1692 ± 847	8,47 ± 0,71
<i>Ficus trachypison</i>	10	1841 ± 538	2195 ± 602	8,66 ± 0,57
<i>Glochidion moluccanum</i>	2	2385 ± 48	2716 ± 32	8,82 ± 0,22
<i>Macaranga</i> sp.	3	2218 ± 658	2625 ± 616	9,23 ± 0,22
<i>Planchonella roxburghioides</i>	5	2016 ± 560	2336 ± 621	8,55 ± 0,84
<i>Prunus</i> sp.	1	2748	3048	9,26
<i>Rinorea bengalensis</i>	8	2307 ± 751	2673 ± 827	8,92 ± 0,51
<i>Trichospermum morotaiense</i>	11	1993 ± 849	2378 ± 941	8,72 ± 0,79

Pour mettre en évidence les liens entre la diversité bactérienne et les paramètres abiotiques des différents sites, une analyse de redondance (RDA) a été réalisée en se basant, d'une part, sur l'abondance relative des 13 phyla majoritaires et, d'autre part, sur les paramètres physico-chimiques des terres rhizosphériques (Tableau 33, Tableau 36 et Tableau 37). La fonction *envfit* du package Vegan a été utilisée pour ne conserver que les variables abiotiques corrélées significativement ($p < 0,10$) avec l'abondance relative des phyla bactériens majoritaires. Ainsi, parmi l'ensemble des paramètres abiotiques mesurés, seuls seront conservés : les pourcentages d'azote et carbone total, de carbone organique, les teneurs en Mn, Co, Ni, Fe et Zn extractibles au DTPA, les concentrations en Mn et K échangeables, et enfin la CEC totale.

Le plan principal F1-F2 explique 82,89% de la variabilité totale (Figure 25). Les échantillons issus des rhizosphères de *F. trachypison* (Fic) présentent des ordonnées négatives et sont corrélés positivement avec une CEC totale élevée mais par contre inversement corrélés aux fortes concentrations en Mn échangeable et en Mn, Co et Fe extractibles au DTPA et aux teneurs en N, C et C organique des terres. Ils se caractérisent par une forte abondance relative en *Chloroflexi*. Les échantillons issus des rhizosphères de *R. aff. bengalensis* (Rin) se discriminent selon l'axe F1. Ils suivent le gradient en Ni extractible au DTPA, avec les terres issues des sites 01, 02 et 06, présentant des teneurs en Ni plus faibles que celles issues des sites 10, 13 et 14. Ce gradient va de pair avec l'abondance relative des *Actinobacteria* : cette dernière est plus élevée pour les terres possédant les fortes concentrations en Ni extractible au DTPA. La discrimination, sur le plan principal F1-F2, des échantillons issus des autres espèces végétales, comme en particulier ceux issues de *T. morotaiense* (Tri), apparaît moins évidente.

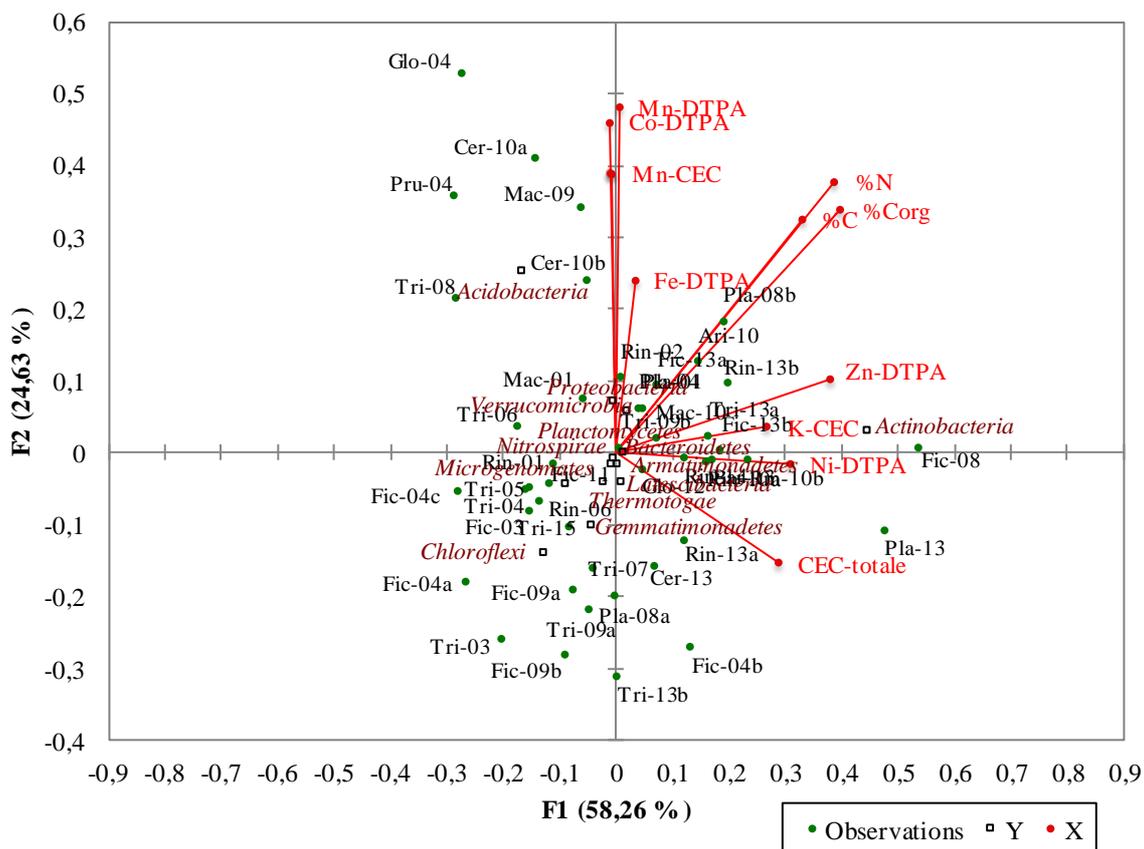


Figure 25 : Analyse de redondance entre les abondances relatives des dix phyla majoritaires et les variables abiotiques des sites

%N : % d'azote total, %C : % de carbone total, %Corg : % de C organique, xx-DTPA : éléments extractibles au DTPA, XX-CEC : éléments échangeables, Ari : *Aristolchia* sp., Bar : *Barringtonia* sp., Cer : *C. floribunda*, Fic : *F. trachypison*, Glo : *G. moluccanum*, Mac : *Macaranga* sp., Pla : *P. roxburgioides*, Pru : *Prunus* sp., Rin : *R. aff. bengalensis*, Tri : *T. morotaiense*, de 01 à 15 : les différents sites, de a à c : les différents réplicats, les vecteurs des variables abiotiques ont été multipliés par un facteur 0,75, n = 45

3.3. Focus sur *F. trachypison*, *R. aff. bengalensis* et *T. morotaiense*

Lors de notre échantillonnage, trois espèces ont été rencontrées fréquemment sur les différents sites visités. Il s'agit de *F. trachypison*, *R. aff. bengalensis* et *T. morotaiense*. Nous avons donc décidé, afin de mieux caractériser la diversité bactérienne des environnements rhizosphériques, de faire un focus sur ces trois espèces.

A partir des 6 461 OTUs identifiées pour les 3 espèces de plante, un diagramme de Venn a été construit pour déterminer les OTUs spécifiques ou communes à ces espèces (Figure 26).

Les dix terres rhizosphériques de *F. trachypison*, retrouvées sur six sites différents (sites 03, 04, 08, 09, 11 et 13), possèdent 4 896 OTUs, dont 399 qui leur sont spécifiques. Les huit terres rhizosphériques de *R. aff. bengalensis* provenant de six sites différents (sites 01, 02, 06, 10, 13 et 14) possèdent au total 4 363 OTUs et 300 OTUs leurs sont spécifiques. Quant aux onze terres rhizosphériques de *T. morotaiense* échantillonnées sur neuf sites (sites 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 13 et 15), 769 OTUs leurs sont spécifiques sur les 5 605 OTUs recensées. Au total, 3 410 OTUs sont communes aux rhizosphères des trois espèces de plantes. Les terres rhizosphériques de *F. trachypison* et *T. morotaiense* possèdent un grand nombre d'OTUs partagées (930) contrairement à celles de *R. aff. bengalensis* qui n'en partagent que 496 avec celles de *T. morotaiense* et 157 avec celle de *F. trachypison*.

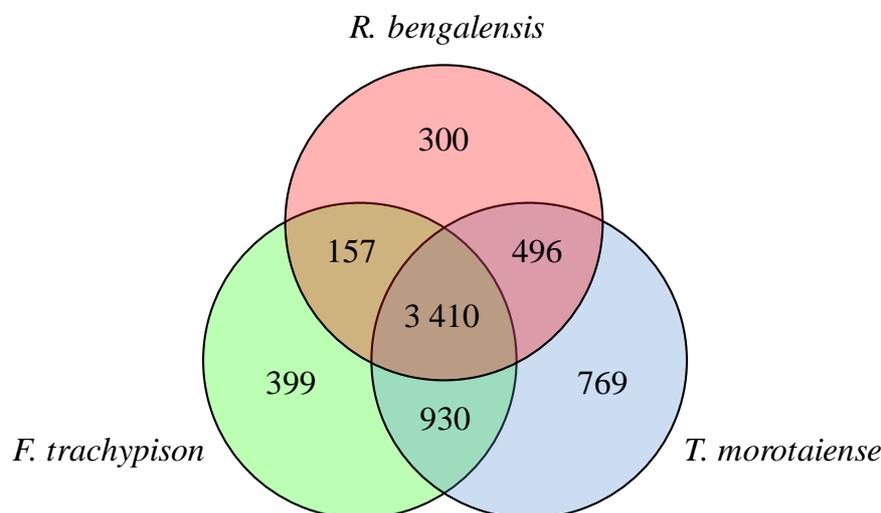


Figure 26 : Diagramme de Venn basé sur la présence des OTUs dans les terres rhizosphériques de *F. trachypison*, *R. aff. bengalensis* et *T. morotaiense*

Pour permettre de comparer les échantillons environnementaux entre eux (β -diversité), la méthode "Unweighted UniFrac" a été utilisée, basée sur les séquences des OTUs. Sur la représentation UPGMA (Figure 27), il ressort que les échantillons des terres rhizosphériques de *R. aff. bengalensis* sont clairement regroupés ensemble et nettement séparés de ceux de *F. trachypison* et *T. morotaiense*, excepté un échantillon rhizosphérique de *T. morotaiense* collecté au site 13 (Tri-13b). Ceci indique que la diversité des communautés bactériennes des rhizosphères de *R. aff. bengalensis* sont proches, quel que soit le site d'échantillonnage, alors qu'elles divergent davantage entre les différents échantillons de terre rhizosphériques issues de *F. trachypison* et *T. morotaiense*, selon le site de collecte. La proximité, d'un point de vue phylogénétique, de la communauté bactérienne présente dans l'échantillon Tri-13b avec les communautés rhizosphériques présentes dans les échantillons de *R. aff. bengalensis*, peut s'expliquer par le fait que dans cet échantillon, tout comme dans les rhizosphères de *R. aff. bengalensis*, le nombre d'OTUs appartenant aux phyla des *Armatimonadetes*, *Chloroflexi* et *Nitrospirae* est plus élevé.

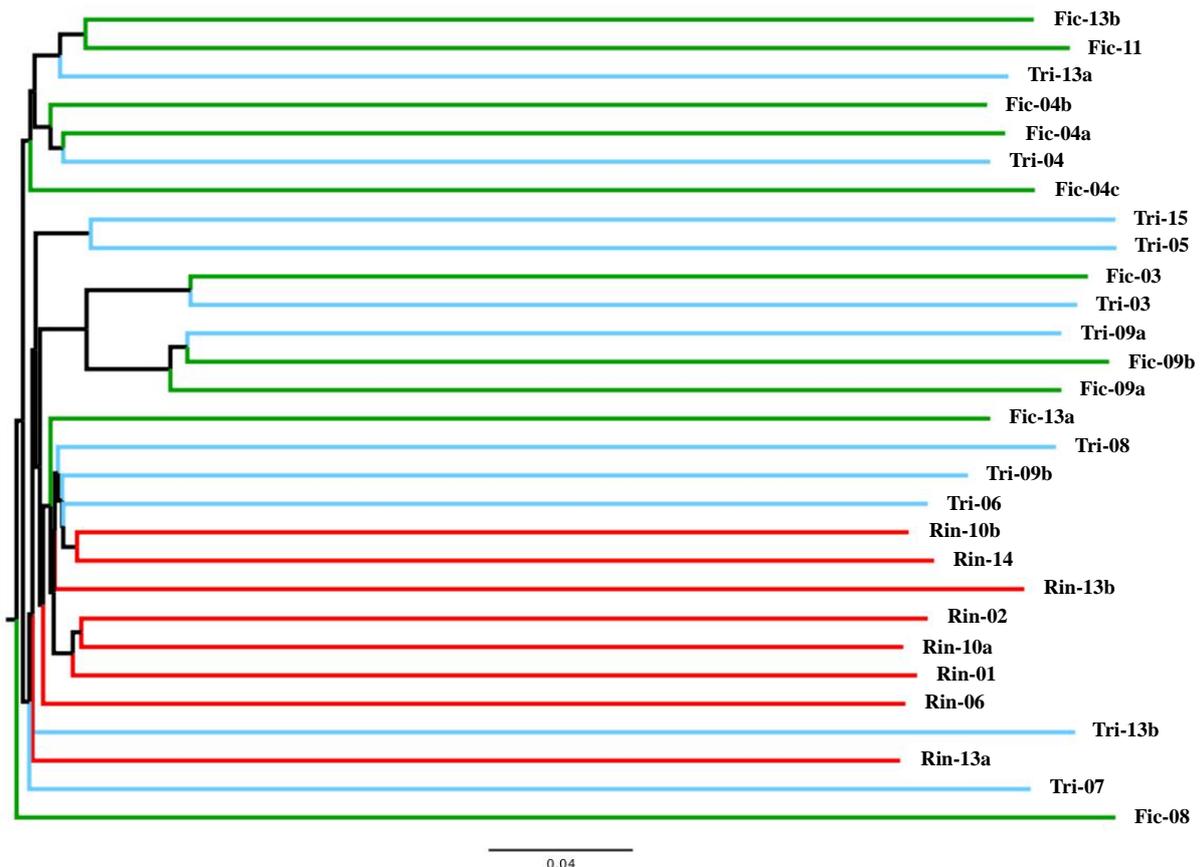


Figure 27 : Arbre phylogénétique UPGMA des terres rhizosphériques basé sur la métrique de phylogénie Unweighted UniFrac

Fic : *F. trachypison*, Rin : *R. aff. bengalensis*, Tri : *T. morotaiense* ; 01 à 15 : les différents sites, a à c : les différents réplicats

Une analyse de redondance (RDA) a été réalisée afin de mieux cerner la répartition de ces échantillons en fonction des paramètres abiotiques et des phyla majoritaires. La fonction *envfit* du package *Vegan* a été utilisée et les paramètres abiotiques conservés sont : les pourcentages de N et C totaux et de C organique, les teneurs en Mn, Co, Ni, Fe et Zn extractibles au DTPA, les concentrations en Mn et K échangeables, la CEC totale et le pH.

Le plan principal F1-F2 explique 81,6% de la variabilité totale (Figure 28). Les échantillons issus des rhizosphères de *R. aff. bengalensis* sont corrélés négativement avec l'abondance relative des *Chloroflexi*, *Thermogotae* et *Acidobacteria*. Comme pour la RDA réalisée précédemment sur l'ensemble des échantillons de terres rhizosphériques (Figure 25), les échantillons issus des terres rhizosphériques de *R. aff. bengalensis* peuvent être divisés en deux groupes : les échantillons provenant des sites 01, 02 et 06 corrélés avec des valeurs de pH basiques et ceux des sites 10 et 13 corrélés avec les plus fortes concentrations de Ni extractible au DTPA, les valeurs de pH faibles et avec les pourcentages en N, C et C organique élevés. Par contre, aucune discrimination claire ne peut être mise en évidence pour les échantillons issus des terres rhizosphériques de *F. trachypison* et *T. morotaiense*.

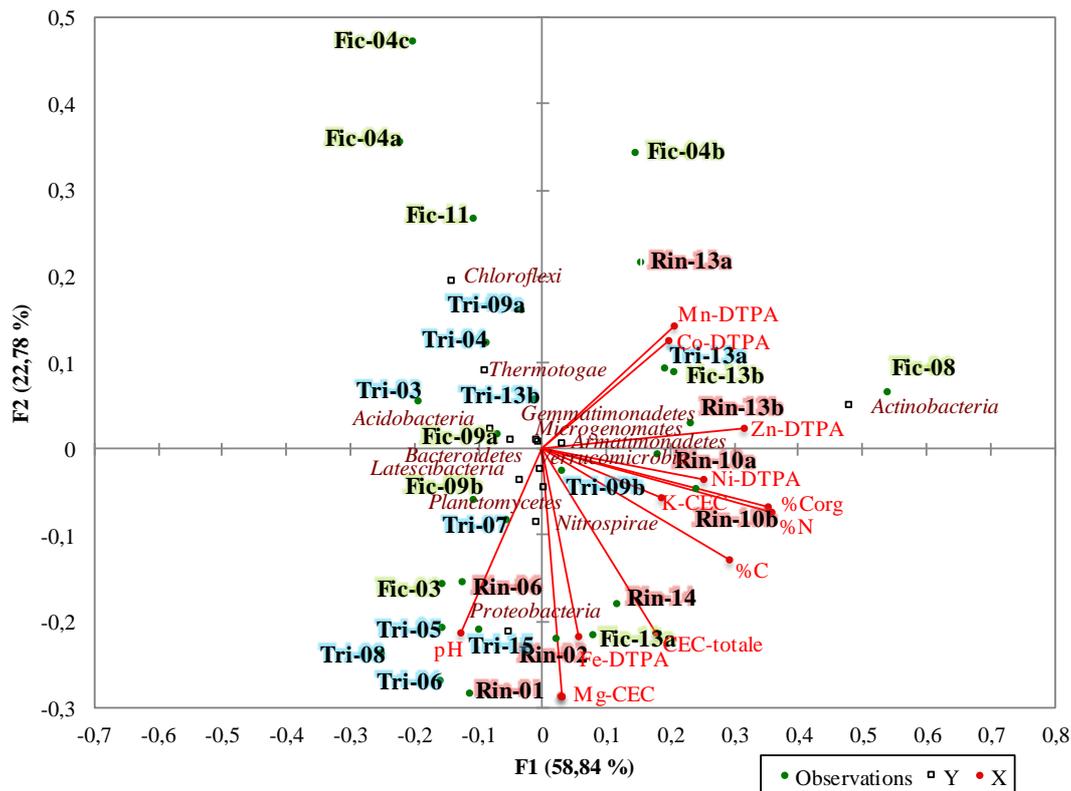


Figure 28 : Analyse de redondance entre les abondances relatives des 13 phyla majoritaires et les variables abiotiques des sites pour *F. trachypison*, *R. aff. bengalensis* et *T. morotaiense*
 %N : % d'azote total, %C : % de carbone total, %Corg : % de C organique, xx-DTPA : éléments extractibles au DTPA, XX-CEC : éléments échangeables, Fic : *F. trachypison*, Rin : *R. aff. bengalensis*, Tri : *T. morotaiense*, de 01 à 15 : les différents sites, de a à c : les différents réplicats, les vecteurs des variables abiotiques ont été multipliés par un facteur 0,5, n = 29

3.4. Les facteurs influençant la diversité bactérienne

Des corrélations de Spearman ont été calculées entre l'abondance relative des 13 phyla majoritaires et les paramètres abiotiques des terres rhizosphériques (Figure 29). Seules les corrélations significatives ($p < 0,1$) ont été retenues. Les *Planctomycetes* et *Proteobacteria* ne présentent que des corrélations positives avec l'ensemble des paramètres étudiés dont les corrélations sont significatives. Les *Actinobacteria* et les *Verrucomicrobia* sont également corrélés positivement avec l'ensemble des variables abiotiques, mis à part l'altitude pour les *Actinobacteria* ($p = 0,008$) et le pH pour les *Verrucomicrobia* ($p < 0,001$). Les *Chloroflexi*, *Microgenomates* et *Thermogotae* ne présentent que des corrélations négatives avec les variables abiotiques. Les phyla *Armatimonadetes*, *Gemmatimonadetes* et *Latescibacteria* présentent de nombreuses corrélations négatives avec la plupart des variables abiotiques mesurées sur les terres rhizosphériques, hormis avec l'altitude pour le phylum des *Armatimonadetes* ($p = 0,098$) et avec le pH pour les *Gemmatimonadetes* ($p = 0,014$) et *Latescibacteria* ($p = 0,041$).

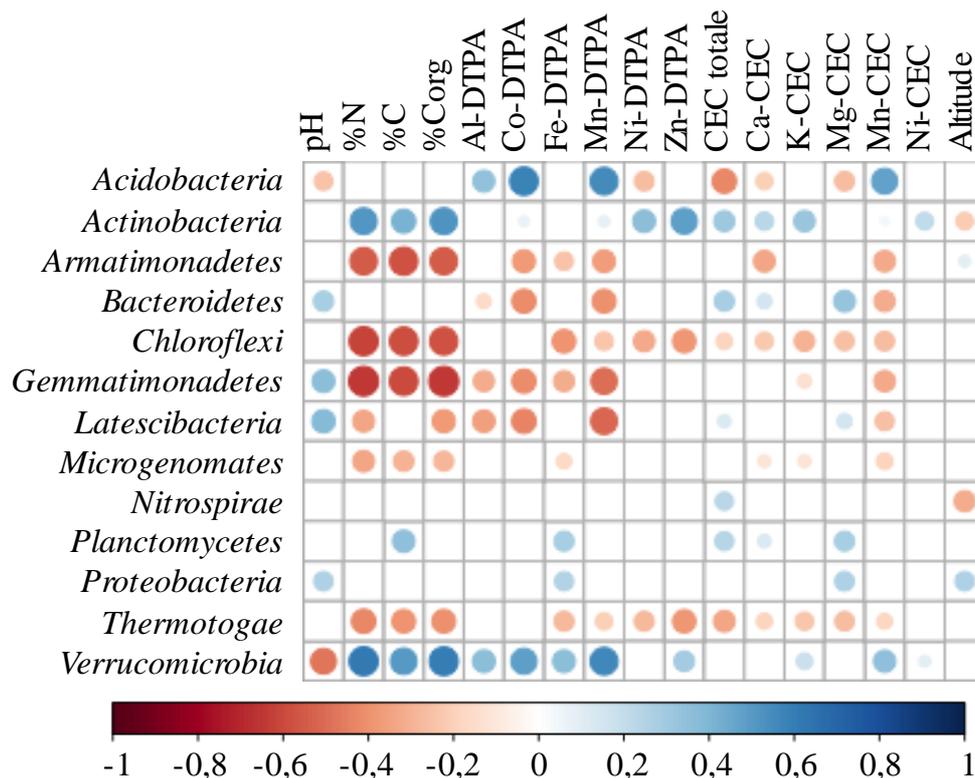


Figure 29 : Matrice de corrélations entre les paramètres abiotiques et les 13 phyla bactériens majoritaires

basée sur le coefficient de corrélation r de Spearman, les blancs correspondent à un coefficient non significatif ($p > 0,1$) ; %N : % d'azote total, %C : % de carbone total, %Corg : % de C organique, xx-DTPA : éléments extractibles au DTPA, XX-CEC : éléments échangeables

Pour cerner quel est le déterminisme de la diversité bactérienne rhizosphérique de plantes collectées, une analyse de partition de variance (VPA) a été effectuée entre le jeu de données des OTUs et les données abiotiques (pH, éléments échangeables, métaux extractibles au DTPA, Corg - 13 variables), les données topographiques des sites de prélèvements (altitude et exposition - 2 variables) et les différentes espèces de plantes (10 espèces différentes). Suite à cette analyse (Figure 30), il ressort que 38% de la variabilité de la diversité bactérienne de nos échantillons est expliquée par l'ensemble de ces 3 types de données, avec 62% de cette variabilité non expliquée (résidus). Ce sont les données abiotiques des terres rhizosphériques qui permettent d'expliquer au mieux la diversité bactérienne des échantillons, avec 21% d'explication spécifiquement liée à ces variables et au total 33% d'explication si l'on considère l'influence des paramètres abiotiques en association avec les autres variables. Ainsi, la diversité bactérienne rhizosphérique des plantes hyperaccumulatrices de Ni prélevées en Indonésie est expliquée à 87% par les données physico-chimiques des terres, en association avec les deux autres types de variables. Les pourcentages d'explication relatifs aux données topographiques et à l'espèce de plante sont très faibles et n'ont donc qu'une faible influence dans le déterminisme de la diversité bactérienne rhizosphérique (10 et 9,4%, respectivement).

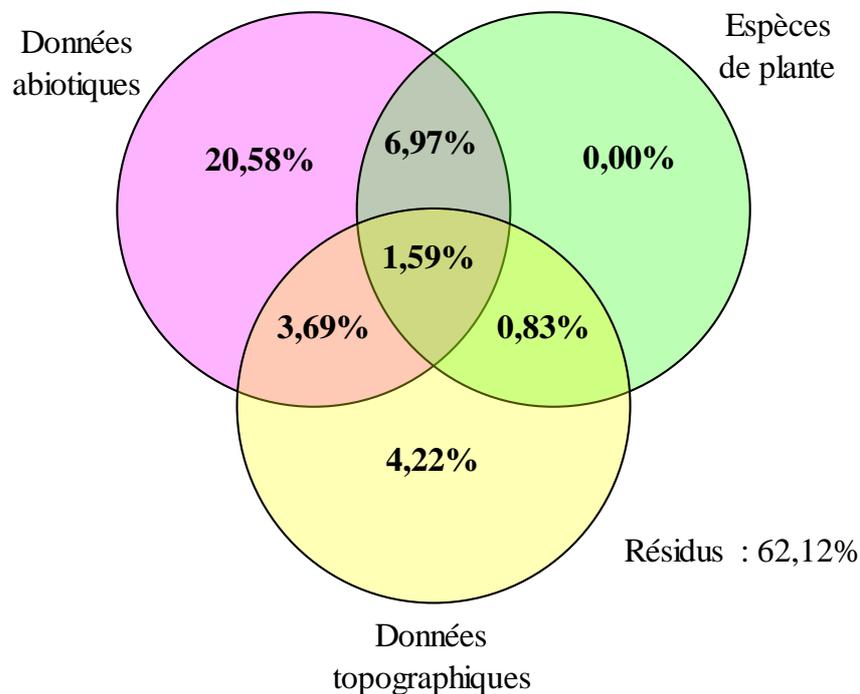


Figure 30 : Analyse de partition de la variance bactérienne au niveau OTUs en fonction des données abiotiques, topographiques et de l'espèce de plante

4. Analyse globale à l'échelle mondiale

4.1. La caractérisation des environnements ultramafiques

Sur la base des concentrations en Ni dans les sols (totales et extractibles au DTPA) et de celles obtenues dans les parties aériennes des plantes, des *boxplots* ont été construits pour comparer les différents pays prospectés entre eux (Figure 31), à savoir la Malaisie, l'Indonésie, la Grèce (Annexe 1) et l'Albanie. C'est en Indonésie que sont observées les plus fortes concentrations en Ni total ($7\ 000\ \text{mg kg}^{-1}$) et extractible au DTPA ($200\ \text{mg kg}^{-1}$), plus élevées que les valeurs moyennes calculées pour l'ensemble des échantillons de terre rhizosphérique (Ni total de $3\ 900\ \text{mg kg}^{-1}$ et Ni-DTPA de $200\ \text{mg kg}^{-1}$). C'est cependant en Indonésie que les concentrations en Ni dans les parties aériennes des plantes échantillonnées sont les plus variables, allant de 8 à $22\ 200\ \text{mg}$ de Ni kg^{-1} de plante sèche. Dans les sols ultramafiques albanais ont été mesurées les plus faibles concentrations en Ni total ($3\ 200\ \text{mg kg}^{-1}$) et extractible au DTPA ($180\ \text{mg kg}^{-1}$), mais c'est dans cette région que les profils d'hyperaccumulation sont les plus importants avec une capacité des plantes à concentrer 3 fois en moyenne le Ni total et de 9 à 819 fois le Ni extractible au DTPA (100 fois en moyenne) de leur environnement rhizosphérique. Les plantes récoltées en Grèce et Malaisie possèdent une plus faible capacité à concentrer le Ni extractible au DTPA (62 et 47 fois en moyenne, respectivement) mais un potentiel de concentration du Ni total équivalent à celui d'Albanie (3 fois pour la Grèce et 4 fois pour la Malaisie).

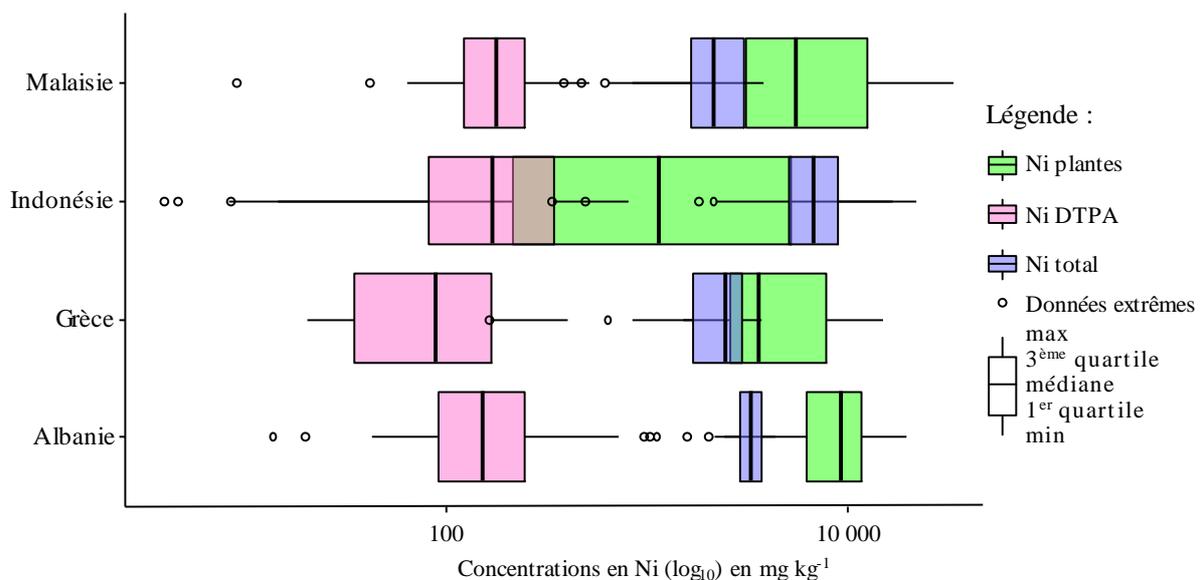


Figure 31 : Concentrations en Ni total et extractible au DTPA des terres rhizosphériques et du Ni des parties aériennes des différents hyperaccumulateurs d'Albanie (48 échantillons), de Grèce (12 échantillons), d'Indonésie (45 échantillons) et de Malaisie (60 échantillons)

Une analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée avec des paramètres physico-chimiques des terres rhizosphériques (pH, pourcentages en N et C total, en C organique, éléments totaux, éléments extractibles au DTPA et éléments échangeables) des 165 plantes collectées dans les quatre pays (Figure 32). Le plan principal explique 48% de la variabilité totale. Les ellipses regroupent les échantillons d'une même région à l'intervalle de confiance de 95%. Les échantillons de Malaisie (en violet) sont répartis sur l'ensemble du plan F1-F2, soulignant une certaine variabilité des caractéristiques physico-chimiques de ces terres rhizosphériques. Les échantillons d'Indonésie (en bleu) se discriminent le long de l'axe F1, qui explique 27% de la variabilité totale, et présentent des abscisses négatives. Ils sont principalement corrélés avec les teneurs en Ni, Al, Fe et Zn totaux. Par contre, ils sont inversement corrélés avec la plupart des éléments échangeables mesurés. Les échantillons d'Albanie (en rouge) et de Grèce (en orange) se discriminent le long de l'axe des ordonnées (F2 qui explique 21% de la variabilité totale) et présentent des ordonnées négatives. Ces échantillons sont corrélés positivement avec le pH et les fortes concentrations en Mg, K et Na total et négativement avec les teneurs élevées en Mn et Co extractibles au DTPA. Le recouvrement des quatre ellipses de confiance met en évidence des caractéristiques physico-chimiques communes aux terres rhizosphériques de plantes hyperaccumulatrices de Ni provenant d'environnements ultramafiques.

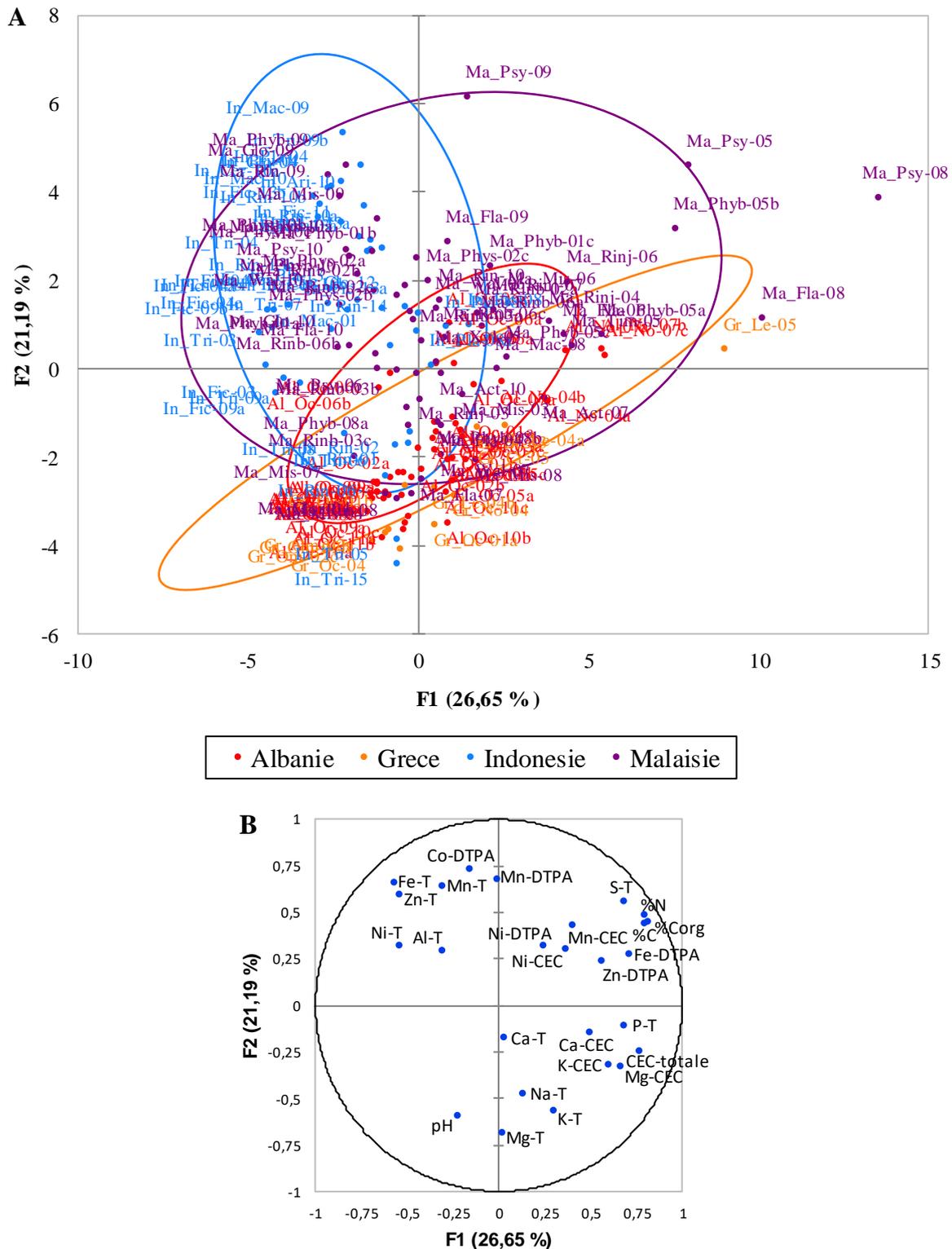


Figure 32 : ACP des paramètres physico-chimiques des terres rhizosphériques des échantillons d'Albanie (en rouge), de Grèce (en orange), d'Indonésie (en bleu) et de Malaisie (en violet)

(A) Représentation des individus dans le plan principal F1-F2 (n=165),

(B) Représentation des variables dans le plan principal F1-F2 (xx-T : éléments totaux, xx-DTPA : éléments extractibles au DTPA, XX-CEC : éléments échangeables)

4.2. La diversité bactérienne des plantes hyperaccumulatrices de Ni au niveau mondial

L'analyse bioinformatique des données de séquençage à haut débit des 165 échantillons d'ADNs rhizosphériques a produit 15 016 409 séquences, regroupées sous 14 088 OTUs différentes appartenant à 42 phyla. Les abondances relatives de chaque phylum ont été calculées. Les phyla représentés à moins de 1% dans les différents échantillons (*Armatimonadetes*, *BJ-169*, *BRC1*, *Candidatus Berkelbacteria*, *Chlamydiae*, *Chlorobi*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus Thermus*, *Elusimicrobia*, *FBP*, *FCPU426*, *Fibrobacteres*, *GAL15*, *Gracilibacteria*, *Hydrogenedentes*, *Ignavibacteriae*, *Microgenomates*, *Nitrospinae*, *Omnitrophica*, *Parcubacteria*, *Peregrinibacteria*, *RBG-1*, *Saccharibacteria*, *SBR1093*, *Spirochaetae*, *Tectomicrobia*, *Teneriicutes*, *TM6*, *WS2*, *WS6* et *WWE3*) ont été regroupés sous la dénomination "Autres (<1%)". Enfin, 0,86% des séquences n'ont pu être affiliées taxonomiquement.

Quel que soit le pays considéré, le phylum le mieux représenté est celui des *Proteobacteria*, avec une abondance relative moyenne de 35% (Figure 33). L'abondance relative de ce phylum apparaît statistiquement plus élevée en Malaisie (42%) en comparaison avec celles des trois autres pays. Viennent ensuite les phyla des *Acidobacteria* et *Actinobacteria*, avec néanmoins une inversion pour la Grèce où nous notons une plus forte abondance relative des *Actinobacteria* par rapport à celle des *Acidobacteria* (33% contre 15%, respectivement).

Les autres phyla, dont l'abondance relative est supérieure à 1%, sont représentés, selon les pays, dans l'ordre suivant :

- *Gemmatimonadetes* (10%) > *Chloroflexi* (7,5%) > *Bacteroidetes* (7,2%) > *Planctomycetes* (3,2%) > *Nitrospirae* (2,3%) > *Verrucomicrobia* (1,3%) pour les échantillons d'Albanie,
- *Chloroflexi* (8,5%) > *Gemmatimonadetes* (4,2%) > *Bacteroidetes* (3,5%) > *Planctomycetes* (3,7%) > *Firmicutes* (2,1%) > *Verrucomicrobia* (1,5%) pour les échantillons de Grèce,
- *Chloroflexi* (8,5%) > *Nitrospirae* (4,3%) > *Planctomycetes* (3,3%) > *Gemmatimonadetes* (2,4%) > *Latescibacteria* (1,8%) > *Verrucomicrobia* (2,0%) > *Bacteroidetes* (1,0%) pour les échantillons d'Indonésie,
- *Planctomycetes* (6,7%) > *Chloroflexi* (5,4%) > *Nitrospirae* (4,9%) > *Bacteroidetes* (4,4%) > *Gemmatimonadetes* (2,4%) > *Firmicutes* (2,6%) > *Latescibacteria* (1,8%) pour les échantillons de Malaisie.

Ainsi, quelle que soit la région climatique considérée, les *Chloroflexi* sont bien représentés, de même que les *Gemmatimonadetes* en climat tempéré (Grèce et Albanie) et les *Nitrospirae* et *Planctomycetes* en climat tropical.

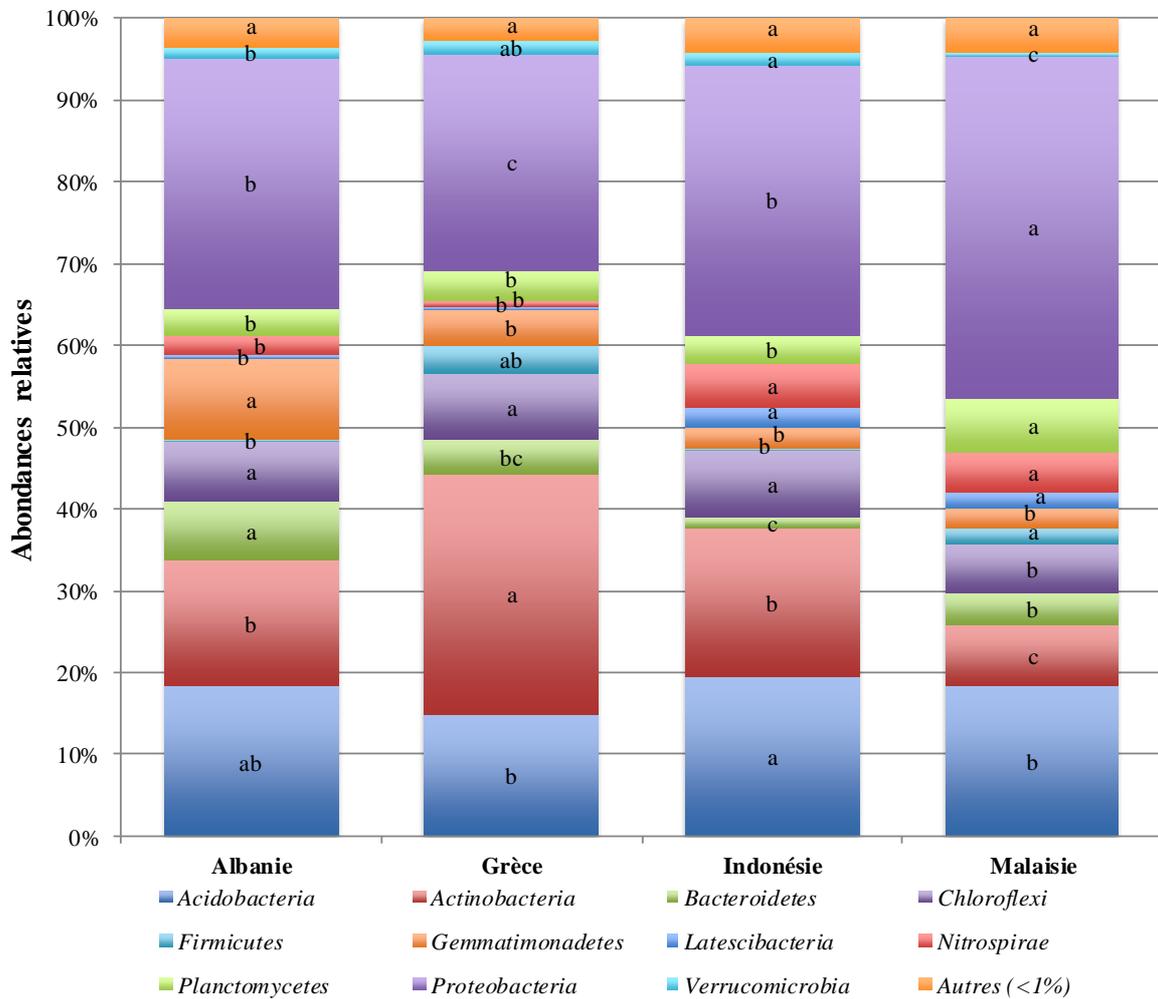


Figure 33 : Abondance relative des phyla majoritaires dans les terres rhizosphériques
 les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à $p = 0,05$ (TukeyHSD test)

Les indices d' α -diversité (OTUs observées, Chao1 et Shannon) ont été calculés pour les terres rhizosphériques des quatre pays (Tableau 43). Les échantillons comprennent entre 459 et 5 799 OTUs sur un total de 14 088 OTUs identifiées. Le Chao1 est compris entre 661 et 6 721. Ainsi, au minimum, 68,5% de la diversité réelle de nos échantillons est représentée ($\frac{\text{OTUs observées}}{\text{Chao1}} \times 100$). L'indice de Shannon est compris entre 7,13 et 10,19.

De manière générale, les échantillons d'Albanie et de Grèce possèdent les plus grand indices d' α -diversité (4 196 et 3 755 pour les OTUs observées, 5 019 et 4 573 pour Chao1 et 9,59 et 9,72 pour l'indice de Shannon) alors, qu'en moyenne, les terres rhizosphériques d'Indonésie possèdent les plus faibles valeurs d'indices (2 354, 2 914 et 8,89 pour OTUs observées, Chao1 et Shannon, respectivement). Les indices relatifs aux échantillons de Malaisie montrent des valeurs intermédiaires aux précédentes.

Tableau 43 : Indices d' α -diversité

les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à $p = 0,05$ (test TukeyHSD)

Pays	OTUs	Chao1	Shannon
Albanie	4196 ± 646 a	5019 ± 698 a	9,59 ± 0,31 a
Grèce	3755 ± 668 a	4573 ± 722 a	9,72 ± 0,33 a
Indonésie	2354 ± 851 c	2914 ± 982 c	8,89 ± 0,64 c
Malaisie	3128 ± 565 b	3844 ± 726 b	9,24 ± 0,62 b

A partir des 14 088 OTUs identifiées, un diagramme de Venn a été construit afin de repérer, selon les environnements étudiés, quelles OTUs seraient spécifiques ou communes aux régions ultramafiques de ces quatre pays (Figure 34).

Les terres rhizosphériques provenant d'Albanie possèdent 11 228 OTUs, celles d'Indonésie 9 499, celles de Malaisie 9 420 et celles de Grèce 8 960. De plus, 1 306 OTUs semblent spécifiques aux terres rhizosphériques des plantes collectées en Albanie. De même, 806 OTUs ne sont présentes qu'en Indonésie, 120 en Grèce et 40 en Malaisie. Les terres rhizosphériques des plantes hyperaccumulatrices d'Albanie et de Grèce partagent exclusivement 1 639 OTUs. En fonction des grandes régions climatiques, il faut noter que les terres d'Albanie ne partagent que 195 OTUs avec celles d'Indonésie et 403 avec celles de Malaisie. Celles de Grèce ne partagent que 41 OTUs avec l'Indonésie et 33 avec la Malaisie. Enfin, un total de 1 350 OTUs sont exclusivement partagées entre les rhizosphères de plantes hyperaccumulatrices de Ni endémiques d'Indonésie et de Malaisie. Ainsi, il apparaît clairement que le nombre d'OTUs communes est plus important pour les régions ultramafiques ayant des profils climatiques proches : Grèce et Albanie, d'une part et Indonésie et Malaisie, d'autre part.

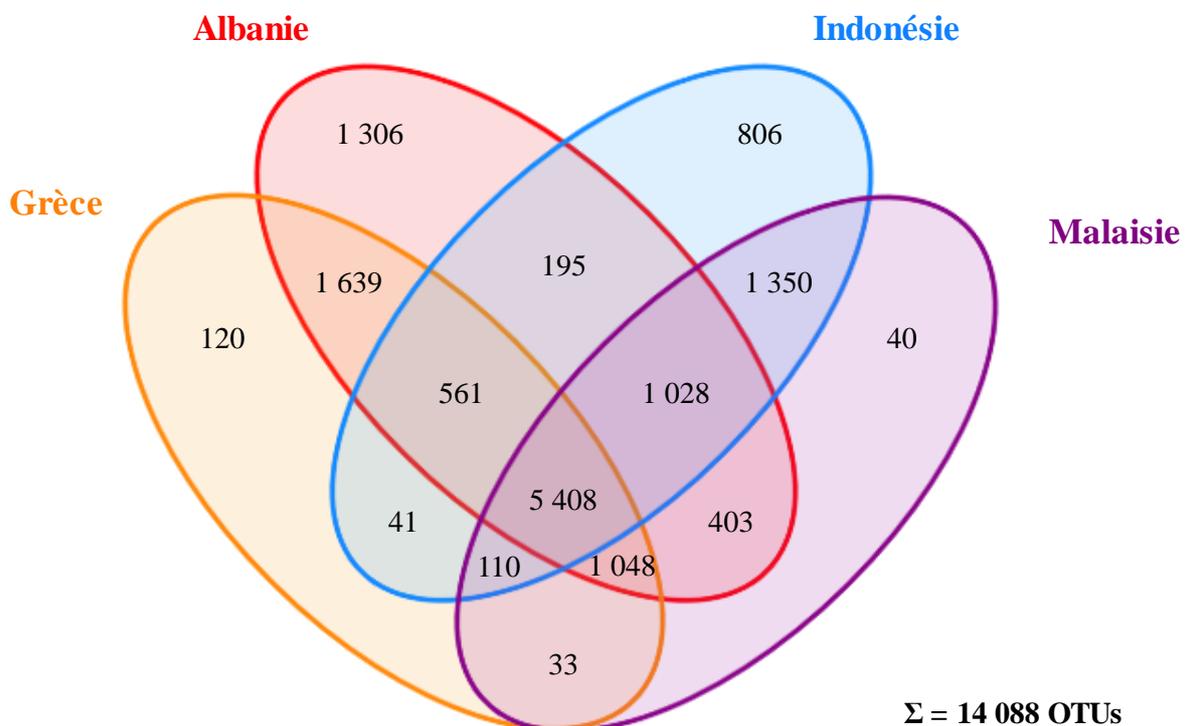


Figure 34 : Diagramme de Venn basé sur la présence des OTUs dans les terres rhizosphériques d'Albanie (en rouge), de Grèce (en orange), d'Indonésie (en bleu) et de Malaisie (en violet)

La représentation sous forme de réseau (Figure 35) des 73 OTUs majoritaires (>1% d'abondance relative), affiliées d'un code couleur renvoyant à leur phylum d'appartenance, permet une meilleure visualisation des OTUs communes ou spécifiques aux différentes régions ultramafiques étudiées. Le détail de l'affiliation taxonomique des OTUs est donné en Annexe 2.

Parmi ces OTUs à plus de 1% d'abondance relative, 16 sont retrouvées uniquement dans les terres rhizosphériques de Grèce, 13 dans celles d'Albanie, 9 dans celles de Malaisie et 5 dans celles d'Indonésie. Sur l'ensemble, les OTUs sont affiliées majoritairement aux *Proteobacteria* (23 OTUs, soit 31,5%), aux *Actinobacteria* (16 OTUs, soit 21,9%) et aux *Acidobacteria* (15 OTUs, soit 20,5%). Les OTUs appartenant à ces trois phyla sont réparties sur l'ensemble du réseau et ces derniers sont présents dans les quatre pays. La seule OTU commune aux quatre régions ultramafiques est une *Proteobacteria* affiliée au genre *Bradyrhizobium*. Sept OTUs sont affiliées au phylum des *Gemmatimonadetes*, 4 sont présentes uniquement dans les terres rhizosphériques issues d'Albanie et 2 sont partagées entre l'Albanie et la Grèce. Les 4 OTUs de *Chloroflexi* sont uniquement présentes dans les environnements européens. Les OTUs appartenant au phylum des *Nitrospirae* sont surtout représentées en Indonésie et Malaisie, à l'exception d'une part, de l'une d'entre-elles, dont l'abondance relative est la plus importante (2,5% d'abondance relative), qui est également commune aux terres rhizosphériques issues d'Albanie, et d'autre part, d'une OTU affiliée au genre *Nitrospira* uniquement représentée à plus de 1% d'abondance relative dans les terres rhizosphériques d'Albanie. Les bactéries affiliées au genre *Flavobacterium* (phylum des *Bacteroidetes*) sont présentes en Albanie, celles affiliées au genre *Bacillus* (phylum des *Firmicutes*) sont présentes en Grèce et celles affiliées au phylum des *Verrucomicrobia* sont présentes en Indonésie.

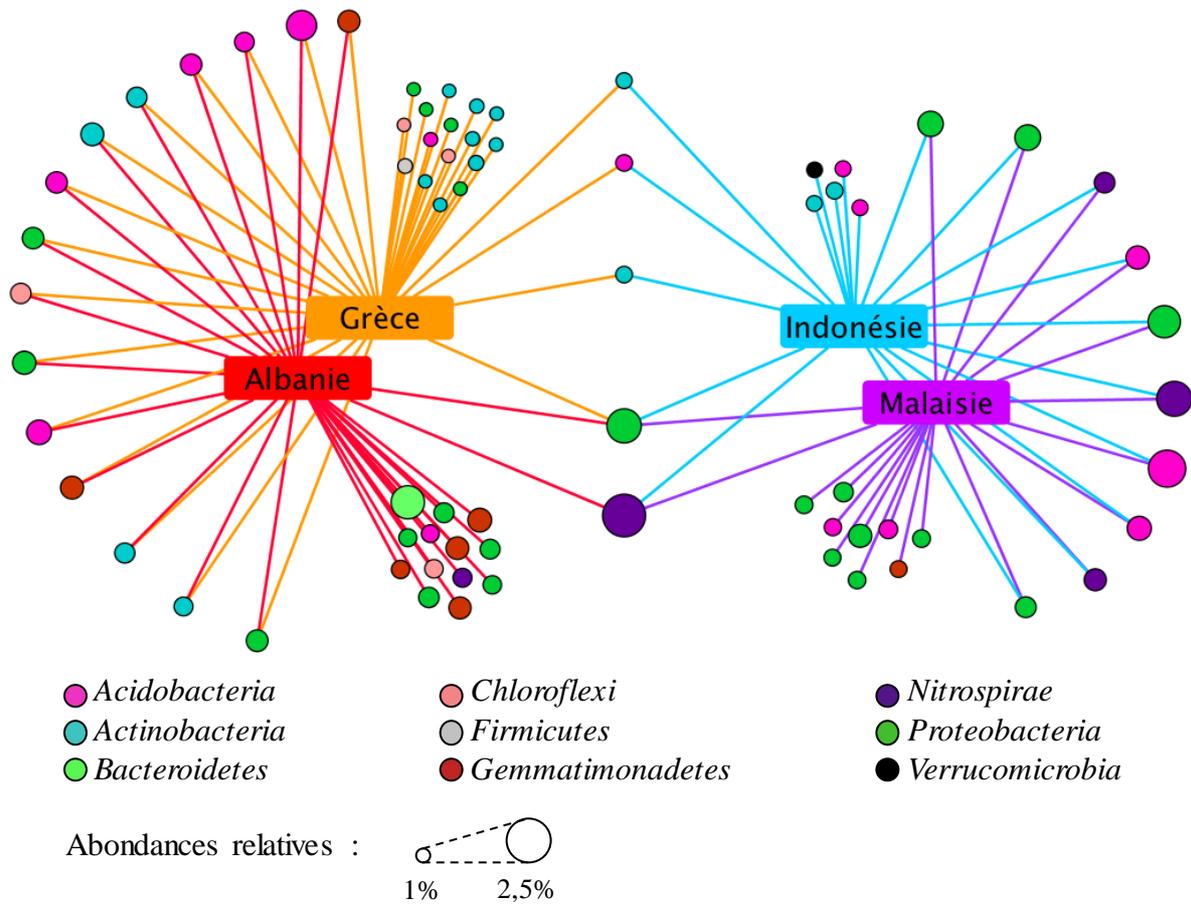


Figure 35 : Réseau basé sur les OTUs >1% d'abondance relative dans les terres rhizosphériques d'Albanie (en rouge), de Grèce (en orange), d'Indonésie (en bleu) et de Malaisie (en violet)

Sur la base des informations phylogénétiques, une analyse en coordonnées principales (PCoA) a été établie (Figure 36) pour comparer les échantillons entre eux *via* la méthode "Unweighted UniFrac". Suite à cette analyse, il ressort que les échantillons d'Albanie (en rouge) et de Grèce (en orange) possèdent une diversité bactérienne proche ; les points correspondant aux échantillons de terres rhizosphériques collectés dans ces deux régions étant rassemblés dans cette représentation en 3D. Les échantillons qui proviennent d'Albanie montrent des ellipses plus larges, soulignant une plus grande diversité bactérienne au sein de ces échantillons. La composition de la diversité bactérienne des échantillons d'Albanie et de Grèce se distingue clairement de celle d'Indonésie et de Malaisie sur l'axe PC1 expliquant 16,2% de la diversité totale. Comme précédemment montré par le calcul de l'indice de Shannon (Tableau 43) et visualisé ici par les ellipses, la diversité bactérienne présente dans les terres rhizosphériques des plantes hyperaccumulatrices de Malaisie est plus grande que pour les échantillons provenant d'Indonésie. Cette analyse confirme, comme souligné précédemment, que selon le climat (tempéré *versus* tropical), la composition de la diversité bactérienne est proche entre les régions ultramafiques ayant des profils climatiques similaires.

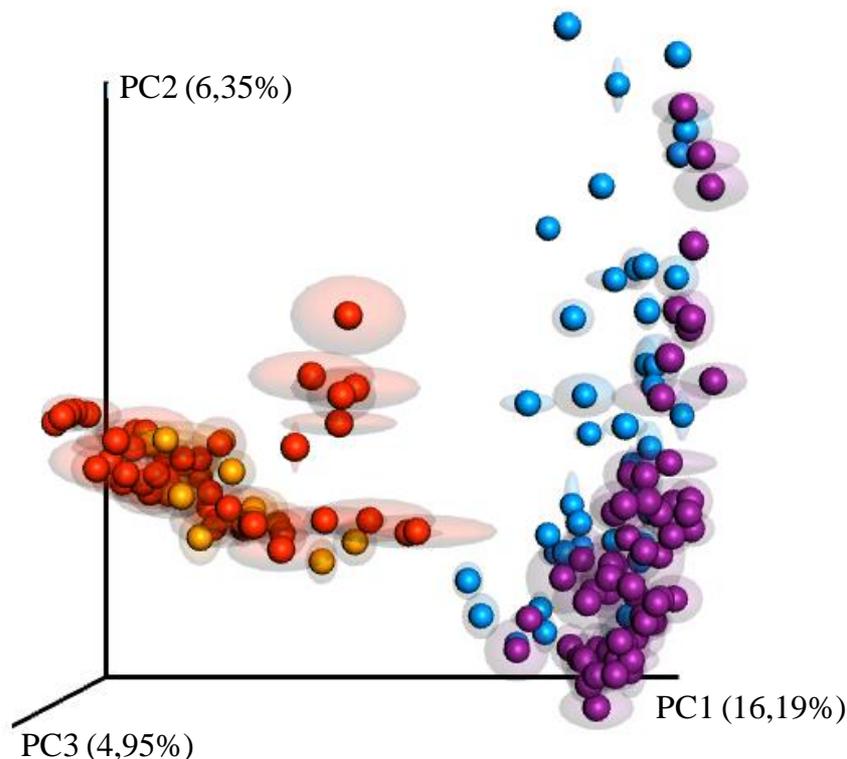


Figure 36 : Analyse en coordonnées principales (PCoA) en 3D (3D PCoA) fondée sur la métrique de phylogénie Unweighted UniFrac des terres rhizosphériques d'Albanie (en rouge), de Grèce (en orange), d'Indonésie (en bleu) et de Malaisie (en violet)

Le paramètre de latitude intègre à la fois le type de climat et le type de végétation, permettant d'étudier la biogéographie de la diversité des communautés bactériennes à l'échelle mondiale. Ainsi, il nous est paru intéressant de présenter la variation de la diversité des communautés bactériennes rhizosphériques (appréhendée ici par l'indice de Shannon) en fonction de la latitude.

Il ressort clairement que la diversité taxonomique augmente des régions de faibles latitudes (climat tropical : latitude de 0,6 à 6°) à celles de latitude proche de 40° (climat méditerranéen) (Figure 37). En outre, nous observons une dispersion plus importante de l'indice de Shannon aux faibles latitudes.

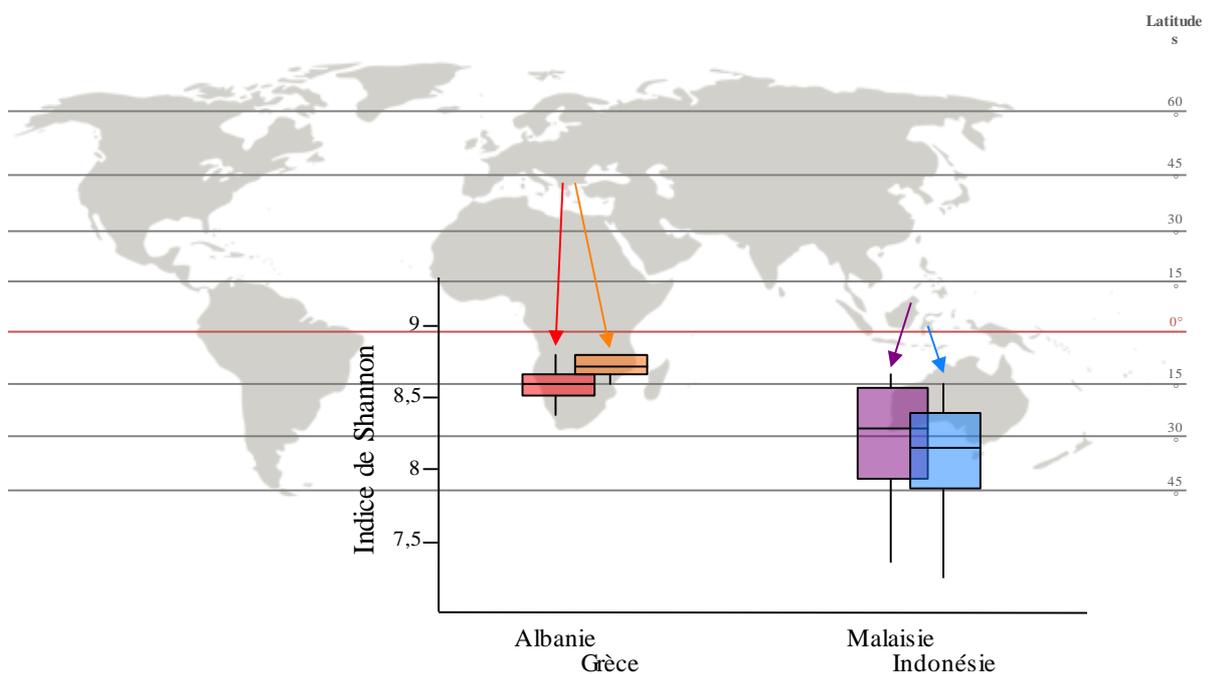


Figure 37 : Indice de Shannon moyen des communautés bactériennes des terres rhizosphériques issues d'Albanie (en rouge), de Grèce (en orange), d'Indonésie (en bleu) et de Malaisie (en violet), suivant la latitude

4.3. Les facteurs influençant la diversité bactérienne

Un arbre de régression multivariable (MRT) a été établi à partir des données abiotiques et climatiques pour prédire l'abondance relative des phyla bactériens majoritaires dans les environnements ultramafiques. Trente-et-une variables ont été considérées pour chaque site : 11 d'entre elles correspondent aux abondances relatives des phyla majoritaires, 16 autres concernent les paramètres physico-chimiques des terres rhizosphériques (pH, pourcentages en C et N total, en C organique, éléments totaux, échangeables et métaux extractibles au DTPA) et les 4 dernières sont les variables climatiques (température annuelle, delta de température au cours de l'année, pluviométrie annuelle et chutes de neige annuelles). L'arbre obtenu explique 30,5% de la variation (Figure 38). Le modèle final indique que les variables environnementales délimitantes des trois groupes observés sont, en ordre décroissant de contribution au coefficient de détermination multiple, l'écart de température annuel (ΔT° annuel) puis, en second lieu, la température moyenne annuelle (T° moyenne annuelle).

Le ΔT° annuel permet un regroupement des échantillons selon un écart inférieur ou supérieur ou égal à 9°C . Les échantillons avec un ΔT° annuel $<$ à 9°C sont ceux appartenant à l'échantillonnage effectué en Malaisie. Ils se caractérisent par des abondances relatives plus élevées de *Proteobacteria* (42%) et *Planctomycetes* (7%) et des abondances relatives d'*Acidobacteria* (7%) et de *Chloroflexi* (5%) plus faibles que les autres échantillons, provenant des trois autres régions. En effet, pour un ΔT° annuel supérieur ou égal à 9°C , les abondances relatives sont en moyenne de 30% pour les *Proteobacteria*, 3% pour les *Planctomycetes*, 21% pour les *Acidobacteria* et 8% pour le *Chloroflexi*.

La température moyenne annuelle est le deuxième paramètre qui permet une répartition des échantillons qui possèdent un ΔT° annuel \geq à 9°C . Les échantillons qui proviennent de l'île d'Halmahera (Indonésie ; température annuelle $\geq 23,8^\circ\text{C}$) se discriminent nettement de ceux issus des climats tempérés (Grèce et Albanie) et se regroupent ainsi dans une branche différente. Ils possèdent de plus faibles proportions de *Bacteroidetes* (1% d'abondance relative) et de *Gemmatimonadetes* (2%) mais une meilleure représentation de *Nitrospirae* (4%). Les échantillons prélevés en Albanie et Grèce (60) ont des abondances relatives élevées en *Bacteroidetes* (5%) et *Gemmatimonadetes* (7%) et faibles pour les *Nitrospirae* (2%).

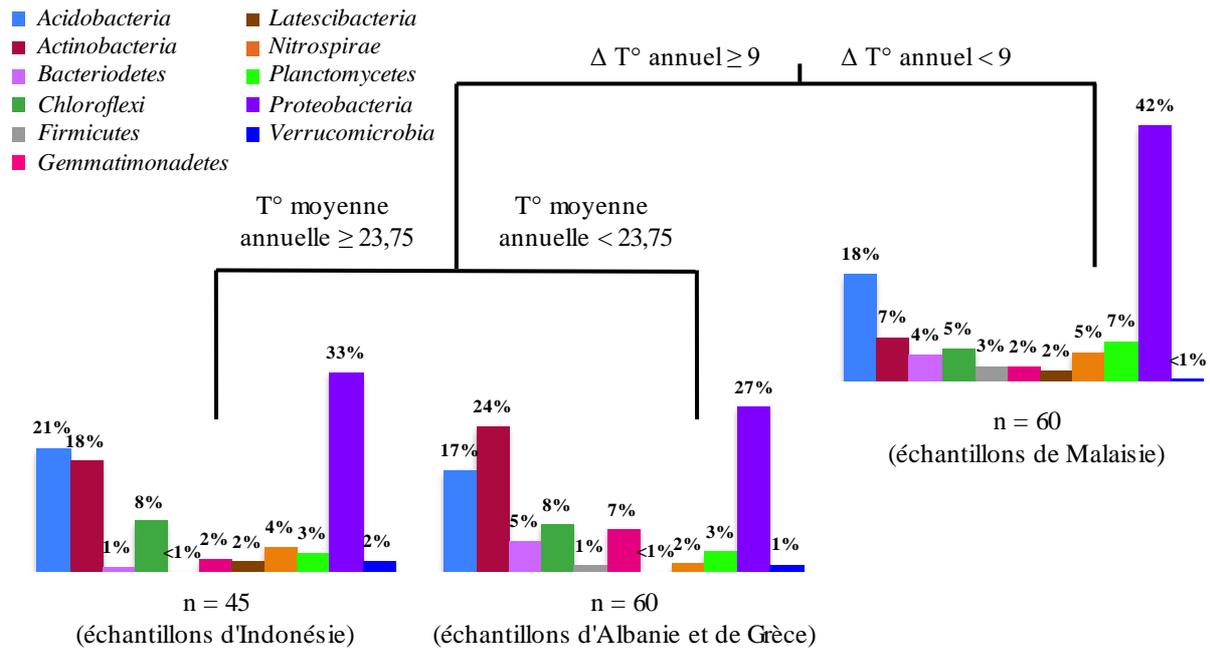


Figure 38 : Arbre de régression multivariable basé sur l'abondance relative des 11 phyla majoritaires en relation avec les variables abiotiques et climatiques
n correspond au nombre d'échantillons au niveau de chaque nœud

Afin de cerner, au niveau mondial, le déterminisme de la diversité bactérienne sur la base des OTUs présentes dans ces 165 terres rhizosphériques, une analyse de partition de variance (VPA) a été réalisée. La VPA a été effectuée en confrontant le jeu de données des OTUs à quatre tables explicatives : une table recensant les données abiotiques (pH, éléments échangeables, métaux extractibles au DTPA, Corg - 13 variables), une table recensant les données climatiques (température moyenne annuelle, précipitations annuelles et chutes de neige annuelles), une table avec les différentes espèces de plantes (33 espèces différentes) et une table regroupant les données topographiques des sites de prélèvements (2 variables avec l'altitude et l'exposition). Les variables colinéaires entres-elles ont été éliminées pour n'en conserver qu'une seule (conservation du Corg colinéaire avec C total et N total, et conservation de la T° moyenne annuelle colinéaire avec le ΔT° annuel).

Suite à cette analyse (Figure 39), il ressort que 53% de la variabilité de la diversité bactérienne de l'échantillonnage est expliquée par l'ensemble de ces quatre tables de données. Ce sont les paramètres physico-chimiques des terres rhizosphériques qui expliquent le mieux la diversité bactérienne, avec 9,6% d'explication contre 4,5% pour les données topographiques, 4,5% pour l'espèce végétale et uniquement 1,9% pour les données climatiques. Mais, si nous considérons dans sa globalité l'influence d'un facteur donné en association avec les autres paramètres, les données topographiques expliquent au total 20% de la diversité bactérienne, les données relatives aux paramètres physico-chimiques des terres rhizosphériques 34%, les données climatiques 58% et l'espèce végétale 64%. Ainsi, près des deux tiers de la diversité bactérienne s'expliquent uniquement par l'espèce végétale en association avec les données climatiques (33% sur les 53% expliqués, soit 63%).

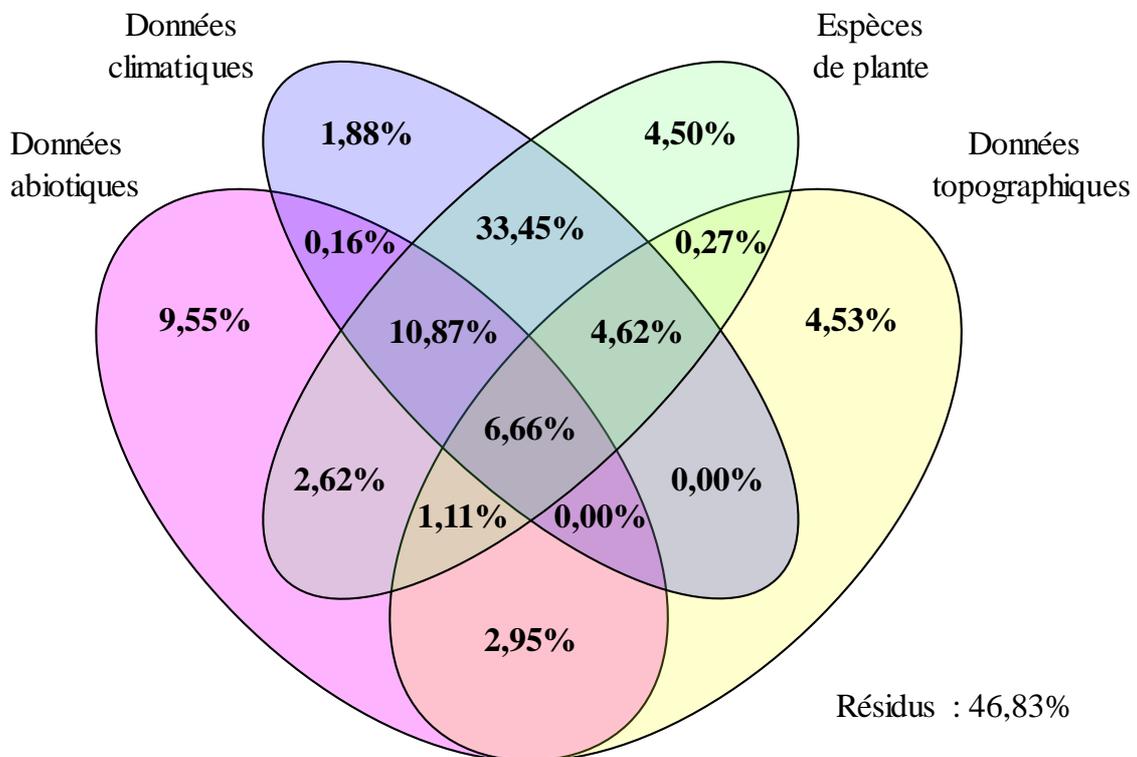


Figure 39 : Analyse de partition de la variance bactérienne au niveau OTUs en fonction des données abiotiques, climatiques, topographiques et de l'espèce de plante

4.4. La diversité fonctionnelle des communautés bactériennes au niveau mondial

Les métagénomés prédits par le package Tax4Fun permettent de retrouver, quelle que soit la région d'échantillonnage, les six grandes familles de gènes classiques. Ces familles appartiennent aux fonctions "métabolisme", "traitement de l'information génétique", "traitement de l'information environnementale", "processus cellulaires", "maladies humaines" et "système des organismes" (Figure 40). Les gènes liés à la fonction de métabolisme sont les plus représentés avec une moyenne de 60% et significativement moins abondants dans les rhizosphères des plantes échantillonnées en Malaisie (59%). Viennent ensuite la famille de gènes pour le traitement de l'information génétique (15%), celle dont les gènes sont liés au traitement de l'information environnementale (12%) et celle dont les gènes sont relatifs aux processus cellulaires (8,6%). Les familles de gènes liées aux maladies humaines (3,0%) et au système des organismes sont très peu représentées (1,3%). Les échantillons de Malaisie présentent les familles de gènes les plus abondantes pour les fonctions de traitement de l'information environnementale (13%) et les processus cellulaires (9,1%). Les échantillons de Grèce possèdent la plus grande abondance relative de la famille de gènes liée au traitement de l'information génétique (17%).

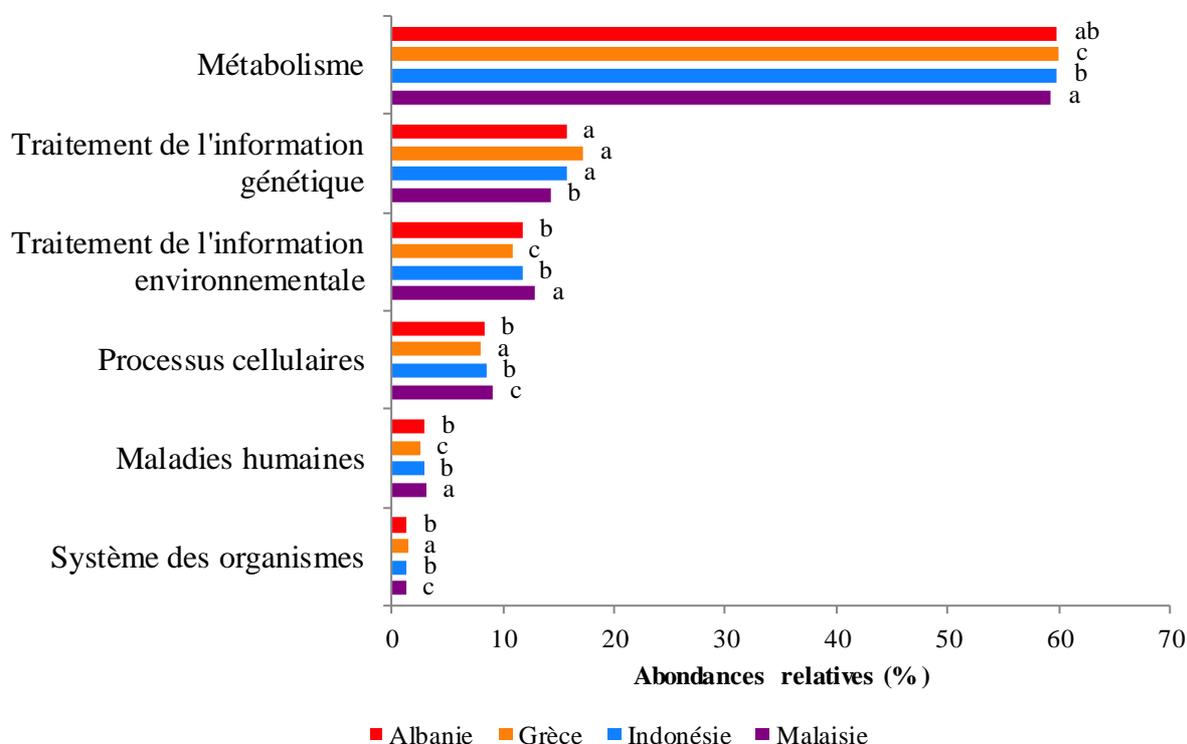


Figure 40 : Abondances relatives (%) des familles de fonctions prédites pour les communautés bactériennes rhizosphériques des plantes hyperaccumulatrices
 les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à $p = 0,05$ (test TukeyHSD)

A un niveau plus fin de l'analyse des familles de gènes, il est possible de retrouver 41 *KEGG Orthology* (KO) appartenant aux six grands groupes fonctionnels. Seuls les KO avec une abondance relative supérieure à 1% ont été conservés. Ainsi, seules les familles "métabolisme", "traitement de l'information génétique", "traitement de l'information environnementale", "processus cellulaires" et "maladies humaines" sont présentes (Figure 41).

Les familles de gènes liées au métabolisme sont bien représentées avec une prédominance des gènes impliqués dans les fonctions de métabolisme des carbohydrates (11%) ; l'abondance relative est notamment plus élevée pour les rhizosphères des plantes issues Albanie et de Grèce. Il existe aussi une représentativité élevée des familles de gènes impliquées dans le métabolisme des acides aminés (9,6%). Les familles de gènes liées au traitement de l'information environnementale avec une présence accrue des gènes de transport membranaire (7,5%), sont significativement plus présentes dans la rhizosphère des hyperaccumulateurs collectés en Malaisie. La famille liée aux processus cellulaires est représentée essentiellement par les gènes liés aux communautés cellulaires procaryotes (5,2%). Enfin, le traitement de l'information génétique est présent avec une majorité de gènes impliqués dans le repliement, le tri et la dégradation de protéines (5,3%) avec une abondance relative plus élevée en Grèce (7,2%). C'est en Malaisie que les gènes impliqués dans les maladies humaines sont les mieux représentés, avec les maladies infectieuses et la résistance aux antibiotiques.

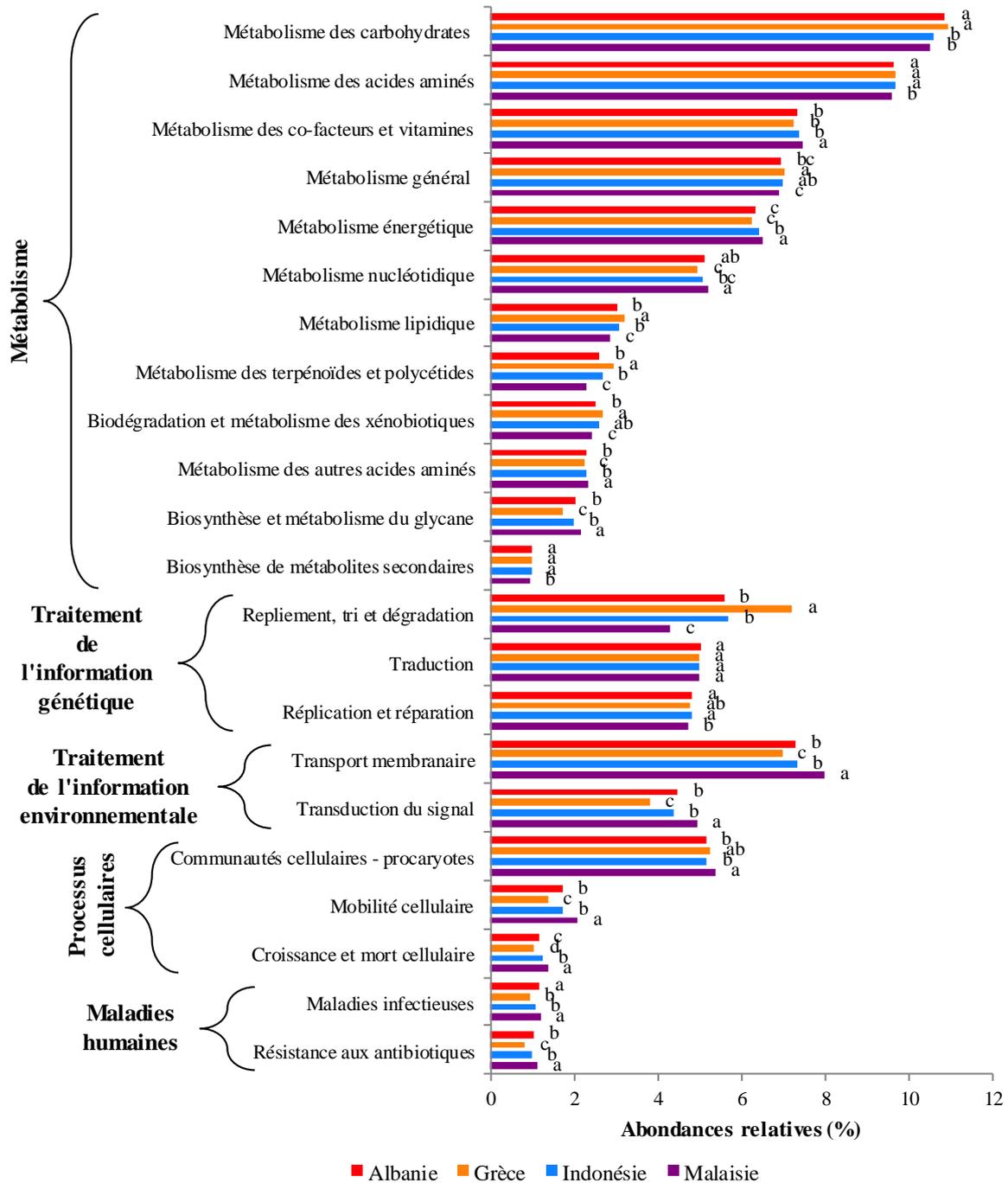


Figure 41 : Abondances relatives (%) des KO majoritaires (>1%) prédits pour les communautés bactériennes rhizosphériques des plantes hyperaccumulatrices

les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à $p = 0,05$ (test TukeyHSD)

Des corrélations de Spearman ont été calculées entre l'abondance relative des familles de gènes représentées à plus de 1% suite à l'analyse Tax4Fun et les données climatiques des sites d'échantillonnage des terres rhizosphériques (Figure 42). Seules les corrélations significatives ($p < 0,1$) ont été retenues. Les variables climatiques sont ressorties comme étant majeures dans le déterminisme de la diversité des communautés bactériennes rhizosphériques, raison pour laquelle nous les conservons dans cette analyse de corrélations. Néanmoins, des corrélations de Spearman ont été également calculées entre l'abondance relative des familles de gènes représentées à plus de 1% suite à l'analyse Tax4Fun et les variables physico-chimiques des sols (Annexe 3).

Les familles de gènes corrélées positivement avec la température moyenne annuelle sont corrélées négativement avec les chutes de neige cumulées, et inversement. Parmi ces corrélations, les fonctions liées aux processus cellulaires et au traitement de l'information environnementale sont corrélées positivement avec la température moyenne annuelle ($p < 0,001$). Les fonctions de réplication et réparation et de repliement, tri et dégradation liées au traitement de l'information génétique sont corrélées négativement avec ce facteur climatique ($p < 0,001$). Les corrélations sont plus variables au sein du groupe des fonctions liées au métabolisme. Une température élevée va favoriser la biosynthèse et le métabolisme du glycane ($p < 0,001$), le métabolisme des autres acides aminés ($p < 0,001$), des co-facteurs et vitamines ($p < 0,001$), énergétique ($p < 0,001$) et nucléotidique ($p = 0,009$). Les autres familles de gènes liées au métabolisme sont par contre corrélées négativement avec une température élevée ($p < 0,001$). Contrairement à la température moyenne annuelle et aux chutes de neige cumulées, la pluviométrie cumulée est corrélée à peu de fonctions : positivement avec le métabolisme énergétique ($p < 0,001$) et la croissance et mort cellulaire ($p < 0,001$), et négativement avec le métabolisme des carbohydrates ($p < 0,001$), la mobilité cellulaire ($p = 0,067$) et le transport membranaire ($p = 0,055$).

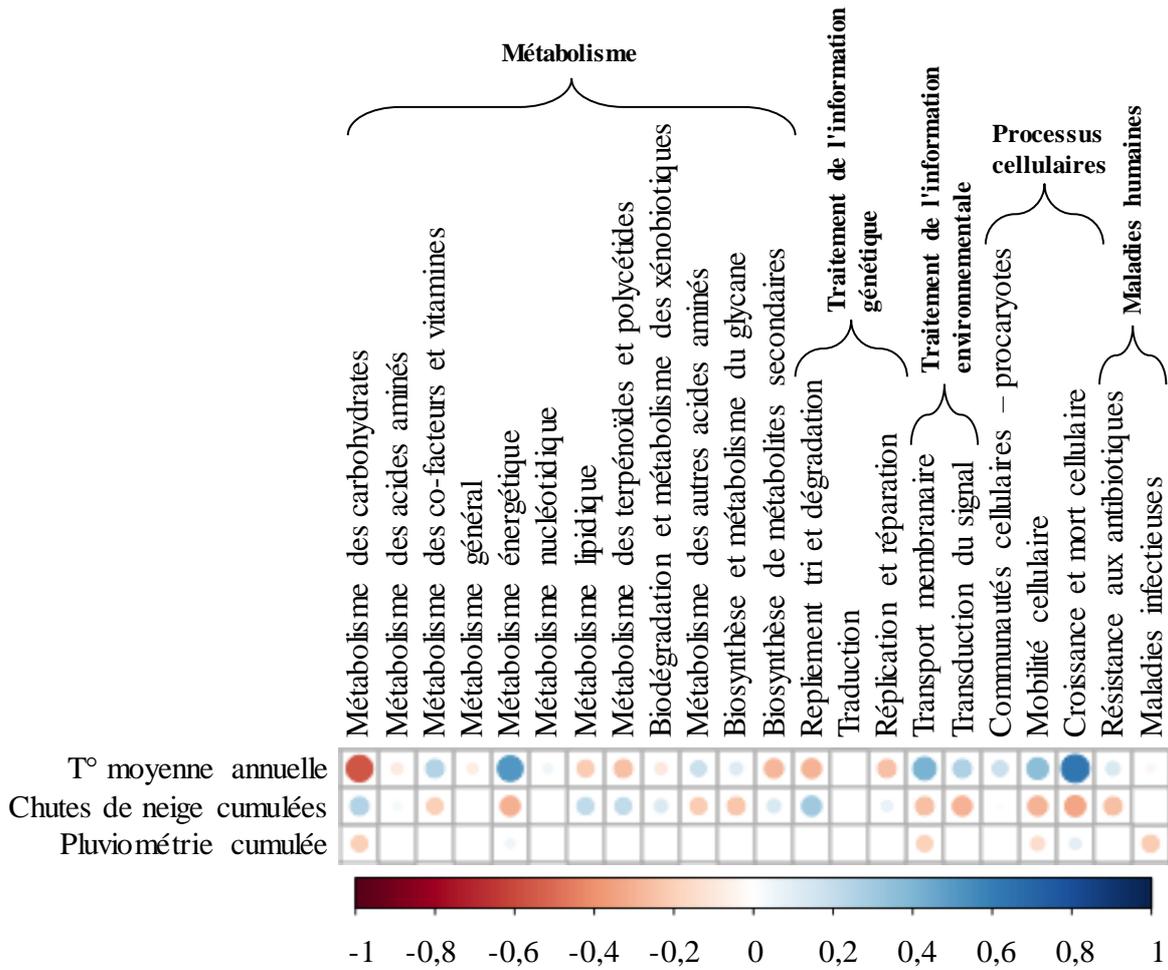


Figure 42 : Matrice de corrélations entre les données climatiques et les KO majoritaires (>1%) prédits des communautés bactériennes

basée sur le coefficient de corrélation r de Spearman, les blancs signalent que le coefficient n'est pas significatif ($p > 0,1$)

Discussion : Déterminisme de la diversité bactérienne rhizosphérique des hyperaccumulateurs de Ni

Les sols ultramafiques sont caractérisés par une forte toxicité métallique due à une concentration importante en éléments sidérophiles (Fe, Cr, Ni, Co, Mn et Mg), ainsi que par une faible teneur en éléments nutritifs tels que N, P, K et Ca. Les teneurs en métaux biodisponibles sont, en outre, élevées. Tous ces faits constituent par définition le syndrome serpentinique (Kazakou *et al.*, 2008). Les terres rhizosphériques collectées lors de cette étude présentent toutes des concentrations totales en Ni, Mg, Mn, Fe et un rapport Mg/Ca comparables à la gamme attendue pour des sols ultramafiques (Reeves, 1999 ; Freitas *et al.*, 2004 ; Ghaderian *et al.*, 2007 ; Kazakou *et al.*, 2010). Cependant, des variations dans les concentrations en ETM et les rapports Mg/Ca peuvent être observées entre les différents sites d'une même région, comme cela a été observé par Arianoutsou *et al.* (1993) en Californie et par Kazakou *et al.* (2010) lors de leur étude en Grèce. Ceci peut être attribué aux processus d'altération et de lixiviation, combinés à l'activité biologique, qui peuvent différer selon la localisation des sites de prélèvement (Alexander, 2004).

En effet, il est connu que l'altération joue un rôle important dans les processus pédologiques, en particulier sous climat tropical. L'Indonésie, tout comme le Brésil, Cuba, la Papouasie Nouvelle-Guinée, l'Australie et la Nouvelle Calédonie, comprend d'importants massifs ultramafiques dont l'altération, sous climat tropical, conduit à la formation d'une couverture latéritique conséquente qui peut atteindre plusieurs mètres (Nahon, 2003). L'altération des roches ultramafiques en milieu intertropical est bien documentée en raison de l'accumulation en éléments métalliques au sein des couvertures latéritiques et des gisements miniers qui en découlent. En climat intertropical, la lixiviation intense des éléments mobiles conduit à la perte en certains éléments (Mg et Si) et à la concentration d'autres, comme les métaux (Fe, Al, Cr, Ni, Co ou Cu). Dans les régions au climat froid ou tempéré humide, différents processus pédogéniques spécifiques importants peuvent se développer sur ces affleurements ultramafiques : le lessivage rapide du Ca, la formation à la surface d'un humus noir de type mull et la formation, sous la surface, d'un horizon de texture argileuse, généralement mal structuré après le lessivage du Ca (Duvigneaud, 1966).

En conséquence, ces sols présentent une fertilité chimique faible (Whittaker, 1954 ; Proctor et Woodell, 1975). Ceci a engendré une sélection de plantes adaptées à ces milieux, telles les plantes hyperaccumulatrices, formant des écosystèmes spécifiques (Jaffré *et al.*, 1976 ; Reeves *et al.*, 2007). De nombreuses plantes hyperaccumulatrices de Ni sont ainsi présentes sur ces sols mais seulement une partie de ces espèces a pu être caractérisée à ce jour. La découverte de nouveaux hyperaccumulateurs se fait aujourd'hui à partir de l'étude de collections d'herbiers, majoritairement à l'aide d'un spectromètre à fluorescence de rayon X (analyseur XRF) portable, permettant de connaître les concentrations élémentaires dans les différentes parties de plantes de collection, sans conduire à une destruction des échantillons (Gei *et al.*, 2018). Avant l'utilisation de cet équipement relativement coûteux, la recherche d'hyperaccumulateurs se faisait sur le terrain, à l'aide d'un test colorimétrique visuel et rapide, en utilisant des papiers filtres imprégnés de diméthylglyoxime (DMG).

C'est sur la base de ces deux approches que la flore hyperaccumulatrice des Balkans a été étudiée, permettant ainsi d'avoir une bonne connaissance de la diversité des hyperaccumulateurs, en particulier en Albanie (Shallari *et al.*, 1998 ; Bani *et al.*, 2009 ; Cecchi *et al.*, 2018). L'Albanie possède une flore hyperaccumulatrice de Ni très riche, parmi laquelle *O. chalcidica* est la plus fréquente. D'autres Brassicacées hyperaccumulatrices de Ni peuvent également être trouvées dans cette région, telles *O. smolikana*, *O. rigida* et *N. ochroleuca* (Cecchi *et al.*, 2018). Suite à notre échantillonnage, c'est *O. smolikana* qui possède, en moyenne, les plus fortes concentrations en Ni dans ses parties aériennes alors que *O. chalcidica* possède les plus faibles. C'est pourtant cette dernière qui possède le plus fort potentiel d'hyperaccumulation, avec des concentrations dans ses parties aériennes allant jusque 15 000 μg de Ni g^{-1} et un facteur de bioconcentration pouvant atteindre la valeur de 819. C'est pour cet extraordinaire potentiel de phytoextraction que *O. chalcidica* a été la première plante hyperaccumulatrice utilisée dans les procédés d'agromine. Les premières parcelles d'agromine se sont appuyées sur ce végétal et ont été implantées sur les sols ultramafiques d'Albanie. Elles ont démontré qu'il était possible d'extraire plus de 120 kg de Ni ha^{-1} , avec une concentration dans la biomasse sèche proche de 1 % (Bani *et al.*, 2007, 2009, 2015). Néanmoins, des études antérieures constatent clairement que le potentiel de phytoextraction de différentes populations de *O. chalcidica* peut varier en fonction du site, ce qui explique les variations retrouvées suite à nos analyses (Chardot *et al.*, 2005).

Concernant le territoire de Sabah Park en Malaisie, de nombreuses plantes hyperaccumulatrices de Ni ont été recensées et la plupart appartiennent à l'ordre des Malpighiales (familles des *Dichapetalaceae*, *Phyllanthaceae*, *Salicaceae*, *Violaceae*) (van der Ent *et al.*, 2015b). Suite à notre échantillonnage, les plantes qui possèdent les plus fortes concentrations en Ni dans leurs feuilles sont *P. securinegoides* (33 600 $\mu\text{g g}^{-1}$), *R. bengalensis* (29 600 $\mu\text{g g}^{-1}$) et *R. javanica* (20 800 $\mu\text{g g}^{-1}$). Lors de précédentes études, les concentrations retrouvées dans les feuilles de ces plantes allaient de 10 700 à 25 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ pour *P. securinegoides* (van der Ent *et al.*, 2017), de 1 à 17 500 $\mu\text{g g}^{-1}$ pour *R. bengalensis* (Brooks et Wither, 1977 ; van der Ent *et al.*, 2017) et de 2 à 6 000 $\mu\text{g g}^{-1}$ pour *R. javanica* (Brooks *et al.*, 1977b ; van der Ent *et al.*, 2013b). Contrairement à nos analyses, de faibles concentrations foliaires ont été mesurées chez les deux espèces de *Rinorea*. Ce genre est connu pour être un hyperaccumulateur de Ni facultatif, signifiant qu'il peut être retrouvé à la fois sur des sols ultramafiques ou non ; le caractère d'hyperaccumulation n'étant retrouvé que chez les spécimens qui se développent sur sols ultramafiques (Brooks et Wither, 1977 ; Pollard *et al.*, 2014). Or, notre échantillonnage n'a porté que sur des sols ultramafiques, ce qui explique les fortes concentrations en Ni retrouvées. Deux des plantes échantillonnées en Malaisie, *M. cf. lowii* et *Timonius* sp., qui ont réagi positivement au test DMG sur le terrain, montrent cependant, après analyse en laboratoire par ICP-AES, de faibles concentrations en Ni dans leurs feuilles. Les plantes récoltées étaient de petites tailles, donc potentiellement souillées par des particules de terre ultramafique environnante. Ces particules de terre, concentrées en Ni, ont pu entraîner une réaction positive avec le DMG. Cependant, une fois prélevées, les plantes ont été lavées à l'eau distillée, permettant ainsi une élimination de ces particules et la détection de "faux positifs".

L'hyperaccumulation d'Al a été définie par Hutchinson (1943) à 1 000 $\mu\text{g g}^{-1}$ de plante sèche. Ceci est communément retrouvé dans les familles des *Proteaceae*, *Anisophylleaceae*, *Polygalaceae*, *Cunoniaceae* et *Rubiaceae* (Jansen *et al.*, 2002). Lors d'une étude à Sabah Park en 2010-2014, van der Ent et ses collaborateurs ont recensé 38 hyperaccumulateurs d'Al et sept appartenaient à la famille des *Rubiaceae* (van der Ent *et al.*, 2018). Notre échantillonnage a révélé que la liane *P. sarmentosa* (*Rubiaceae*), qui hyperaccumule le Ni, présente également de fortes concentrations en Al, avec 1 700 $\mu\text{g g}^{-1}$ mesurés dans les feuilles du spécimen prélevé sur site 10 ; site qui possède les plus fortes concentrations en Al. Cependant, cette plante possède également une concentration en Al dans ses racines de l'ordre de 1 500 $\mu\text{g g}^{-1}$, ce qui induit un rapport des concentrations en métal feuilles:racines inférieur à 1. Ceci conduit à ne pas considérer *P. sarmentosa* comme hyperaccumulatrice d'Al.

Les avancées les plus notables, en termes de caractérisation de la flore endémique des sites ultramafiques, ont été fréquemment réalisées au niveau des aires exploitées par l'activité minière. En effet, d'une part, l'activité minière met en péril la biodiversité endémique des sites ultramafiques et motive donc les scientifiques à s'intéresser à cette flore. D'autre part, les entreprises minières sont souvent conduites à caractériser et à préserver cette biodiversité, du fait de réglementations de plus en plus strictes concernant la protection des sites. C'est dans ce cadre qu'ERAMET a envisagé, en partenariat avec des chercheurs, de réaliser un inventaire des espèces végétales endémiques de leurs futurs sites d'exploitation présents sur l'île d'Halmahera, dans la région de Weda Bay. Plus de 800 échantillons de parties de végétaux ainsi que 90 échantillons de terre (rhizosphérique ou non) ont été collectés. Ceci a conduit à la découverte de sept hyperaccumulateurs de Ni appartenant à des familles botaniques très diverses (Lopez *et al.*, 2018). Ces hyperaccumulateurs sont *Aristolchia* sp. (*Aristolchiaceae*), *F. trachypison* (*Moraceae*), *G. moluccanum* (*Phyllanthaceae*), *Macaranga* sp. (*Euphorbiaceae*), *P. roxburghioides* (*Sapotaceae*), *R. aff. bengalensis* (*Violaceae*) et *T. morotaiense* (*Tiliaceae*). Les concentrations en Ni dans ces plantes hyperaccumulatrices suivent le gradient feuilles > écorce > tiges > fruits > racines > bois. Les fortes concentrations en Ni dans l'écorce semblent être une caractéristique des plantes hyperaccumulatrices ligneuses. En effet, ceci a déjà été constaté chez des plantes hyperaccumulatrices présentes sur le territoire de Sabah (van der Ent *et al.*, 2017). De plus, les concentrations en Ni dans ces plantes vont de pair avec celles en Ca ($p < 0,001$). Les tissus des plantes contiennent des cristaux d'oxalate de Ca, pouvant se lier à la fois au Ni et au Ca (Ballard *et al.*, 2014 ; Schmitt *et al.*, 2016). La formation de ces cristaux de stockage est un mécanisme qui a été avancé comme pouvant réduire l'effet toxique des métaux (He *et al.*, 2014). Ceci peut expliquer la co-régulation de ces deux éléments chez les plantes hyperaccumulatrices de Ni.

C'est *R. aff. bengalensis* qui possède les plus fortes concentrations en Ni dans ses feuilles, suivie par *P. roxburghioides*. Pour cette étude en Indonésie, *R. aff. bengalensis* est considérée comme "obligatoire" car retrouvée uniquement sur les substrats ultramafiques. De plus, cet hyperaccumulateur présente une hyperaccumulation de Co du fait d'une concentration de 575 $\mu\text{g g}^{-1}$ mesurée dans ses feuilles. Les espèces *F. trachypison* et *T. morotaiense*, largement retrouvées lors de notre échantillonnage, sont dites "facultatifs", capables de se développer sur sols non ultramafiques et hyperaccumulant le Ni uniquement lorsque les concentrations dans les sols sont importantes (Brooks et Wither, 1977 ; Pollard *et al.*, 2014).

Ainsi, l'échantillonnage réalisé durant cette thèse a permis le prélèvement de 165 plantes se développant dans 4 zones ultramafiques, réparties au niveau mondial. Pour les concentrations élémentaires des parties aériennes, les espèces hyperaccumulatrices échantillonnées présentent toutes un rapport Mg/Ca inférieur à 1, ce qui suggère que ces espèces absorbent préférentiellement le Ca. Ceci a également été observé par Lombini *et al.* (1998) chez des espèces hyperaccumulatrices présentes en Italie. En effet, selon ces auteurs, les espèces qui poussent sur ces sols ultramafiques limiteraient l'absorption du Mg et montreraient une plus grande capacité d'absorption du Ca, leur conférant une plus forte capacité de survie dans des environnements faiblement pourvus en Ca (Walker *et al.*, 1955 ; Brady *et al.*, 2005). Cette particularité a été définie comme relevant d'un mécanisme sélectif.

Tout végétal interagit étroitement avec les microbes rhizosphériques, dont certains peuvent améliorer sa croissance et son développement en augmentant l'absorption des nutriments, mais aussi sa résistance à certains agents pathogènes et à différents stress (Lebeau *et al.*, 2008). Les organismes rhizosphériques peuvent également modifier la mobilité et la disponibilité des métaux présents dans le sol (Abou-Shanab *et al.*, 2003a ; Lebeau *et al.*, 2008 ; Sessitsch *et al.*, 2013 ; Benizri et Kidd, 2018), favorisant le transfert des ETM de la rhizosphère à la plante (Whiting *et al.*, 2001a). Or, les métaux sont connus pour leurs effets toxiques sur la microflore tellurique et il pourrait être supposé que les communautés microbiennes des sols ultramafiques sont influencées négativement par les fortes concentrations en métaux. Il a ainsi été montré que la présence de métaux peut réduire la biomasse microbienne (Wang *et al.*, 2008), affecter les activités enzymatiques microbiennes (Kuperman et Carreiro, 1997 ; Kandeler *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2008) et réduire la minéralisation de la matière organique des sols (Epelde *et al.*, 2012). En outre, plusieurs études ont montré que la présence d'ETM entraînait une modification de la structure et de la diversité des communautés microbiennes (Sandaa *et al.*, 1999 ; Mengoni *et al.*, 2001 ; Pessoa-Filho *et al.*, 2015). Cependant, Mengoni *et al.* (2001), Pal *et al.* (2007), Roesch *et al.* (2007), Oline (2006), Rajkumar *et al.* (2009), et Delmont *et al.* (2012) ont mis en évidence que les trois phyla majoritaires sont les *Proteobacteria*, les *Acidobacteria* et les *Actinobacteria*, qu'il s'agisse d'environnements avec de fortes concentrations en métaux ou non.

Notre échantillonnage, portant sur 165 terres rhizosphériques provenant de régions ultramafiqes à climat contrasté, confirme ces résultats, et ce quel que soit le site d'étude. En effet, le phylum le mieux représenté est celui des *Proteobacteria* (35%). Viennent ensuite ceux des *Acidobacteria* (19%) et *Actinobacteria* (15%).

Les bactéries appartenant au phylum des *Proteobacteria* sont définies comme étant copiotrophes (Fierer *et al.*, 2007 ; Lienhard *et al.*, 2014). Or, il est actuellement admis que les bactéries copiotrophes (à stratégie r) dominent dans les environnements riches en Ca, telle la rhizosphère, et prospèrent dans la zone des poils absorbants racinaires, caractérisée par une haute disponibilité en nutriments (Semenov *et al.*, 1999 ; Buée *et al.*, 2009a). Ainsi, la teneur moyenne en matière organique relativement élevée dans les rhizosphères des plantes échantillonnées, permet d'expliquer la forte représentativité de ce phylum. De plus, les *Proteobacteria* présentent une corrélation positive avec le gradient altitudinal. Nos sites de prélèvements vont du niveau de la mer jusqu'à 1 680 m d'altitude, favorisant la proportion de ce phylum aux sites élevés.

Les *Actinobacteria* sont connues pour être largement représentées dans la rhizosphère de nombreuses espèces végétales (Singh *et al.*, 2007). En effet, les bactéries affiliées à ce phylum sont également des copiotrophes à même de dégrader la matière organique et leur abondance dépendra de la qualité et quantité de cette dernière (Kopecky *et al.*, 2011). Ainsi, nos résultats sont en accord avec ceux de nombreux auteurs montrant que l'abondance des *Actinobacteria* est plus importante dans la rhizosphère de plantes se développant sur des sols riches en matière organique (Acosta-Martínez *et al.*, 2008 ; Tkacz *et al.*, 2015). De plus, ces bactéries sont connues pour être résistantes aux concentrations toxiques en ETM dans les sols et en particulier au Ni (Sessitsch *et al.*, 2013). En effet, les réponses cellulaires adaptatives vis-à-vis du Ni chez les *Actinobacteria* ont été étudiées (Schmidt *et al.*, 2005) et il a été montré que leur fort métabolisme secondaire leur permet de faire face à des facteurs de stress, y compris des ETM, même à des taux *a priori* toxiques (So *et al.*, 2001). Dans notre étude, l'abondance relative des *Actinobacteria* apparaît positivement corrélée avec les métaux extractibles au DTPA dans les terres rhizosphériques d'Indonésie et d'Albanie. Cependant, des corrélations inverses ont été observées pour les terres rhizosphériques de Malaisie. En Indonésie et Albanie, le pH moyen des sols se situe aux alentours de 6,74, soit un pH neutre, alors qu'il est légèrement acide (6,59) en Malaisie. Or, les *Actinobacteria* sont connues pour être davantage présentes en sol à pH plutôt alcalin, comme montré par Lauber *et al.* (2009) et Nemergut *et al.* (2010).

Le phylum des *Acidobacteria* est connu pour être l'un des phyla bactériens les plus abondants dans les écosystèmes terrestres (Barns *et al.*, 1999), jouant un rôle crucial dans le cycle du C en raison de la capacité des bactéries appartenant à ce phylum à dégrader les polysaccharides complexes, telles la cellulose et la lignine (Ward *et al.*, 2009). Ceci peut ainsi expliquer le fait que ce phylum fasse partie, dans notre étude, des phyla dominants dans la mesure où les terres récoltées sont rhizosphériques et ainsi riches en composés exsudés tels les mucilages (polysaccharides) mais aussi en cellules desquamées ou lysées. En outre, les terres rhizosphériques de Grèce, caractérisées par les valeurs de pH les plus élevées, sont les seules possédant un ratio *Acidobacteria/Actinobacteria* inférieur à 1. Ceci corrobore les travaux de Naether *et al.* (2012) qui montrent que l'abondance relative du phylum des *Acidobacteria* est plus élevée dans les sols dont les valeurs de pH sont les plus basses.

Le phylum des *Chloroflexi* présente une abondance relative moyenne de l'ordre de 7% pour l'ensemble des terres rhizosphériques échantillonnées. La plupart des études présentent une proportion de *Chloroflexi* allant de 1,7 à 10,3% (Chodak *et al.*, 2013 ; Gołębiewski *et al.*, 2014 ; Yasir *et al.*, 2015). Ce phylum est cependant bien représenté dans les environnements extrêmes tels les sources chaudes (10 à 15% des phylotypes détectés étaient liés au phylum *Chloroflexi*) ou les lacs hypersalins (21 à 39% des clones bactériens d'ARNr analysés) (Boomer *et al.*, 2002 ; Nübel *et al.*, 2002 ; Yamada et Sekiguchi, 2009). De plus, ce phylum a été trouvé prédominant dans des échantillons de déblais de mines de Ni (Herrera *et al.*, 2007) et dans la rhizosphère de *O. chalcidica* se développant sur sols ultramafiques grecs (Lopez *et al.*, 2017). Les sols ultramafiques, déficients en éléments nutritifs essentiels mais, *a contrario*, riches en métaux lourds tels le Ni, sont considérés comme des environnements stressants en raison de leur composition minérale extrême pour de nombreux microorganismes (Pal *et al.*, 2005 ; Mengoni *et al.*, 2010). Ceci pourrait donc expliquer la forte représentativité de ce phylum, en sols ultramafiques. Cependant, l'abondance relative de ce phylum présente des corrélations négatives avec les teneurs en métaux extractibles au DTPA, suggérant une certaine sensibilité aux métaux des bactéries appartenant à ce phylum. Néanmoins, l'abondance relative des *Chloroflexi* est corrélée négativement avec les pourcentages en N et C et le K échangeable des terres étudiées, ce qui pourrait expliquer, du fait de son adaptation aux environnements stressants, sa meilleure représentativité par rapport aux autres phyla dans les environnements pauvres en nutriments.

Concernant les autres phyla abondants dans la rhizosphère des plantes échantillonnées, certaines particularités ressortent de notre étude, selon le pays considéré.

En effet, le phylum des *Latescibacteria* montre une abondance relative supérieure à 1% uniquement en Indonésie (2,5%) et Malaisie (1, 8%). Ce phylum est souvent retrouvé en proportions négligeables dans les sols, mais, *a contrario*, représentait 4,4% de l'abondance relative des communautés bactériennes tellurique d'un champ cultivé sans labour dans la région de La Pampa en Argentine (Carbonetto *et al.*, 2014 ; Farag *et al.*, 2017). Le climat de cette région d'Amérique du Sud est de type subtropical humide (Cfa), montrant des similitudes avec les climats tropicaux d'Indonésie et de Malaisie, qui se caractérisent par de faibles écarts de températures et une pluviométrie annuelle dépassant les 1 000 mm. Ceci pourrait donc expliquer, tout comme dans ces études, la présence notable des *Latescibacteria*. En outre, les travaux de Farag *et al.* (2017) montrent une abondance relative d'environ 5% pour le phylum des *Nitrospirae*. Pour les mêmes raisons que précédemment, la similitude des climats entre leur zone d'étude et les zones d'échantillonnage que nous avons prospectées en Indonésie et Malaisie, pourrait expliquer la bonne représentation de ce phylum. En effet les abondances relatives que nous avons établies sont similaires, respectivement de 5,2 pour l'Indonésie et 4,9% pour la Malaisie, et de plus, statistiquement supérieures à celles retrouvées en Albanie (2,4%) et Grèce (0,73%).

Les *Gemmatimonadetes* sont mieux représentés en Albanie, dont le climat est le plus aride avec les plus faibles précipitations annuelles enregistrées (567 mm). L'abondance relative des *Gemmatimonadetes* dans ce pays est relativement élevée, atteignant 10% quel que soit le site étudié. Ceci est en adéquation avec les observations de DeBruyn *et al.* (2011), qui montre que les proportions les plus élevées de *Gemmatimonadetes* se retrouvent en régions arides. Ces résultats suggèrent une adaptation des bactéries appartenant à ce phylum aux environnements à faible humidité. En effet, plusieurs études (Chanal *et al.*, 2006 ; Costello *et al.*, 2009) soulignent que les abondances relatives des *Gemmatimonadetes* sont inversement corrélées à l'humidité des sols.

Sur les 14 088 OTUs communes à l'ensemble des pays, uniquement 73 sont retrouvées avec une abondance relative supérieure à 1% dans au moins l'un des pays prospectés. Comme pour les résultats de séquençage haut débit, les phyla retrouvés majoritairement, au niveau mondial dans les terres rhizosphériques des plantes hyperaccumulatrices de Ni, sont ceux des *Proteobacteria* (genres *Bradyrhizobium*, *Rhizobacter* et *Azospira*), *Actinobacteria* (genres *Streptomyces*, *Gaiella* et *Solirubrobacter*) et *Acidobacteria* (majoritairement la famille des *Blastocatellaceae*). L'OTU affiliée au genre *Bradyrhizobium* est la seule commune à l'ensemble des rhizosphères avec une abondance relative supérieure à 1%. Les bactéries affiliées au genre *Bradyrhizobium* ont la capacité à former des nodules avec les légumineuses, mais sont retrouvées dans l'environnement rhizosphérique de nombreuses plantes (Sachs *et al.*, 2009). La forte représentativité de ce genre bactérien est explicable par le caractère ultramafique des sols de cette étude. En effet, ils sont riches en ETM et, de plus, possèdent un pH relativement acide. Or, les bactéries affiliées au genre *Bradyrhizobium* se développent dans des pH acides et peuvent être retrouvées dans des environnements riches en ETM, notamment en Al (Ozawa *et al.*, 1999).

Nos travaux, menés à échelle d'une région climatique (pour les échantillons collectés en Albanie, en Indonésie ou en Malaisie), concluent sur le rôle primordial des paramètres physico-chimiques des différentes terres rhizosphériques pour la structuration et la diversité des communautés bactériennes. En effet, qu'elles soient considérées seules ou en association avec d'autres paramètres, ce sont bien les données abiotiques qui permettent d'expliquer environ 82% de la diversité bactérienne. En prenant pour exemple le cas du site 07 en Malaisie, le phylum des *Firmicutes* est significativement mieux représenté en comparaison aux autres sites, alors que celui des *Acidobacteria* présente les abondances relatives les plus faibles. Or, c'est ce site qui montre des valeurs de pH des terres les plus basiques. Ceci explique à la fois la faible représentativité des *Acidobacteria*, favorisés à pH acides (Naether *et al.*, 2012) et les fortes abondances relatives des *Firmicutes*, favorisés dans les sols à pH basiques (Lauber *et al.*, 2009). Cependant, bien que généralement l'indice de Shannon est plus élevé à pH plutôt basiques (Fierer et Jackson, 2006), c'est pour le site 07 que cet indice est le plus faible. Il semblerait donc que le phylum des *Firmicutes*, favorisé par des conditions physico-chimiques propices à son installation, devienne dominant, ce qui implique une diminution de la diversité globale au sein des terres rhizosphériques de ce site.

Quoiqu'il en soit, ceci souligne l'importance des variables physico-chimiques sur la structure et la diversité des communautés bactériennes rhizosphériques, tout comme l'ont montré d'autres auteurs au travers de leurs études (Seldin *et al.*, 1998 ; Marschner *et al.*, 2004 ; Buée *et al.*, 2009a).

Le second facteur explicatif de la diversité des communautés bactériennes rhizosphériques lors de notre étude se base sur les données topographiques de nos sites d'échantillonnage, à savoir l'exposition et l'altitude. C'est en Indonésie que la topographie a le plus faible pourcentage explicatif en comparaison de l'explication totale, à savoir 27%, alors qu'il est de 56% en Malaisie et de 62% en Albanie. C'est également en Indonésie que le gradient altitudinal est le plus faible, allant de 0 à 981 m d'altitude. L'altitude intervient sur l'abondance relative de nombreux phyla en Albanie et Malaisie, mais ceci est plus modéré en Indonésie, où uniquement les phyla *Proteobacteria* et *Armatimonadetes* sont favorisés aux altitudes élevées, alors que les phyla *Actinobacteria* et *Nitrospirae* y sont défavorisés. En revanche, quel que soit le pays d'échantillonnage, le phyla des *Bacteroidetes* est le seul n'étant jamais influencé par l'altitude. Siles *et al.* (2017) et Xu *et al.* (2015) ont mis en évidence la relation entre la diversité bactérienne et le gradient altitudinal ; ce dernier étant à mettre cependant en relation avec la dégradation de la matière organique. Les bactéries appartenant au phylum des *Bacteroidetes* sont connues pour avoir colonisé tous les types d'environnements et possèdent une grande plasticité de génome leur permettant de dégrader des sources de carbone diversifiées (Thomas *et al.*, 2011). Ainsi, concernant ce phyla, quels que soient l'altitude ou l'état de la matière organique, son abondance relative n'est pas affectée.

La rhizosphère, correspondant à la fine zone du sol soumise à l'influence des racines vivantes, se limite à quelques millimètres d'épaisseur (en excluant les mycorhizes). Au niveau de cette interface particulière, les racines exercent différentes actions sur le milieu extérieur et créent ainsi des conditions physico-chimiques différentes de celles du sol non rhizosphérique. Il a été montré au travers d'études que les rhizodépôts avaient un rôle structurant majeur des communautés microbiennes à proximité des racines (Grayston *et al.*, 1998 ; Marschner *et al.*, 2011 ; Berendsen *et al.*, 2012). Pourtant, suite à nos analyses, l'espèce de plante n'a que peu d'influence sur le déterminisme de la diversité des communautés bactériennes, lors d'un échantillonnage réalisé à une échelle spatiale réduite. En effet, uniquement 23% de l'explication totale, du déterminisme de la diversité bactérienne, est donnée par l'espèce de plante en association avec les autres paramètres.

Cependant, une exception existe pour *R. bengalensis* qui, contrairement aux autres espèces végétales, semble influencer la diversité de ses communautés bactériennes rhizosphériques. Une hypothèse pourrait être la présence de composés particuliers dans ses exsudats racinaires qui attireraient un cortège microbien spécifique. Les fortes concentrations en Ni extractible au DTPA mesurées dans les rhizosphères de *R. bengalensis* peuvent également être une explication. Cette espèce possède de larges feuilles mais un petit système racinaire. Les concentrations élevées en Ni dans ses parties aériennes suggèrent que cette plante possède un système de transpiration très efficace, permettant de concentrer le Ni sous forme disponible dans sa rhizosphère et de le transporter vers ses parties aériennes par effet de flux massique. Ainsi, cette plante serait apte à s'entourer, au niveau de sa rhizosphère, d'un cortège de microorganismes particuliers l'aidant à s'adapter à cet environnement (Burd *et al.*, 1998, 2000 ; Khan, 2005). En effet, c'est sur les sites 10 et 13 en Indonésie, caractérisés par des concentrations en Ni élevées, que *R. bengalensis* présente au niveau de sa rhizosphère les abondances relatives en *Actinobacteria* les plus élevées ; phylum corrélé positivement avec de fortes teneurs en Ni. Or, il est connu que de nombreuses bactéries appartenant au phylum des *Actinobacteria* sont capables de survivre dans des conditions extrêmes, tels les sols pollués ou naturellement bien pourvus en métaux et qu'elles sont capables de produire des biosurfactants qui augmentent la biodisponibilité des métaux (Alvarez *et al.*, 2017).

Par ailleurs, nos travaux mettent en évidence l'existence d'OTUs rhizosphériques spécifiques à *R. bengalensis*, qui, bien que moins nombreuses que celles estimées pour *F. trachypison* et *T. morotaiense*, pourraient être adaptées et résistantes à cet environnement métallifère et apte à aider *R. bengalensis* à se développer en sol ultramafique. Dans le contexte malaisien, le quatrième phylum le plus abondant est celui des *Rokubacteria* (6%). Ce phylum se rencontre dans divers écosystèmes mais souvent avec une abondance relative inférieure à 1% (Becraft *et al.*, 2017), à l'exception d'une étude menée en Argentine sur la rhizosphère de soja (Figuerola *et al.*, 2015). Ce phylum, ainsi que celui des *Gemmatimonadetes*, sont plus abondants dans les rhizosphères de *R. bengalensis*, avec des abondances relatives de l'ordre de 9% pour *Rokubacteria* et 4% pour *Gemmatimonadetes*. En conséquence, il semblerait qu'une rhizosphère présentant des teneurs élevées en Ni extractible au DTPA en Malaisie, favoriserait la présence de *Rokubacteria* et *Gemmatimonadetes*. Ces deux phyla sont, en outre, corrélés positivement avec le Ni extractible au DTPA. Ceci pourrait donc expliquer en partie que la diversité bactérienne présente dans la rhizosphère de *R. bengalensis* semble être davantage influencée par la plante elle-même, du fait d'une physiologie particulière, que par les paramètres physico-chimiques des sites d'échantillonnage.

Ainsi, hormis le cas particulier de *R. bengalensis*, nos travaux mettent en évidence, qu'à un niveau d'échelle spatial réduit, les paramètres physico-chimiques apparaissent déterminants dans la structuration et la diversité des communautés bactériennes de la rhizosphère des plantes hyperaccumulatrices de Ni.

Si l'on change d'échelle, et que nous nous intéressons à une échelle mondiale, le climat joue un rôle prépondérant sur la structure et la diversité des communautés bactériennes rhizosphériques des plantes hyperaccumulatrices de Ni, expliquant au total 58% de cette diversité, alors que les paramètres physico-chimiques des terres rhizosphériques échantillonnées n'expliquent plus que 34% et les données topographiques seulement 20%. En effet, au niveau des phyla, le meilleur indicateur est la température (et la variation de température annuelle), permettant une répartition des échantillons selon qu'ils proviennent d'un climat Csa (Albanie et Grèce), Af (Indonésie) ou Am (Malaisie). Nos observations corroborent les résultats de récentes études, comme celle de Bahram *et al.* (2018) qui montrent, sur la base d'approche de séquençage haut débit appliquée à plus de 7 560 échantillons de terre prélevés au niveau mondial (zones tropicales, tempérées et boréales), que la diversité génétique bactérienne dépend du climat et donc de la latitude.

En effet, la caractérisation première du climat d'une région donnée se fait par la situation moyenne en latitude de cette région : c'est pourquoi, à l'échelle planétaire, les zones méridiennes se succèdent en larges ceintures entourant la Terre, pour définir une représentation des principaux types de climat. Par ailleurs, les peuplements végétaux sont surtout déterminés par le climat (Woodward, 1987). Ceci explique que les espèces de plantes, à partir desquelles ont été prélevées les terres rhizosphériques, permettent d'expliquer 64% de la diversité bactérienne observée.

La latitude est donc un bon paramètre intégratif, rendant compte à la fois du climat et du type de végétation qui en dépend.

Il est admis que la diversité végétale en région tropicale est plus élevée que celle en région tempérée, avec une α -diversité des plantes dans les forêts pluviales équatoriales plus grande que dans tout autre type de végétation (Gentry, 1988). C'est en Amazonie, mais aussi sur l'île de Bornéo, que le plus grand nombre d'espèces d'arbres a été estimé (Ashton, 1992 ; Ter Steege *et al.*, 2000). Néanmoins, au niveau de l' α -diversité mesurée dans notre étude concernant les communautés bactériennes rhizosphériques, les plus grandes valeurs de l'indice de Shannon ont été établies pour l'Albanie et la Grèce et celles-ci sont statistiquement plus élevées que celles calculées pour la Malaisie, qui sont également supérieures à celles estimées en Indonésie. Cette diversité se confirme lorsque l'on s'intéresse au nombre d'OTUs, avec un plus grand nombre inventorié dans les sols ultramafiques d'Albanie et de Grèce que ceux estimés en Indonésie et Malaisie. De plus, sur la base des OTUs partagées, les échantillons d'Albanie et de Grèce sont éloignés d'un point de vue phylogénétique de ceux d'Indonésie et de Malaisie. Ainsi, il ressort clairement de ces analyses, que l'environnement rhizosphériques européen (Grèce et Albanie) est un plus grand réservoir de diversité bactérienne que les environnements tropicaux (Indonésie et Malaisie). Ceci rejoint l'étude de Bahram *et al.* (2018), qui montre que la diversité des communautés bactériennes (appréhendée par l'indice de Shannon) est plus importante en régions tempérées qu'en régions tropicales.

Dans le cas du déterminisme des communautés bactériennes rhizosphériques de plantes hyperaccumulatrices de Ni, l'échelle spatiale à laquelle sont conduites les études, régionale ou mondiale, est donc un facteur non négligeable à prendre en compte. En effet, suivant le niveau d'étude, les conclusions, quant aux facteurs à l'origine de la diversité des communautés bactériennes rhizosphériques, apparaissent parfois contradictoires. Nous avons démontré, suite à nos analyses, qu'à échelle mondiale, le type de végétation, résultant d'un climat spécifique, apparaît être le facteur majeur structurant les communautés bactériennes lorsqu'il est considéré en association au climat. Mais à une échelle spatiale plus restreinte, comme une région donnée, le climat étant plus homogène, de même que le type de végétation (végétation méditerranéenne ou végétation arbustive tropicale humide), ce sont les paramètres physico-chimiques des sols ultramafiques qui expliquent au mieux la structuration et la diversité des communautés bactériennes rhizosphériques de plantes hyperaccumulatrices de Ni.

Une étude précédente des communautés rhizosphériques par métaprotéomique avait placé les gènes liés au métabolisme comme prédominants (Lopes *et al.*, 2016). Ceci s'explique par la présence au niveau de la rhizosphère de composés carbonés et azotés complexes tels les rhizodépôts (exsudats racinaires, cellules desquamées), qui constituent une source majeure de C et N dans la rhizosphère (Grayston et Campbell, 1996 ; Baudoin *et al.*, 2002). Pour utiliser ces macromolécules comme source trophique et d'énergie, les microorganismes présents nécessitent d'avoir un système enzymatique complexe (Grayston et Campbell, 1996 ; Baudoin *et al.*, 2002 ; Steinauer *et al.*, 2016). Les métagénomés prédits lors de nos analyses identifient également les gènes appartenant au métabolisme des carbohydrates, des acides aminés et des co-facteurs et vitamines comme étant les principales familles de gènes présentes dans la rhizosphère des plantes étudiées. La bonne représentativité de cette dernière famille peut s'expliquer par le fait que, dans la rhizosphère de plantes hyperaccumulatrices de Ni, ce métal est largement présent et essentiel à la synthèse de la vitamine B12, notamment (Rodionov *et al.*, 2003). La famille de gènes liés aux transports membranaires intervient également à ce niveau, permettant, entre autres, une internalisation du métal au sein des cellules bactériennes (Degen *et al.*, 1999). C'est en Malaisie que les familles de gènes liés d'une part, au métabolisme des co-facteurs et vitamines et, d'autre part au transport membranaire, sont les mieux représentées. Les corrélations de Spearman ont mis en évidence que ces deux familles étaient corrélées positivement avec une température élevée ; la Malaisie étant, dans notre étude, le pays avec la plus chaude température moyenne annuelle (27,6°C). Alors que le traitement de l'information environnementale est favorisé en Malaisie, celui concernant le traitement de l'information génétique se retrouve impacté par les températures élevées. Les UV, en étant mutagènes pour les organismes, activent les fonctions de réparation de l'ADN (Sinha et Häder, 2002). L'indice UV va logiquement de pair avec une température élevée, mais la famille de gènes intervenant dans la réplication et la réparation de l'ADN n'est pas augmentée par les fortes températures. Les sols étant rhizosphériques, ils ont été prélevés à environ une dizaine de centimètre sous la surface du sol, expliquant que les UVs n'aient que très peu pénétrés cet environnement. En revanche, les fortes températures limitent la réparation de l'ADN, et de ce fait induisent une mort cellulaire élevée (Roti, 1982). Ceci se retrouve dans les fonctions prédites en Malaisie avec une plus faible abondance relative de la famille de gènes impliquée dans la réparation et la réplication de l'ADN mais une plus forte proportion de celle intervenant dans la croissance et mort cellulaire, en comparaison des trois autres pays. Ces deux familles de gènes sont toutes deux corrélées avec la température moyenne annuelle des sites d'échantillonnages.

Concernant les processus cellulaires, les familles génétiques "transport membranaire" et "mobilité cellulaire" sont également bien représentées, et significativement plus abondantes dans les terres rhizosphériques issues de Malaisie. Les gènes impliqués dans les transports permettent aux bactéries d'interagir avec leur environnement. Ceux en lien avec la mobilité leur permettent de répondre, selon des mécanismes de chimiotactisme, au gradient de métabolites exsudés par les racines des plantes (rhizodépôts et molécules signal). Cette combinaison de la mobilité associée aux capacités de chimiotactisme permettrait donc aux bactéries rhizosphériques de se déplacer vers la racine et de la coloniser. En effet, les exsudats racinaires, tels que les glucides et les acides aminés, influencent la mobilité flagellaire de certaines bactéries rhizosphériques (Mandimba *et al.*, 1986 ; Bais *et al.*, 2006) et stimulent, par chimiotactisme, leur déplacement vers les racines (Somers *et al.*, 2004). Or, un ensemble minimal de protéines est requis pour les systèmes de transduction du signal contrôlant le chimiotactisme chez les bactéries, ce qui pourrait expliquer pourquoi la catégorie de gènes dénommée "transduction du signal" est également abondante, et de nouveau significativement plus abondante en Malaisie. L'abondance de ces gènes en Malaisie peut s'expliquer du fait de la présence de *R. bengalensis*, qui, comme nous avons pu le voir, semble avoir la faculté de s'entourer d'un cortège bactérien spécifique, activant de ce fait les gènes impliqués dans la transduction du signal et la mobilité cellulaire.

Cet environnement riche caractérisé de "hot spot" de diversité bactérienne est néanmoins le siège d'une compétition entre les microorganismes qui y sont présents (Buée *et al.*, 2009a). Ainsi, de nombreuses rhizobactéries, telles des *Pseudomonas*, *Burkholderia* et *Streptomyces*, sont connues pour produire des antibiotiques, (Raaijmakers *et al.*, 2002 ; Weller *et al.*, 2002 ; Buée *et al.*, 2009b). La grande prévalence des antibiotiques dans les environnements rhizosphériques induit donc une augmentation de la présence et de la diversité des gènes impliqués dans la résistance à ces substances (Riesenfeld *et al.*, 2004). Ceci expliquerait les corrélations positives, que nous avons observées, entre l'abondance relative de la famille de gènes de résistance aux antibiotiques et les fortes concentrations en Ni et Mn échangeables, et Fe extractible au DTPA. Ceci corrobore les résultats de Perron *et al.* (2004), montrant que la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* présentait une meilleure résistance à l'antibiotique imipénem (composé proche de celui produit par la bactérie filamenteuse *Streptomyces cattleya*) suite à une exposition à des ETM tels le Co, Cd ou Zn, suggérant une potentielle co-régulation entre métaux lourds et antibiotiques (Yu *et al.*, 2017).

Les fonctions liées au métabolisme, majoritaires dans les terres rhizosphériques, apparaissent réduites en présence de fortes teneurs en Co, Fe en Mn extractibles au DTPA et par une forte altitude. A l'inverse du Ni biodisponible, qui lui ne semble pas impacter les fonctions bactériennes, ces éléments sont peu disponibles. Ainsi, les bactéries présentes dans ces milieux ont pu développer des facultés de résistance au Ni, très présent dans ces environnements, tout en restant sensibles à d'autres métaux comme le Co et le Mn. Ceci expliquerait le ralentissement du métabolisme et l'augmentation des gènes liés à la mort cellulaire en présence de ces ETM. Cependant, les pourcentages d'abondance relatifs retrouvés sont conformes à ceux retrouvés dans d'autres environnements. En effet, Jiang *et al.* (2016), après avoir travaillé sur la rhizosphère de plante tolérante au Cu (*Elsholtzia splendens*), ont retrouvé une majorité de gènes impliqués dans le métabolisme (environ 55%), avec une prédominance des gènes liés au métabolisme des carbohydrates et des acides aminés. Ceci rejoint également les observations de Sánchez-López *et al.* (2018), dont les travaux ont prédit le métagénome fonctionnel de bactéries endophytes de graines de *Crotalaria pumila*, une plante pionnière des résidus de mines métallifères.

Cette similitude des fonctions prédites entre différents environnements peut s'expliquer par le processus de redondance fonctionnelle. Une fonction pourrait être assurée au même rythme et dans les mêmes conditions environnementales par deux communautés bactériennes distinctes (Allison et Martiny, 2008). Ainsi, dans notre étude, bien que l'abondance relative de certains phyla soit différente selon les environnements étudiés, les familles de gènes liés au métabolisme apparaissent redondantes, quelles que soient les zones d'étude, mais aussi en comparaison avec ce qui est observé dans d'autres environnements dépourvus de tout toxique et sous d'autres latitudes. L'abondance et la diversité extrêmement élevées dans le règne bactérien, en plus de la flexibilité génomique et métabolique des bactéries, sont des arguments en faveur de la redondance fonctionnelle. En effet, en prenant pour exemple les cycles biogéochimiques, il a été montré que ceux-ci n'étaient pas uniquement dus à l'abondance microbienne (Meyer, 1994) ou à la diversité génétique (Finlay *et al.*, 1997), mais reposaient sur la multifonctionnalité des espèces.

Ainsi, il ressort de cette approche que, malgré les particularités extrêmes des sols ultramafiques, telles des teneurs élevées de Ni dans la rhizosphère des plantes hyperaccumulatrices, la diversité fonctionnelle prédite des communautés bactériennes n'apparaît pas altérée.

Conclusion

Les sols ultramafiques représentent 3% de la surface terrestre et sont dispersés dans le monde. Ils sont le support de plantes endémiques particulières, les plantes hyperaccumulatrices, caractérisées par des concentrations en Ni supérieures à 1% dans leurs parties aériennes. Dans la mesure où ces plantes sont utilisées de nos jours dans un contexte d'agromine, il est nécessaire de mieux comprendre leur environnement rhizosphérique, siège de l'absorption du Ni. Les microorganismes rhizosphériques sont le moteur du fonctionnement de cette interface, la rhizosphère, jouant un rôle crucial dans les cycles biogéochimiques et le développement des plantes, mais aussi en ayant un rôle crucial dans la phytoextraction des métaux tel que le Ni. Dans le cadre de cette étude, nous avons souhaité relever un défi et apporter une réponse à la question "quel est le déterminisme de la diversité des communautés bactériennes rhizosphériques en milieu ultramafique". En effet, cette question fait toujours débat dans la communauté scientifique et nous nous sommes ainsi intéressés à différents facteurs pouvant gouverner cette diversité bactérienne et avons mis l'accent sur les paramètres climatiques, topographiques et ceux relatifs aux sols et à la flore.

Que ce soit à l'échelle régionale ou mondiale, les trois phyla majoritaires mis en évidence dans notre recherche sont les *Proteobacteria*, les *Acidobacteria* et les *Actinobacteria*. Ces résultats sont en accord avec la majorité des études, fondées également sur des approches de séquençage à haut débit pour une caractérisation de la microflore bactérienne, que ces études concernent des sols agricoles ou riches en métaux. Cependant, nous avons pu mettre en exergue aux travers de nos recherches que le déterminisme de cette diversité est, selon le niveau d'échelle spatiale pris en compte, gouverné par différents facteurs.

Nous démontrons qu'en se plaçant au niveau mondial, le type de végétation est le facteur majeur structurant les communautés bactériennes rhizosphériques des plantes hyperaccumulatrices de Ni. Le climat quant à lui exerce une influence à la fois directe, par la température et humidité, et indirecte, au travers de la flore qu'il conditionne. Notre travail montre que c'est l'influence indirecte qui est dominante. A échelle d'une région climatique, la physico-chimie des sols ultramafiques structure et détermine la diversité des communautés bactériennes rhizosphériques. Toutefois, l'espèce *R. bengalensis* paraît exercer une influence largement supérieure à celle du sol. Le système de transpiration de cette espèce induit une ambiance physico-chimique particulière autour de ses racines, qui conditionne un cortège microbien spécifique.

Ainsi, nos travaux semblent, en partie, amener un consensus au débat portant sur le déterminisme de la diversité de ces communautés telluriques : l'échelle considérée, *i.e.* régionale ou mondiale, explique les résultats contradictoires issus de la littérature.

Enfin, la diversité fonctionnelle des communautés bactériennes, déduite des métagénomes prédits, n'est pas altérée malgré les particularités extrêmes des sols ultramafiques. Il existe donc une redondance fonctionnelle entre les environnements ultramafiques et ceux non métallifères.

Nous avons mis en évidence que, comme pour la majorité des études portant sur la caractérisation de la microflore bactérienne, les trois phyla les mieux représentés dans les rhizosphères de plantes hyperaccumulatrices de Ni sont les *Proteobacteria*, les *Acidobacteria* et les *Actinobacteria*.

De plus, nous avons souligné que le déterminisme de cette diversité bactérienne est, selon le niveau d'échelle spatiale pris en compte, gouverné par différents facteurs, à savoir i) le type de végétation dépendant du climat à l'échelle mondiale, et ii) les paramètres physico-chimiques des sols ultramafiques à une échelle climatique.

Toutefois, bien que le séquençage haut débit nous amène à une meilleure compréhension des facteurs conditionnant la structure et la diversité bactérienne en sols ultramafiques, il ne nous permet pas de cerner finement les interactions entre les bactéries rhizosphériques et les plantes hyperaccumulatrices de Ni. Cependant, la compétition éventuelle pour le Ni entre les hyperaccumulateurs et les bactéries rhizosphériques, dont certaines sont capables de bioaccumuler ce métal, demeure une question essentielle dans une optique d'inoculation de plantes hyperaccumulatrices par des bactéries PGPR, pour une optimisation de l'agromine.

Il conviendra donc, dans la partie suivante, de déterminer si l'inoculation de plantes hyperaccumulatrices de Ni par des bactéries PGPR, plus ou moins à même de bioaccumuler ce métal, est susceptible d'influencer de façon significative les flux de Ni vers et dans la plante, en modifiant le cycle du Ni dans le système sol-hyperaccumulateur. Ceci nous permettra de déterminer une potentielle compétition pour le Ni entre une plante hyperaccumulatrice de Ni et des souches bioaccumulatrices de Ni, dans le but de mieux sélectionner les souches PGPR à inoculer pour une agromine efficace.

Partie 3 : Inoculation de *O. chalcidica* par des bactéries PGPR

Introduction

Afin de répondre à la demande des industries et de leur fournir des quantités importantes en métaux biosourcés, le développement de la filière agromine implique la culture de plantes hyperaccumulatrices fournissant des rendements élevés en biomasse concentrée en métaux. Il est ainsi nécessaire de cultiver des plantes ayant un fort potentiel de production, mais aussi une forte capacité à concentrer les métaux dans leurs parties aériennes (Tang *et al.*, 2012).

Pour optimiser les cultures d'hyperaccumulateurs, plusieurs stratégies sont envisagées. Les méthodes conventionnelles utilisées en agriculture consistent en l'apport d'engrais minéraux ou organiques. Ces méthodes ont prouvé leur efficacité en augmentant la production de biomasse des plantes hyperaccumulatrices et, par conséquent, les rendements en métaux extraits (Li *et al.*, 2003 ; Bani *et al.*, 2015 ; Álvarez-Lopez *et al.*, 2016a), tout comme d'autres approches consistant en la co-culture de plantes hyperaccumulatrices avec des légumineuses (Saad *et al.*, 2017, 2018).

Une autre approche envisagée est l'utilisation de bactéries PGPR. Les PGPR peuvent, en fonction de leurs propriétés, contribuer à augmenter à la fois la biomasse des plantes inoculées et l'extraction des métaux du sol (Garbisu et Alkorta, 2001 ; Abou-Shanab *et al.*, 2003a,b ; Lebeau *et al.*, 2008 ; Rajkumar et Freitas, 2008 ; Durand *et al.*, 2015 ; Liu *et al.*, 2015). En effet, ces bactéries sont à même de solubiliser les formes organiques et inorganiques de phosphore présentes dans le sol, peuvent produire des phytohormones, sont capables de synthétiser des sidérophores, ou encore de réguler la synthèse de l'éthylène dans les tissus végétaux grâce à leur activité ACCd, en diminuant ainsi le stress induit chez la plante par la présence de métaux (Glick, 1995, 2014 ; Rodríguez et Fraga, 1999 ; Whipps, 2001 ; Moënné-Loccoz et Défago, 2004 ; Blaha *et al.*, 2006 ; Ma *et al.*, 2009 ; Ahmed et Holmström, 2014). L'ensemble de ces propriétés pourrait conférer aux PGPR un rôle clé dans l'optimisation de la filière agromine, tout en permettant une alternative ou un complément aux amendements chimiques et organiques. Leur utilisation s'est accrue ces dernières années, au travers, le plus souvent, d'expériences menées en conditions contrôlées (Abou-Shanab *et al.*, 2006 ; Cabello-Conejo *et al.*, 2014b ; Durand *et al.*, 2015) et quelques expériences *in situ* (Kidd *et al.*, 2018).

Une des conditions à l'efficacité de ces bactéries PGPR réside en leur installation et prolifération dans la rhizosphère des plantes inoculées. Ceci renvoie au concept de rhizocompétence qui implique, dans le cas d'inoculation de plantes hyperaccumulatrices de métaux, que les PGPR soient résistantes aux éléments métalliques (Schlegel *et al.*, 1991 ; Abou-Shanab *et al.*, 2003b ; Turgay *et al.*, 2011 ; Cabello-Conejo *et al.*, 2014a). C'est pour cela que ces bactéries sont souvent criblées, en premier lieu, pour leur résistance aux métaux. Les bactéries des environnements ultramafiques se sont adaptées aux fortes concentrations métalliques, telles celles de Ni. Ainsi, Schlegel *et al.* (1991) ont mis en évidence l'existence de souches bactériennes isolées de sols serpentiques tolérant jusqu'à 20 mM de Ni (dans le milieu de culture), alors que les souches isolées d'autres types de sol ne toléraient que 1 mM de Ni. Turgay *et al.* (2011) ont constaté que des souches bactériennes isolées de sols ultramafiques en Turquie pouvaient, quant à elles, tolérer jusqu'à 34 mM de Ni.

La résistance/tolérance des bactéries isolées de milieux fortement pourvus en Ni relève de diverses stratégies (Pal et Paul, 2010). Les métaux peuvent être piégés sur la structure cellulaire. Cette stratégie est appelée biosorption ou absorption passive, et dépend des propriétés des parois microbiennes (Volesky et Holan, 1995 ; Fein *et al.*, 2001). Le métal peut également passer dans la cellule à travers la membrane et ce mode d'absorption du métal est appelé absorption active. Enfin, l'absorption de métaux par des modes actif et passif est appelée bioaccumulation (Gadd, 1988 ; Dönmez et Aksu, 2001 ; Hrynkiewicz *et al.*, 2015 ; Kamran *et al.*, 2016). La bactérie va alors internaliser le métal *via* des transporteurs membranaires et le bio-concentrer sous forme inerte. En effet, le Ni peut se complexer avec une métallothionéine. Cette protéine, grâce à son enrichissement en cystine, possède une forte affinité pour les ions métalliques (Hamer, 1986 ; Mejáre et Bülow, 2001).

Bien que, dans le cadre d'approche de bioremédiation, les bactéries PGPR soient sélectionnées pour leur grande résistance au Ni, et que celle-ci puisse résulter d'une bioaccumulation du métal, aucune donnée n'a encore été publiée sur une potentielle compétition, vis-à-vis du Ni, entre une bactérie PGPR bioaccumulatrice de Ni et une plante hyperaccumulatrice de Ni. C'est ce que nous tenterons d'élucider dans cette partie. Pour cela il convient i) d'isoler des bactéries résistantes au Ni des environnements racinaires des hyperaccumulateurs, ii) de cribler ces bactéries sur leurs traits PGP, iii) d'évaluer l'aptitude de ces bactéries à plus ou moins bioaccumuler le Ni et enfin iv) d'inoculer des plantes hyperaccumulatrices en conditions contrôlées avec les souches PGPR sélectionnées et montrant une capacité bioaccumulatrice différente.

Dans un premier temps, la sélection de bactéries PGPR sera présentée avec le criblage de bactéries Ni-résistantes (Ni^R) issues de la rhizosphère de *O. chalcidica* endémique d'Albanie. Une fois les souches sélectionnées sur leurs fonctions PGP (activité ACCd, production d'auxines et de sidérophores, solubilisation de phosphore), nous évaluerons leur potentielle aptitude à accumuler le Ni dans leur compartiment intracellulaire.

La deuxième partie portera sur l'inoculation de *O. chalcidica* par les souches de *Rhodococcus* PGPR retenues, présentant différentes aptitudes à bioaccumuler le Ni. L'impact de l'inoculation de la plante hyperaccumulatrice par ces souches sera évalué à la fois sur la phytoextraction de Ni par *O. chalcidica* et sur la structure et diversité génétiques des communautés bactériennes rhizosphériques présentes ainsi que sur leurs fonctions potentielles.

Matériel et méthodes

1. Isolement et criblage de bactéries PGPR

L'échantillon retenu pour l'isolement de bactérie PGPR est une terre rhizosphérique de *O. chalcidica* prélevée sur le site 05, à savoir l'échantillon Oc-05a (codé Al-13 lors de la récolte) (Photographie 8). Cette terre rhizosphérique a été conservée pour la recherche de bactéries PGPR car elle présentait les concentrations en Ni les plus élevées dans ses parties aériennes (21 400 $\mu\text{g g}^{-1}$). L'hypothèse était que la forte hyperaccumulation observée pouvait être liée à la présence d'une microflore adaptée dans leur environnement racinaire.



Photographie 8 : Terre rhizosphérique de *O. chalcidica*

1.1. Isolement de bactéries résistantes au Ni

Trois g de terre, conservée à 4°C après récolte, sont mis dans un flacon Nalgene additionnés de 30 mL de tampon PBS pH 7,2 (Annexe 4) puis mis en rotation orbitale (17 rpm) durant 45 min. Une dilution en cascade est alors effectuée dans du tampon PBS avec un volume final de 10 mL. Cent μL des dilutions 10^{-1} à 10^{-4} sont étalés sur boîte de Petri contenant du milieu gélosé TSA 10% avec une gamme de Ni allant de 0 à 15 mM de $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0 – 2,5 – 5 – 7,5 – 10 – 15 mM). Les boîtes sont mises à incuber à l'obscurité à 27°C, en étuve sans ventilation. Pour les boîtes sans Ni, un comptage est réalisé après 2 et 10 jours par étalement pour déterminer la proportion de bactéries à stratégie *r* (développement rapide) et à stratégie *K* (développement lent). Le nombre d'UFC des boîtes enrichies en Ni est compté après 10 jours d'incubation. Les résultats sont exprimés en log d'UFC g^{-1} de terre sèche.

1.1.1. Mesure de l'humidité de terre

L'humidité de la terre rhizosphérique a été mesurée afin de pouvoir ramener les valeurs d'unités formant colonie (UFC) par unité de masse de terre sèche. Un g de terre est mis à sécher à l'étuve durant 16 h à 105°C. Le pourcentage d'humidité est donné par l'équation :

$$\text{Humidité (\%)} = \frac{(\text{masse terre humide} - \text{masse terre sèche})}{\text{masse terre sèche}} \times 100$$

1.1.2. Collection de souches Ni-résistantes

Les souches Ni^R (Ni-résistantes) du milieu contenant 7,5 mM de Ni sont isolées individuellement sur des boîtes de Petri contenant un milieu gélosé TSA 10%. Celles-ci sont mises à incuber à 27°C à l'obscurité en étuve jusqu'au bon développement des colonies pures (Photographie 9). La collection de souches Ni^R ainsi constituée est conservée à 4°C en vue d'une affiliation taxonomique.



Photographie 9 : Souches bactériennes Ni^R à 7,5 mM de Ni

1.1.3. Affiliation taxonomique des souches Ni-résistantes

a) Extraction de l'ADN des souches

L'ADN des différents isolats bactériens est extrait selon le protocole de FastDNA® SPIN Kit (MP BioMedicals). L'amplification est vérifiée par une migration de 5 µL d'ADN extrait additionnés à du tampon de charge sur un gel d'agarose TBE 1%. Les concentrations sont normalisées à 10 ng µL⁻¹ pour les futures PCR.

b) PCR de l'ADN 16S

Les amorces universelles 27f (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 1492r (5'-CTA CGGCTACCTTGTTACGA-3') sont utilisées pour permettre l'amplification d'un fragment de 1500 pb de l'ADN 16S bactérien (Gurtler et Stanisich, 1996). La PCR réalisée sur les souches Ni^R comporte les phases suivantes : 4 min à 94°C, 35 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 55°C et 2 min à 72°C, et une dernière phase de 15 min à 72°C. La composition du mélange (25 µL final) de la PCR est présentée dans le Tableau 44.

Tableau 44 : Composition du mix de la PCR sur souche

Réactif	Volume (μL)
Taq Polymérase ($5\text{U } \mu\text{L}^{-1}$)	0,125
Tampon MgCl_2 (10X)	2,5
Mix dNTP (1 μM)	0,2
Amorce F (0,2 μM)	1,25
Amorce R (0,2 μM)	1,25
Matrice	2,5
H_2O ultra-pure stérile	17,175

En tant que matrice, sont utilisés les ADN calibrés à $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ pour les amplifications, de l'eau ultra-pure stérile comme témoin négatif et l'ADN d'une souche dont l'ADN 16S a été ultérieurement amplifié avec succès comme témoin positif.

L'amplification est vérifiée par une migration de $3 \mu\text{L}$ de produit de PCR additionnés à du tampon de charge sur un gel d'agarose TBE 1%.

c) Séquençage des amplicons 16S

Vingt μL des produits PCR sont conditionnés dans des eppendorfs de 1,5 mL et envoyés pour un séquençage à GATC Biotech en Allemagne (<https://www.gatc-biotech.com>).

d) Affiliation taxonomique

Les résultats de séquençage obtenus permettent d'affilier les isolats bactériens Ni^{R} à des genres bactériens connus, en effectuant une recherche d'homologie de séquences avec l'algorithme BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) en s'appuyant sur la banque informatique internationale NCBI (*National Center for biotechnology Information* : <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

1.2. Criblage de bactéries PGPR Ni-résistantes

Pour l'ensemble de ces analyses, des pré-cultures des souches bactériennes sont effectuées. Pour cela, une aliquote de la colonie bactérienne est prélevée à l'aide d'un cône stérile, et mise en culture dans 5 mL de milieu TSB sur table d'agitation à 30°C et 120 rpm durant 24 h. Une fois la bonne turbidité du milieu obtenue après 24 h, la suspension bactérienne est utilisée pour inoculer au centième les différents milieux de culture ci-dessous.

1.2.1. Mesure de l'activité ACCd sur souches

L'activité ACCd est mesurée d'après la méthode de Penrose et Glick (2003). Chaque souche est prélevée et incubée dans 15 mL de milieu TSB sur table d'agitation à 30°C et 200 rpm durant 48 h. Après croissance, la suspension bactérienne est centrifugée 10 min à $6\,000 \text{ g}$ à 4°C . Le culot bactérien est conservé et rincé deux fois avec 5 mL de milieu DF (Annexe 5).

Ce culot bactérien est ensuite re-suspendu dans 7,455 mL de milieu DF additionné de 45 μ L d'ACC 0,5 M pour initier la production d'ACCd. La culture bactérienne est ensuite incubée sur table d'agitation à 30°C à 200 rpm durant 24 h.

Après incubation, la culture bactérienne est centrifugée 10 min à 6 000 g à 4°C. Le culot bactérien est conservé et rincé deux fois avec 5 mL de tampon Tris 0,1 M pH 7,6. Le culot est ensuite repris dans 1 mL de ce même tampon et soumis à une nouvelle centrifugation de 5 min à 16 000 g à 4°C. Le culot bactérien est conservé et re-suspendu dans 600 μ L de tampon Tris 0,1 M pH 8,5. Pour libérer l'ACCd intracellulaire, une lyse cellulaire est réalisée par ajout de 30 μ L de toluène suivi d'une agitation vigoureuse (passage au Vortex à puissance maximale durant 30 s).

Après la lyse, 200 μ L de lysat bactérien sont additionnés de 20 μ L d'ACC 0,5 M, puis agités à l'agitateur Vortex et incubés 15 min à 30°C. Ensuite, 1 mL de HCl 0,56 M est ajouté et la suspension est centrifugée 5 min à 16 000 g. Un mL de surnageant est alors ajouté à 800 μ L de HCl 0,56 M et 300 μ L de solution réactionnelle (HCl 2 M à 0,2% de 2,4-dinitrophénylhydrazine (2,4-DNPH)). L'ensemble est placé en incubateur 30 min à 30°C puis la révélation se fait après addition de 2 mL de NaOH 2 M. Une lecture de la DO à 540 nm est effectuée au spectrophotomètre (SmartSpec Plus Spectrophotometer, BIO-RAD).

En parallèle, une gamme étalon allant de 0 à 1 mM d' α -ketobutyrate est préparée en suivant les mêmes étapes du protocole précédent une fois le surnageant récupéré après la lyse cellulaire bactérienne.

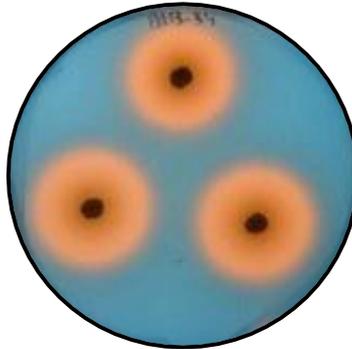
Pour comparer l'activité ACCd entre souches, la production est exprimée par mg de protéines. L'analyse des protéines est effectuée après la lyse cellulaire selon la procédure "Standard Assay Protocol" du kit de dosage des protéines Quick Start™ Bradford Protein Assay (BIO-RAD), avec une gamme étalon d'albumine de sérum bovin allant de 0 à 137 mM.

L'activité ACCd est exprimée en nmol d' α -ketobutyrate produites mg^{-1} de protéines h^{-1} .

1.2.2. Mesure de la capacité de production de sidérophores

Chaque souche bactérienne est mise en culture sur table d'agitation dans 5 mL de milieu TSB à 30°C et 200 rpm durant 48 h. Puis sur des boîtes de Petri contenant un milieu gélosé additionné de chrome azurol sulfonate (milieu CAS) d'après la méthode de Alexander et Zuberer (1991) (Annexe 6). Trois dépôts de 20 μ L de suspension bactérienne sont déposés par boîte. Après incubation en étuve durant 7 jours à 28°C et à l'obscurité, une mesure du halo orange, éventuellement apparu autour des colonies, est effectuée (Photographie 10).

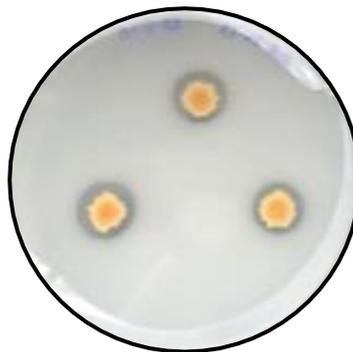
Ce test est fondé sur la compétition pour le Fe entre le complexe ferrique du colorant indicateur chrome azurol et les sidérophores produits par les bactéries. La réaction est positive lorsque le sidérophore élimine le Fe du milieu CAS entraînant un changement de coloration du réactif du bleu à l'orange. Les images sont traitées par le logiciel ImageJ (version 2.0.0) pour estimer l'aire obtenue du halo exprimée en mm².



Photographie 10 : Mobilisation du fer par une souche PGPR sur milieu gélosé CAS

1.2.3. Mesure de la capacité de solubilisation du phosphore

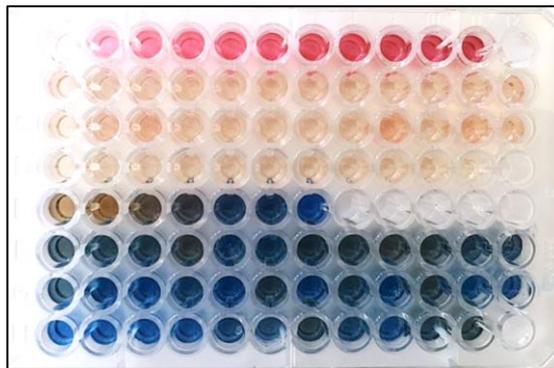
Chaque souche bactérienne est mise en culture sur table d'agitation dans 5 mL de milieu TSB à 30°C et 200 rpm durant 48 h. La capacité à solubiliser les phosphates inorganiques est testée sur des boîtes de Petri contenant du milieu Pikovskaya (PVK) (Annexe 7). Trois dépôts de 20 µL de suspension bactérienne sont déposés par boîte. Après incubation de 7 jours à 28°C en étuve à l'obscurité, le halo transparent, éventuellement apparu autour des colonies, est mesuré comme pour les boîtes CAS à l'aide du logiciel ImageJ pour estimer l'aire du halo de solubilisation du P minéral présent dans le milieu (Photographie 11). Cette aire est exprimée en mm².



Photographie 11 : Solubilisation du P inorganique par une souche PGPR sur milieu PVK

1.2.4. Mesure de la production d'auxines

Les souches qui montrent une activité ACCd, une production de sidérophores et une aptitude à solubiliser le phosphore minéral sont testées pour leur capacité à produire des composés auxiniques. Chaque souche est incubée dans 9 mL de milieu TSB-tryptophane à 500 mg L⁻¹. L'incubation se fait à 30°C durant 108 h (4,5 jours) sur table d'agitation (120 rpm) et à l'abri de la lumière. Ensuite, 2 mL de suspension bactérienne sont prélevés et centrifugés 10 min à 6 000 g. Le culot bactérien est conservé pour le dosage des protéines et 100 µL du surnageant sont récupérés et déposés dans une microplaque de 96 puits et additionnés de 5 µL d'acide orthophosphorique (H₃PO₄) à 10 mM et de 200 µL de réactif de Salkowski (1 mL de FeCl₃ à 0,5 M + 50 mL de HClO₄ à 35%). En parallèle, une gamme étalon est préparée allant de 0 à 100 mM d'AIA. L'ensemble est mis à incuber 25 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'absorbance est mesurée à 535 nm à l'aide d'un spectrophotomètre en plaque (Synergy HT, Biotek Instruments, USA). Le dosage des protéines est effectué par la procédure "Microassay Protocol" du kit de dosage des protéines Quick Start™ Bradford Protein Assay (BIO-RAD) (Photographie 12).



Photographie 12 : Microplaque avec dosage de composés auxiniques (en rose) et de protéines (en bleu)

L'activité AIA est exprimée en nmol d'AIA produites mg⁻¹ de protéines h⁻¹.

1.3. Potentiel de bioaccumulation du Ni des bactéries PGPR

Le potentiel de bioaccumulation du Ni est mesuré sur les souches possédant l'ensemble des traits PGP criblés. Les souches sont cultivées en Falcons stériles contenant 20 mL de milieu TSB avec différentes concentrations de NiSO₄ 6H₂O (0 – 2,5 – 5 – 7,5 mM).

Après 48 h de croissance à 28°C sur table d'agitation (120 rpm), les cultures sont centrifugées 10 min à 6 000 g à 4°C. Dix mL de surnageant sont filtrés à 0,2 µm puis le Ni résiduel dans le milieu est analysé par ICP-AES (Liberty II, Varian). Les résultats obtenus pour le surnageant sont exprimés en µg de Ni mL⁻¹.

Le culot est rincé deux fois avec du tampon Tris-HCl pH 8,5 et re-suspendu dans 1,5 mL de tampon. Il est ensuite re-solubilisé et placé dans un Eppendorf de 2 mL avec une bille d'oxyde de zirconium pour être soumis au broyeur à billes (Vibro-broyeur MM400, Retsch, Allemagne) pendant 2 min à la puissance maximale (30 freq/s). Deux-cents μL du lysat cellulaire sont conservés pour un dosage protéique selon la procédure "Standard Assay Protocol" du kit de dosage des protéines Quick Start™ Bradford Protein Assay (BIO-RAD). Le lysat restant est centrifugé 10 min à 16 000 g à 4°C afin de séparer le compartiment intracellulaire des parois bactériennes. Un mL du surnageant (compartiment intracellulaire) est dilué dans 9 mL d'eau distillée pour un passage à l'ICP-AES. Les résultats obtenus pour le compartiment intracellulaire sont exprimés en μg de Ni bioaccumulé g^{-1} de protéine.

2. Inoculation de *O. chalcidica*

L'effet de l'inoculation d'une souche PGPR bioaccumulatrice de Ni, sur l'hyperaccumulation de Ni, a été testé avec la plante *O. chalcidica* cultivée en conditions contrôlées

Les bactéries PGPR retenues pour inoculer les plants de *O. chalcidica* sont trois souches de *Rhodococcus* possédant des aptitudes PGP et des capacités différentes de bioaccumulation du Ni (Tableau 45).

Tableau 45 : Caractéristiques des 3 souches de *Rhodococcus* retenues
+ : niveau faible, ++ : niveau modéré : +++ : niveau élevé

Souche PGPR	Activité ACCd	Solubilisation du P	Production de sidérophores	Production d'auxines	Bioaccumulation de Ni
Al13-13	+++	+	++	++	+
Al13-23	+++	+++	++	+++	++
Al13-36	+++	+++	++	++	+++

2.1. Le dispositif expérimental

Le substrat de croissance dans lequel seront semées les graines de la plante hyperaccumulatrice correspond à un sol naturellement bien pourvu en Ni prélevé dans une région ultramafique d'Espagne (région de Melide). La terre a été tamisée à 8 mm sur le terrain et envoyée au laboratoire en avril 2017 où elle été conservée à 4°C jusqu'au lancement de l'expérimentation.

Les graines de *O. chalcidica* proviennent d'une parcelle située en Grèce (région de Trigona) où cette plante s'y développait spontanément. Elles ont été prélevées en août 2014. Des tests de germination ont été effectués sur du papier filtre humidifié ainsi que sur le substrat de croissance. Dix graines placées dans des boîtes de Petri ont été mises à germer à 28°C et à l'obscurité. Un relevé journalier du taux de germination a été effectué sur 21 jours.

Des pots en PVC (\varnothing 13,6 * 11,6 cm) sont remplis avec 360 g de terre fraîche (314 g équivalent sec) et fertilisée avec un équivalent de 120 kg d'N ha⁻¹ apporté sous forme de NH₄NO₃, 156 kg de potassium ha⁻¹ et 123 kg de P ha⁻¹ apportés tous deux sous forme de KH₂PO₄. Des bougies poreuses (Rhizon modèle 192122) sont installées avec une inclinaison de 45° en direction du centre du pot pour pouvoir effectuer régulièrement des prélèvements de la solution de sol. L'humidité de la terre a été maintenue à 65% de la capacité de rétention en eau (mesurée à 0,1 bar) par arrosage avec le l'eau distillée.

Pour les pots plantés, trois graines de *O. chalcidica* sont placées par pot et, au bout de deux semaines, une seule plante est conservée par pot.

Les pots (plantés et non plantés) sont disposés dans la chambre de culture, en trois blocs avec une randomisation totale au sein de chaque bloc (Figure 43).

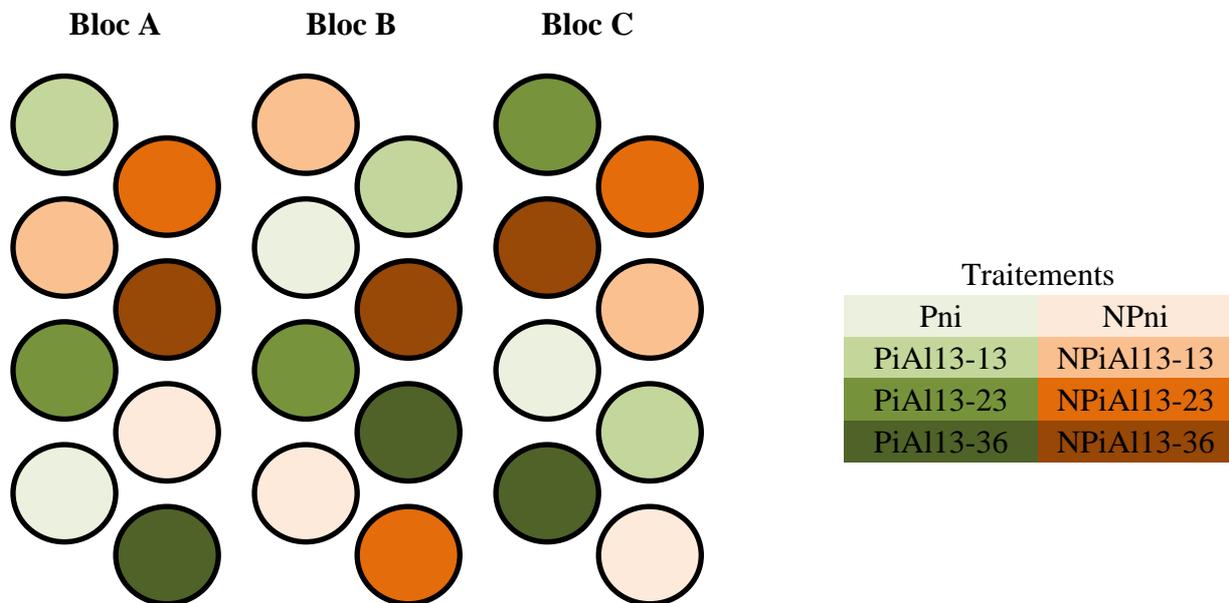


Figure 43 : Dispositif expérimental en pots en conditions contrôlées

P : planté, NP : non planté, ni : non inoculé, iA113-13 : inoculé avec la souche A113-13, iA113-23 : inoculé avec la souche A113-23 et iA113-36 : inoculé avec la souche A113-36

Après semis, l'ensemble des pots est placé en chambre de culture avec une photopériode de 16 h jour (24°C) / 8 h nuit (18°C) avec une hygrométrie de 70%. L'inoculation par les souches PGPR a lieu lorsque les plantules sont âgées de deux semaines. Un prélèvement de solution du sol *via* les bougies poreuses installées est effectué toutes les trois semaines avec arrosage des pots à 100% de la capacité de rétention en eau et prélèvement de la solution du sol 4 h après arrosage. La culture est conduite pendant deux mois après inoculation des plantes par les souches PGPR.

2.2. Inoculation des plantes par les souches PGPR

2.2.1. Courbes de croissance des souches bactériennes

Pour permettre d'inoculer les pots (plantés et non plantés) avec un nombre de bactérie connu, il est primordial de connaître les courbes de croissance bactérienne des trois souches de *Rhodococcus*. Pour cela, 300 mL de milieu TSB sont inoculés avec 3 mL de pré-culture. La DO est mesurée à 600 nm au spectrophotomètre à différent temps pour construire la courbe $DO = f(\text{temps})$. Parallèlement, 1 mL de suspension bactérienne est prélevé pour une dilution en cascade au $1/10^{\text{ème}}$ dans du tampon PBS. Des étalements (de 10^{-2} à 10^{-5}) de 100 μL sur milieu TSA à 10% sont réalisés. Les boîtes de Petri sont mises à incuber 48 h à l'obscurité à 30°C. Un comptage des UFC sur boîtes est effectué pour tracer la courbe $\log(\text{UFC mL}^{-1}) = f(\text{temps})$. Enfin, pour chacune des trois souches, les courbes reliant la DO au nombre de bactéries, $DO=f(\log(\text{UFC mL}^{-1}))$, peuvent être tracées (Figure 44).

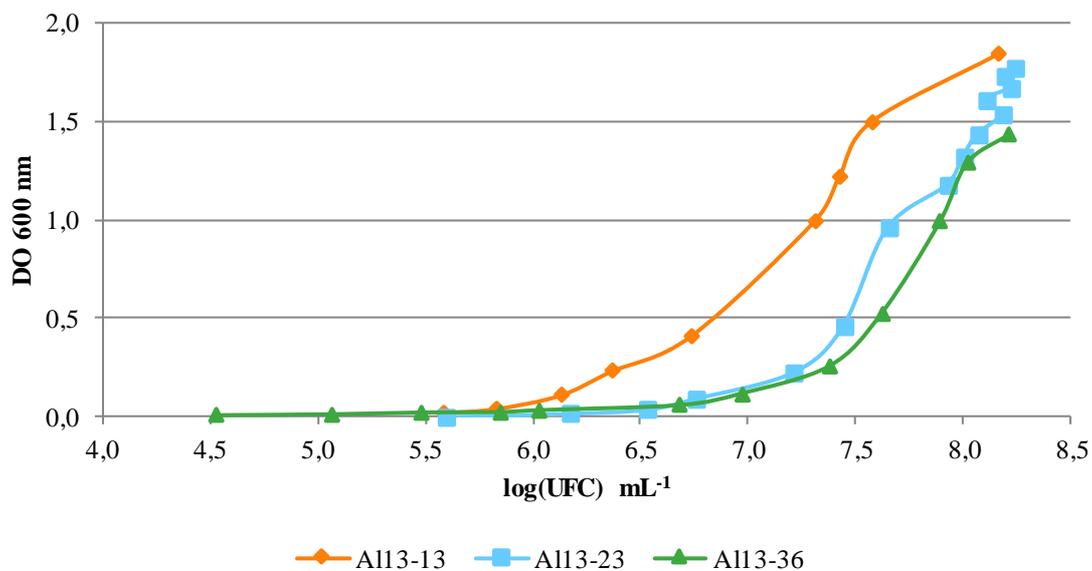


Figure 44 : Cinétique de croissance des 3 souches de *Rhodococcus* PGPR retenues

2.2.2. Préparation de l'inoculum et inoculation des pots

Les trois souches bactériennes à inoculer sont cultivées dans 250 mL de milieu TSB dans les mêmes conditions que pour l'établissement des courbes de croissance. Pour une inoculation à 10^6 bactéries par g de terre sèche, il est nécessaire d'apporter $3,14 \cdot 10^8$ bactéries par pot (soit pour 314 g de terre sèche). Le culot bactérien obtenu pour chaque culture bactérienne est ainsi rincé deux fois avec du tampon PBS et re-suspendu dans ce tampon pour obtenir une concentration finale en bactérie de $3,14 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$. Les bactéries sont apportées avec 1 mL de suspension déposée, soit au collet des plantules dans le cas des pots plantés, soit au niveau de la surface du pot dans le cas des témoins non plantés.

2.3. Récolte de l'expérimentation

A la récolte, les parties aériennes sont coupées au collet et lavées à l'eau distillée avant d'être séchées à l'étuve à 70°C durant 48 h. Les parties racinaires sont récupérées et lavées à l'eau distillée pour éliminer toute trace de terre. Elles sont d'abord gardées fraîches dans une solution de métaphosphate de sodium à 50 g L⁻¹ et conservées à 4°C pour caractériser l'architecture racinaire, puis sont séchées à 70°C durant 48 h. Pour chaque pot, 2 g de terre sont congelés à -80°C pour la caractérisation de la structure et de la diversité de la communauté bactérienne par séquençage haut débit. Un stock de 50 g de terre est conservé à 4°C pour les approches microbiologiques et le reste est mis à sécher à 40°C durant 48 h pour la mesure des paramètres physico-chimiques des terres rhizosphériques. La terre rhizosphérique est celle qui adhère aux racines après dépotage et agitation vigoureuse manuelle des systèmes racinaires. Pour les pots témoins, la terre de surface a d'abord été éliminée en raison de développement d'algues, avant d'effectuer l'échantillonnage.

2.4. Analyses abiotiques

2.4.1. Terres

Le pH, les éléments totaux, extractibles au DTPA et échangeables sont mesurés dans les mêmes conditions que celles décrites dans le Matériel et Méthodes de la Partie 2 section 2.2. Caractérisation physico-chimique des terres.

2.4.2. Solutions de sol

Toutes les 3 semaines une fois l'inoculation des pots effectuée, 10 mL de solution de sols sont prélevés pour analyser les concentrations élémentaires. Avant passage à l'ICP-AES, les solutions sont filtrées à 0,45 µm. Elles sont ensuite diluées au dixième et acidifiées à 0,33% avec HNO₃.

2.5. Analyses biotiques

2.5.1. Plantes

Les racines conservées dans du métaphosphate de sodium après dépotage des plantes sont scannées (scanner Epson 10000 XL) et les images recueillies sont traitées par le logiciel Winrhizo (V. 2005c, Regent Instruments). Ceci permet d'évaluer l'architecture racinaire avec une mesure de la longueur, de la surface et du diamètre moyen des racines.

Les dosages élémentaires dans les parties aériennes et racinaires sont déterminés comme pour la section 2.1. Concentrations élémentaires dans les plantes du Matériel et Méthodes Partie 2.

2.5.2. Activités microbiennes enzymatiques

Les activités microbiennes enzymatiques sont mesurées à partir de terre récoltée et conservée à 4°C. Les terres ont été tamisées au préalable à 5 mm.

a) *Activité de l'ACC déaminase des terres*

Un g de terre est mis dans un Falcon de 15 mL avec 4,775 ml de tampon Tris pH 8,5 et 225 µL de solution d'ACC 0,5 M. Des blancs sont aussi préparés ne contenant que du tampon Tris. La suspension est incubée à 30°C avec agitation (200 rpm) durant 24 h. La lyse des cellules bactériennes, destinée à libérer l'ACCd intracellulaire, nécessite l'ajout de 100 µL de toluène puis une incubation de 10 min avant passage au vortex. Deux mL de surnageant sont centrifugés 3 min à 9 000 g, puis 1 mL du surnageant est prélevé et additionné à 1,8 mL d'HCl 0,56 M et 300 µL de solution réactionnelle (HCl 2 M à 0,2% de 2,4-DNPH). L'échantillon est mis en agitation à 30°C durant 15 min puis la révélation de l'activité ACCd se fait par ajout de 2 mL de NaOH 2 M. La lecture des absorbances est réalisée au spectrophotomètre à 540 nm.

En parallèle, une gamme étalon allant de 0 à 1 mM d' α -kétobutyrate est réalisée. Les résultats sont donnés en nmol d' α -kétobutyrate g⁻¹ de terre sèche h⁻¹ :

$$\text{Activité ACCd} = \frac{[\alpha - \text{kétobutyrate}] (\text{nmol mL}^{-1}) \times V \text{ culture}(\text{mL}) \times V \text{ lecture} (\text{mL})}{V \text{ prise d'essai} (\text{mL}) \times \text{masse terre sèche} (\text{g}) \times \text{temps d'incubation} (\text{h})}$$

b) *Activité uréase des terres*

L'activité uréase a été mesurée d'après une adaptation du protocole de Tabatabai et Bremner (1972). Dans un Falcon de 50 mL sont placés 2,5 g de terre avec 10 ml de tampon borate (tétraborate de disodium à 28,5 g L⁻¹) pH 10 et 1,5 mL de solution d'urée à 80 mM (ou 1,5 mL d'eau distillée pour les blancs). L'ensemble est mis à incuber à 37°C avec agitation (200 rpm) durant 2 h. Après incubation, 15 mL de KCl (2 M) sont ajoutés pour une nouvelle incubation à 37°C avec agitation (200 rpm) durant 30 min. Les solutions obtenues sont filtrées à 0,45 µm sur des filtres exempts d'azote (DigiFILTER, SCP Science) et 1 mL du filtrat est additionné à 9 mL d'eau distillée, 5 mL de solution de salicylate de sodium NaOH (0,3 M) et 2 mL de dichloroisocyanide de sodium (3,91 mM) et agité au vortex. Après 30 min d'incubation à température ambiante, les absorbances sont lues au spectrophotomètre à 690 nm.

En parallèle, une gamme étalon allant de 0 à 25 mM de chlorure d'ammonium est réalisée. Les résultats sont donnés en µg de chlorure d'ammonium g⁻¹ de terre sèche h⁻¹ :

$$\text{Activité uréase} = \frac{[\text{AIA}] (\mu\text{g mL}^{-1}) \times V \text{ incubation} (\text{mL}) \times \text{facteur de dilution}}{\text{masse terre sèche} (\text{g}) \times \text{temps d'incubation} (\text{h})}$$

c) Activité de l'arylsulfatase, de la β -glucosidase et de la phosphatase alcaline des terres

Le dosage de ces trois enzymes microbiennes est réalisé selon le protocole de Deng *et al.* (2013). Deux g de terre sont mis dans un Falcon de 50 mL avec 25 ml d'eau distillée et 250 μ L de toluène, puis la suspension est agitée vigoureusement au vortex et mise à incuber 10 min à température ambiante. Après une nouvelle agitation au vortex, 400 μ L sont placés dans des Eppendorfs de 2 mL avec une double prise d'essai (réaction et blanc) pour chacune des trois enzymes. Un mL de substrat à 5 mM est ajouté aux échantillons pour la réaction et 1 mL de tampon ayant servi à la réalisation des substrats est ajouté aux blancs :

- substrat pNP-sulfate dans un tampon acétate de sodium (0,5 M à pH 5,8) pour l'activité arylsulfatase
- substrat pNP- β -D-glucopyranoside dans un tampon acétate de sodium (0,5 M à pH 5,8) pour l'activité β -glucosidase
- substrat pNP-phosphate dans tampon Tris HCl (0,1 M à pH 8) pour l'activité phosphatase alcaline

La suspension est mise à incuber à 37°C avec agitation (200 rpm) durant 2 h, puis 250 μ L de NaOH (1 M) sont ajoutés. Les échantillons sont centrifugés 2 min à 13 000 g et 200 μ L de surnageant sont transférés dans une microplaque pour une lecture des absorbances à 400 nm au spectrophotomètre en plaque (Synergy HT, Biotek Instruments, USA).

En parallèle, une gamme étalon allant de 0 à 25 mM de p-nitrophénol est réalisée. Les résultats sont donnés en μ g de p-nitrophénol g^{-1} de terre sèche h^{-1} :

$$\text{Activité} = \frac{[\text{p - nitrophénol}] (\mu\text{g mL}^{-1}) \times V \text{ lecture (mL)}}{\frac{V \text{ prise d'essai (mL)}}{V \text{ culture (mL)}} \times \text{masse terre sèche (g)} \times \text{temps d'incubation (h)}}$$

2.5.3. Diversité bactérienne par séquençage haut débit Illumina

La structure et la diversité génétique des communautés bactériennes des terres rhizosphériques issue des cultures de *O. chalcidica* sont caractérisées par une approche de séquençage haut débit suivant les sections 3.1. Séquençage haut débit Illumina et 3.2. Analyses bioinformatiques du Matériel et Méthodes de la Partie 2.

3. Analyses statistiques

Comme pour les données de séquençage haut débit présentées dans la Partie 2, les analyses statistiques et multivariées ont été effectuées avec les logiciels XLSTAT et R (3.3. Analyses statistiques de la section Matériel et Méthodes).

Résultats

1. La recherche de bactéries PGPR

1.1. La résistance au Ni des bactéries de la rhizosphère de *O. chalcidica*

La quantification des bactéries de la rhizosphère résistantes au Ni a été effectuée (Figure 45). Le pourcentage de bactéries résistantes à 2,5 mM de NiSO₄ 6H₂O sur milieu gélosé est de 16,2% et statistiquement différent de celui obtenu à 5 mM (6,0%) et ceux obtenus aux concentrations supérieures ou égales à 7,5 mM. A l'inverse, au-delà de 7,5 mM de NiSO₄ 6H₂O apportés dans le milieu, aucune différence significative ne peut être mise en évidence entre les pourcentages de bactéries résistantes (variant de 0,05 à 2,25%).

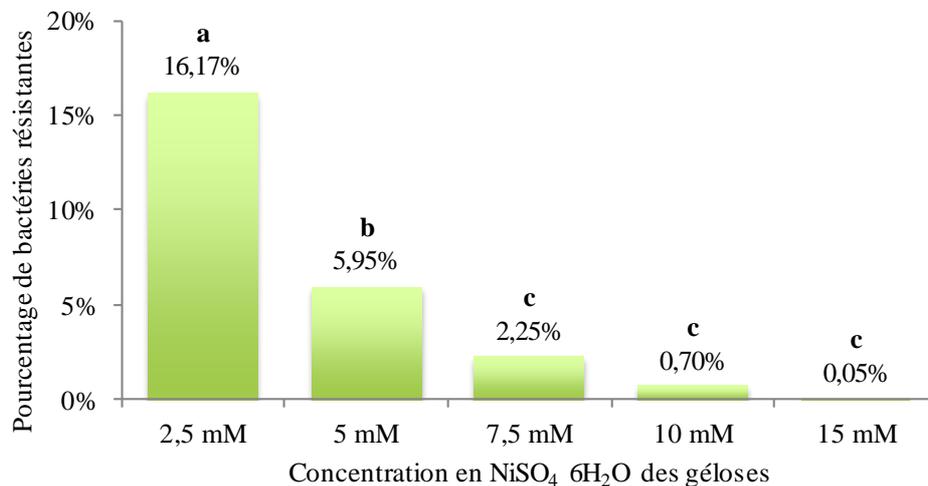


Figure 45 : Pourcentage moyen de souches bactériennes cultivables Ni^R isolées de la rhizosphère de *O. chalcidica* (n = 3)

1.2. Le criblage des bactéries sur leurs traits PGP

Les 34 souches Ni^R à 7,5 mM issues de la rhizosphère de *O. chalcidica* ont été criblées sur des traits PGP, à savoir pour leurs aptitudes à produire de l'ACCd, à solubiliser le P et à produire des sidérophores et ont été affiliées taxonomiquement (Tableau 46). Parmi ces souches sont présents les genres *Chryseobacterium*, *Dyadobacter*, *Janthinobacterium*, *Methylobacterium*, *Rhodococcus*, *Shinella* et *Streptomyces* et l'espèce *Tardiphaga robiniae*. Six souches n'ont pu être affiliées taxonomiquement.

Concernant l'activité ACCd, sur les 34 souches criblées, dix souches présentent une activité élevée (de 637 à 1074 nmol d' α -kétobutyrate mg⁻¹ de protéine h⁻¹), trois souches des activités modérées (de 120 à 294 nmol d' α -kétobutyrate mg⁻¹ de protéine h⁻¹) et six souches possèdent de faibles activités (de 4 à 61 nmol d' α -kétobutyrate mg⁻¹ de protéine h⁻¹).

Concernant la capacité à solubiliser le P, cinq souches forment un grand halo de solubilisation (de 108 à 173 mm²), six souches forment un halo de taille modéré (de 29 à 86 mm²) et cinq souches forment un petit halo (inférieur à 17 mm²).

En ce qui concerne la production de sidérophores, quatre souches forment un grand halo de production (de 399 à 866 mm²), un halo de taille moyenne (de 52 à 104 mm²) est présent pour neuf souches et un petit halo (inférieur à 25 mm²) est présent pour dix souches.

Au total, 56% des souches isolées possèdent l'activité ACCd, 47% peuvent solubiliser le P et 68% produisent des sidérophores. Onze souches, soit 32%, possèdent les trois traits PGP. Seulement six souches (18%) ne possèdent aucun des traits PGP criblés.

Tableau 46 : Traits PGP des souches Ni^R isolées de la rhizosphère de *O. chalcidica*

ACCd : production d'ACCd, Phos : solubilisation du P, Sidé : production de sidérophores ; - : absence, + : présence faible, ++ : modérée, +++ : élevée ; na : souche non affiliée taxonomiquement

Souche	Affiliation taxonomique	ACCd	Phos	Sidé
Al13-01	<i>Rhodococcus</i> sp.	+++	+	++
Al13-02	<i>Methylobacterium</i> sp.	++	+	++
Al13-03	<i>Rhodococcus</i> sp.	+++	-	++
Al13-04	<i>Tardiphaga robiniae</i>	+	-	-
Al13-05	<i>Streptomyces</i> sp.	-	++	+++
Al13-06	<i>Dyadobacter</i> sp.	+	-	-
Al13-07	<i>Tardiphaga robiniae</i>	-	-	-
Al13-08	<i>Rhodococcus</i> sp.	+++	+	++
Al13-09	<i>Methylobacterium</i> sp.	-	-	-
Al13-10	na	-	-	-
Al13-11	na	-	-	++
Al13-12	<i>Streptomyces</i> sp.	-	-	+++
Al13-13	<i>Rhodococcus</i> sp.	+++	+	++
Al13-14	<i>Chryseobacterium</i> sp.	+	-	+
Al13-15	<i>Shinella</i> sp.	+	-	+
Al13-16	<i>Dyadobacter</i> sp.	-	-	-
Al13-17	na	+++	-	-
Al13-19	<i>Rhodococcus</i> sp.	+++	+	+
Al13-20	<i>Janthinobacterium</i> sp.	+	++	+
Al13-21	<i>Rhodococcus</i> sp.	+++	+++	-
Al13-22	<i>Tardiphaga robiniae</i>	++	-	-
Al13-23	<i>Rhodococcus</i> sp.	+++	+++	++
Al13-24	<i>Chryseobacterium</i> sp.	+	++	+
Al13-25	<i>Streptomyces</i> sp.	+	+++	++
Al13-26	<i>Streptomyces</i> sp.	+++	+	+
Al13-27	na	-	+	+
Al13-28	<i>Streptomyces</i> sp.	-	++	+
Al13-29	<i>Streptomyces</i> sp.	-	++	+
Al13-31	na	-	-	-
Al13-32	<i>Methylobacterium</i> sp.	-	-	+++
Al13-33	na	-	-	-
Al13-34	<i>Streptomyces</i> sp.	++	++	+++
Al13-35	<i>Dyadobacter</i> sp.	-	+++	+
Al13-36	<i>Rhodococcus</i> sp.	+++	+++	++

L'ensemble des *Rhodococcus* isolés de la rhizosphère de *O. chalcidica* présente entre 2 et 3 des traits PGP ciblés, avec 3 des traits dans 75% des cas (Figure 46). *Streptomyces* qui est le deuxième genre le plus représenté dans la rhizosphère présente entre 1 (14% des cas) et 3 (43% des cas) traits PGP ciblés. De plus, les bactéries affiliées aux genres *Janthinobacterium*, *Methylobacterium* et *Chryseobacterium* possèdent également les 3 traits PGP ciblés.

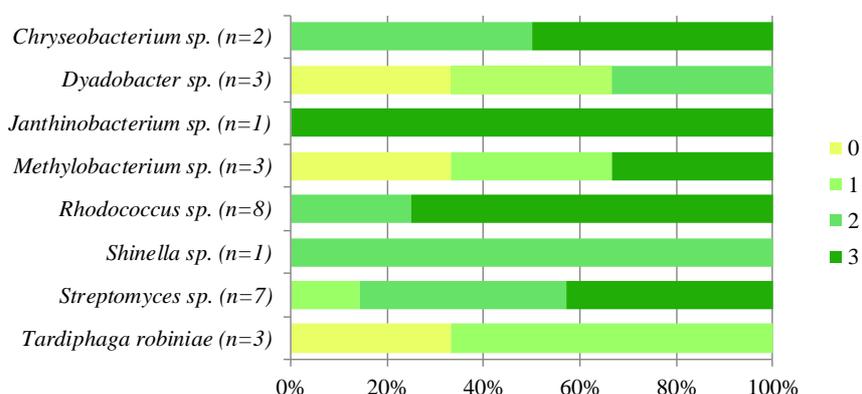


Figure 46 : Pourcentage de bactéries possédant 0, 1, 2 ou 3 des traits PGP ciblés (ACCd, solubilisation du P et production de sidérophores)

Les onze souches possédant les 3 traits PGP criblés ont ensuite été évaluées pour leur aptitude à produire des auxines. Huit de ces souches possèdent cette activité (Tableau 47). Les valeurs mesurées pour la production d'auxines vont de 16 à 375 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de protéine h^{-1} . Parmi ces souches sont présents les genres *Chryseobacterium*, *Janthinobacterium*, *Methylobacterium*, *Rhodococcus* et *Streptomyces*. La souche de *Rhodococcus* A113-23 possède les traits PGP dont les valeurs sont les plus élevées en moyenne, avec une production d'ACCd de 1 074 nmol d' α -kétobutyrate mg^{-1} de protéine h^{-1} , des halos de solubilisation du P de 126 mm^2 et de production de sidérophores de 76 mm^2 , et une production auxinique de 196 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de protéine h^{-1} . A l'inverse, c'est la souche A113-20 affiliée au genre *Janthinobacterium* qui possède les traits PGP dont les valeurs sont les moins élevées, avec une production d'ACCd de 9 nmol d' α -kétobutyrate mg^{-1} de protéine h^{-1} , une solubilisation du P de 31 mm^2 et une production de sidérophores de 21 mm^2 , et auxinique de 16 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de protéine h^{-1} .

Tableau 47 : Caractéristiques des souches PGPR isolées de la rhizosphère de *O. chalcidica*

ACCd : production d'ACCd (nmol d' α -kétobutyrate mg^{-1} de protéine h^{-1}), Phos : solubilisation du P (mm^2), Sidé : production de sidérophores (mm^2) et AIA : production d'auxines ($\mu\text{g mg}^{-1}$ protéines h^{-1})

Souche PGPR	ACCd	Phos	Sidé	AIA
A113-02: <i>Methylobacterium</i> sp.	120	14	84	172
A113-08: <i>Rhodococcus</i> sp.	901	14	48	375
A113-13: <i>Rhodococcus</i> sp.	915	17	52	46
A113-20: <i>Janthinobacterium</i> sp.	9	31	21	16
A113-23: <i>Rhodococcus</i> sp.	1074	126	76	196
A113-24: <i>Chryseobacterium</i> sp.	9	31	24	169
A113-25: <i>Streptomyces</i> sp.	19	173	104	333
A113-36: <i>Rhodococcus</i> sp.	836	130	60	77

1.3. Le potentiel de bioaccumulation de Ni des bactéries PGPR

Les huit souches PGPR retenues ont été testées pour leur capacité à internaliser le Ni présent dans leur environnement *via* le mécanisme de bioaccumulation. Pour cela, un dosage de Ni dans leur compartiment intracellulaire a eu lieu après croissance durant 48h à 120 rpm en présence de 2,5, 5 et 7,5 mM de NiSO₄ 6H₂O (Tableau 48). De manière générale, plus la concentration en Ni dans le milieu de culture est élevée, plus les souches ont tendance à l'internaliser dans leur compartiment intracellulaire. Par contre, une exception peut être mise en évidence pour les souches A113-25 et A113-36, qui possèdent des concentrations en Ni internes équivalentes en présence de 2,5 et 5 mM de NiSO₄ 6H₂O, et la souche A113-08, qui possède des concentrations en Ni internes équivalentes en présence de 5 et 7,5 mM de NiSO₄ 6H₂O. De plus, les souches appartenant aux genres *Chryseobacterium* (A113-24) et *Janthinobacterium* (A113-20) n'ont pas survécu à une concentration de 7,5 mM de NiSO₄ 6H₂O en milieu liquide. Bien que quatre souches de *Rhodococcus* soient retenues dans ces analyses, elles ne possèdent pas les mêmes aptitudes à bioaccumuler le Ni. En effet, pour une concentration en Ni du milieu de culture de 7,5 mM, les souches A113-08 et A113-13 présentent une faible internalisation de ce métal (4,5 et 7,2 µg Ni mg⁻¹ de protéines), la souche A113-23 une internalisation modérée (17 µg Ni mg⁻¹ de protéines) alors que la souche A113-36 internalise beaucoup plus le Ni (35 µg Ni mg⁻¹ de protéines). C'est cependant la souche de *Streptomyces* (A113-25) qui possède la meilleure capacité à internaliser le Ni quelle que soit la concentration du Ni présent dans le milieu de culture, avec une concentration allant jusque 134 µg Ni mg⁻¹ de protéines.

Tableau 48 : Bioaccumulation de Ni par les souches PGPR isolées de la rhizosphère de *O. chalcidica*

le Ni intracellulaire est donné en µg Ni mg⁻¹ de protéines, ns : non survie de la souche

Souches PGPR	2,5 mM	5 mM	7,5 mM
A113-02: <i>Methylobacterium</i> sp.	0,57	5,4	14,0
A113-08: <i>Rhodococcus</i> sp.	0,59	3,3	4,5
A113-13: <i>Rhodococcus</i> sp.	0,57	2,3	7,2
A113-20: <i>Janthinobacterium</i> sp.	0,49	1,6	ns
A113-23: <i>Rhodococcus</i> sp.	0,56	3,3	16,8
A113-24: <i>Chryseobacterium</i> sp.	0,42	2,0	ns
A113-25: <i>Streptomyces</i> sp.	3,58	3,7	133,9
A113-36: <i>Rhodococcus</i> sp.	2,75	2,5	34,7

2. L'effet de PGPR bioaccumulatrice de Ni sur la phytoextraction par *O. chalcidica*

2.1. L'effet de l'inoculation sur la plante

Les paramètres biotiques concernant les plantes inoculées ont été ramenés aux valeurs mesurées pour les plantes non inoculées (Figure 47). Aucune différence significative entre traitement n'est établie pour ces différents paramètres. Le Ni dosé dans les racines inoculées avec la souche A113-23 est supérieur de 35% par rapport à la plante non inoculée alors que la souche A113-36 augmente la biomasse linéique racinaire. Cependant, de manière globale, les valeurs sont les plus élevées en absence d'inoculum, quels que soient les paramètres considérés.

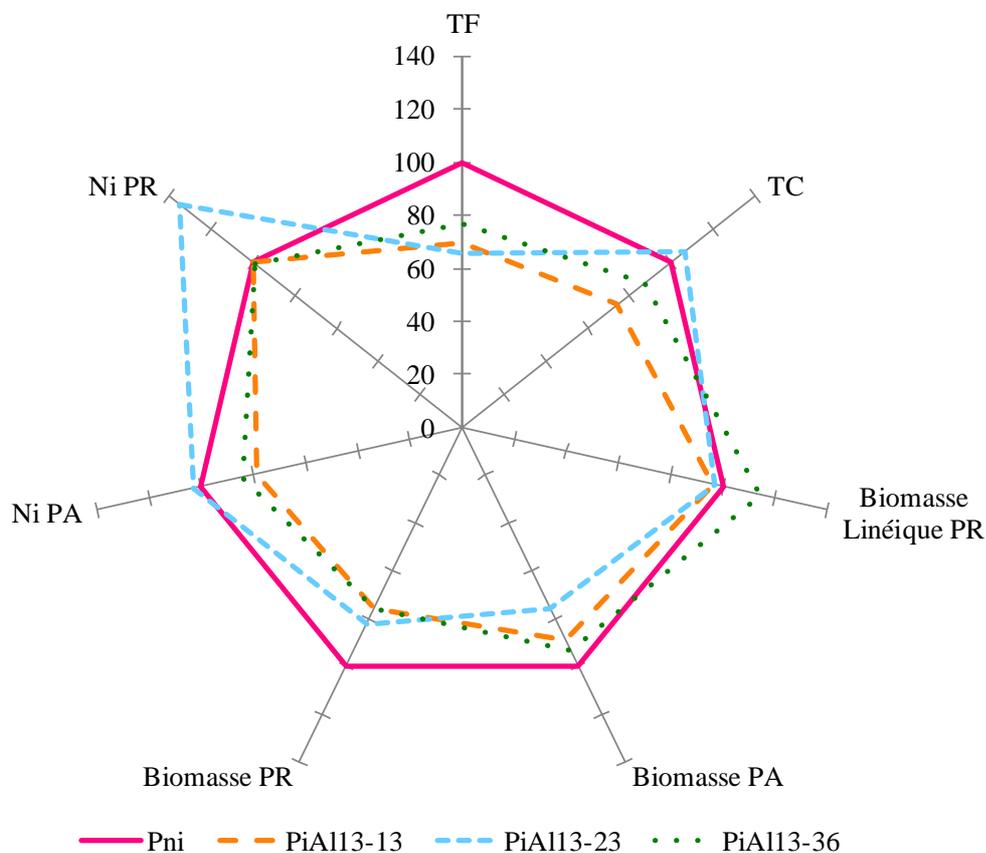


Figure 47 : Radar en pourcentage de la moyenne des différents paramètres des plantes récoltées
 les pourcentages sont ramenés aux valeurs mesurées pour la modalité Pni (100%) ; PR : parties racinaires, PA : parties aériennes, TF : facteur de transfert, TC : facteur de concentration ;
 Pni : plante non inoculée, PiA113-13 : plante inoculée avec la souche A113-13, PiA113-23 : plante inoculée avec la souche A113-23, PiA113-36 : plante inoculée avec la souche A113-36 ; n = 3

2.2. L'effet de l'inoculation sur la terre ultramafique

La présence de plante a modifié significativement le Ni extractible au DTPA ($17,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de terre sèche en présence de *O. Chalcidica* et $19,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de terre sèche en absence de plante ; Tableau 49). Par contre, aucune différence significative n'est observée pour les autres paramètres abiotiques entre les traitements plantés et non plantés.

Tableau 49 : pH, Ni, CEC totale, N et C totaux et C organique des terres de culture
la moyenne et l'écart type sont donnés pour les 12 répétitions

Pots	pH	Ni total (mg kg^{-1})	Ni DTPA* (mg kg^{-1})	Ni CEC ($\text{cmol}^+ \text{kg}^{-1}$)	CEC totale ($\text{cmol}^+ \text{kg}^{-1}$)	%N	%C	%Corg
planté	$4,8 \pm 0,1$	462 ± 7	$17,7 \pm 1,2$	$0,03 \pm 0,00$	$5,37 \pm 0,33$	$0,3 \pm 0,0$	$3,9 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,1$
non planté	$4,8 \pm 0,1$	464 ± 5	$19,5 \pm 0,9$	$0,03 \pm 0,00$	$5,39 \pm 0,29$	$0,3 \pm 0,0$	$3,8 \pm 0,3$	$3,8 \pm 0,3$

*différence significative mise en évidence avec le test de Student ($\alpha = 0,05$)

La concentration du Ni en solution n'a pas varié significativement durant la culture (Figure 48). Cependant, en tendance, quelle que soit la modalité d'inoculation, la concentration du Ni dans la solution du sol est plus élevée en présence de plante, avec des concentrations moyennes qui varient de $0,093 \mu\text{g mL}^{-1}$ (PiA113-13) à $0,133 \mu\text{g mL}^{-1}$ (PiA113-23).

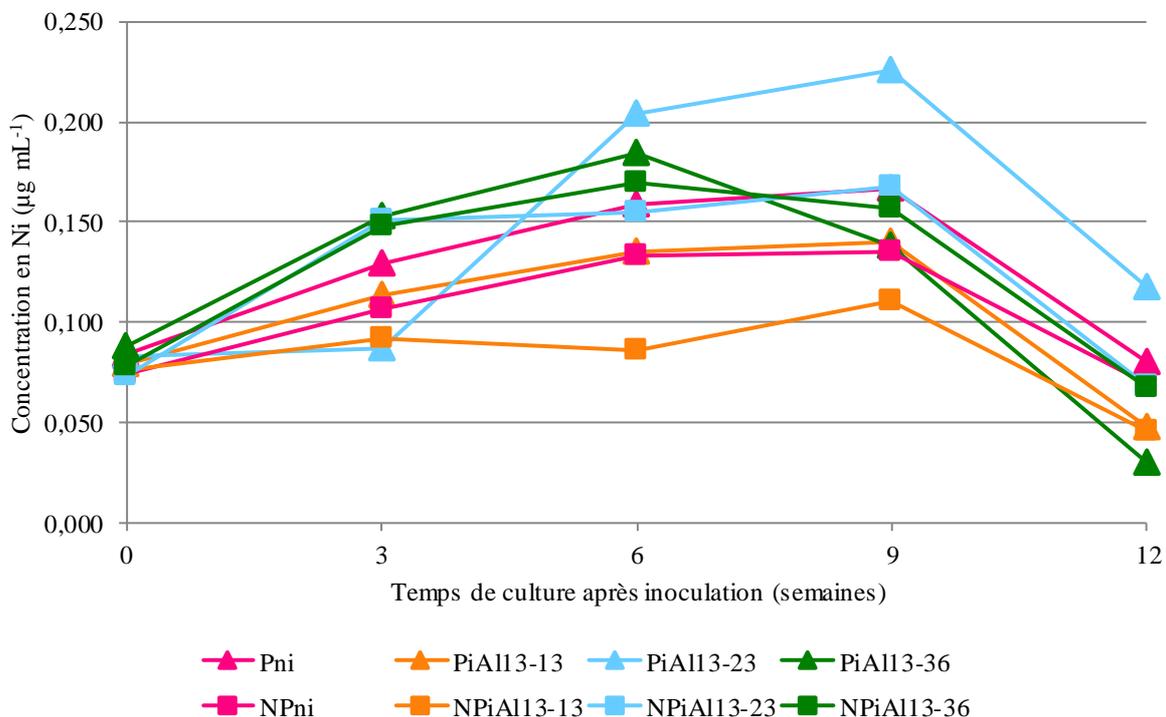


Figure 48 : Evolution des concentrations en nickel dans la solution des terres de culture entre l'inoculation (t = 0 semaine) et la récolte (t = 12 semaines)

P : planté, NP : non planté, ni : non inoculé, iA113-13 : inoculé avec la souche A113-13, iA113-23 : inoculé avec la souche A113-23, iA113-36 : inoculé avec la souche A113-36 ; n = 3

L'ACP a été effectuée en prenant en compte les 25 variables des paramètres abiotiques et les cinq activités enzymatiques microbiennes mesurées sur les terres après la récolte (Annexe 8). Le plan F1-F3 explique 48% de la variabilité totale (Figure 49). Selon l'axe F1, les plantes inoculées par les souches A113-23 et A113-36 (abscisses négatives) se discriminent de la plupart des traitements non plantés (abscisses positives). Globalement, les échantillons qui correspondent aux sols rhizosphériques sont corrélés positivement avec les activités enzymatiques microbiennes (ACCd, phosphatase alcaline et β -glucosidase) alors qu'ils sont corrélés négativement avec les éléments échangeables ou extractibles à DTPA (Ni, Mg, Na, Fe). La présence de plante (inoculée ou non) stimulerait donc certaines activités microbiennes et impliquerait une diminution du Ni biodisponible (Ni-DTPA). Les échantillons issus des terres plantées non inoculées ou inoculées par la souche A113-13 ne se discriminent pas sur le plan F1-F3. La souche faiblement bioaccumulatrice de Ni, A113-13, n'induit pas de changement significatif sur les paramètres abiotiques et les activités enzymatiques des terres. De même, les plantes inoculées par la souche A113-23 ne sont pas réparties différemment des plantes non inoculées, ce qui sous-entendrait un effet peu marqué de la souche A113-23.

En résumé, en absence d'inoculation (ni), les échantillons issus des sols plantés ou non plantés ne se discriminent pas clairement. Il n'y aurait donc pas d'effet plante marqué après 2 mois de culture. Les échantillons issus des sols plantés ou non mais inoculés par la souche A113-13, faiblement bioaccumulatrice de Ni, ne se discriminent pas des témoins non inoculés, plantés ou non. Les échantillons plantés inoculés par la souche A113-23, modérément bioaccumulatrice de Ni, se discriminent de ceux non plantés inoculés par cette même souche, ce qui souligne un impact de la présence de la plante. Par contre, l'inoculation de la plante par cette souche A113-23 ne semble pas avoir d'effet (aucune discrimination entre les sols plantés non inoculés et ceux plantés inoculés par cette souche). Cependant les échantillons de terres nues inoculés se discriminent de ceux non inoculés sur l'axe F1. Enfin, suite à l'inoculation par la souche A113-36, fortement bioaccumulatrice de Ni, les échantillons rhizosphériques inoculés se discriminent clairement de ceux non plantés et inoculés par cette souche, ce qui traduit l'impact de la présence de la plante. De plus, la discrimination entre les échantillons plantés et inoculés par cette souche A113-36 avec ceux plantés non inoculés souligne un effet de l'inoculation de *O. chalcidica* par cette souche.

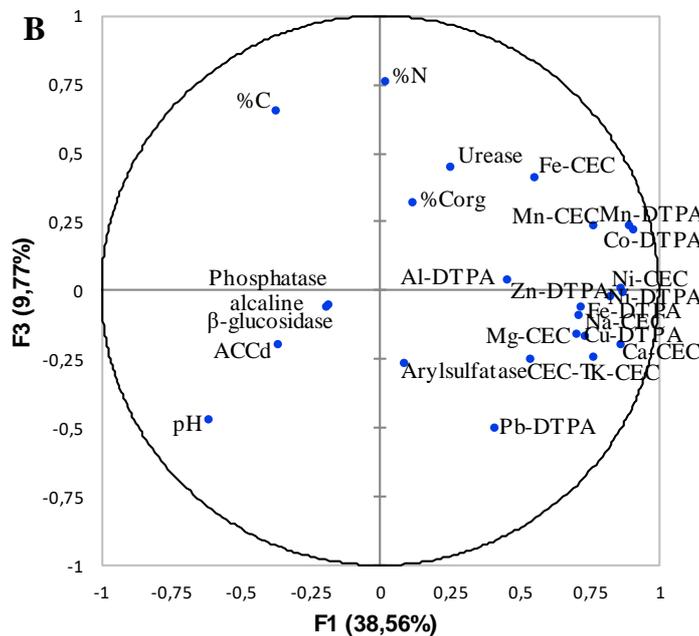
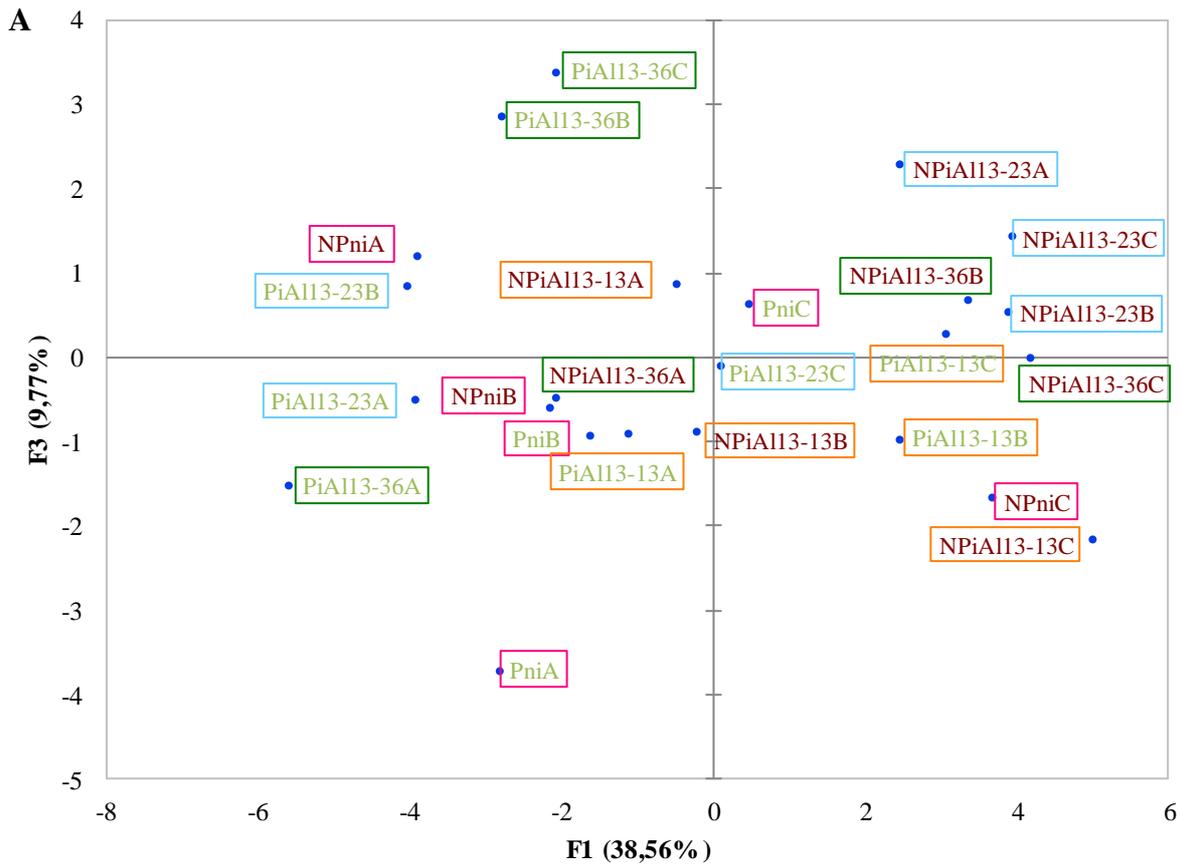


Figure 49 : Analyse en Composantes Principales des terres de culture

- (A) Coordonnées des individus avec P : planté, NP : non planté, ni : non inoculé, iA113-13 : inoculé avec la souche A113-13, iA113-23 : inoculé avec la souche A113-23, iA113-36 : inoculé avec la souche A113-36, A, B et C : les différents blocs
- (B) Corrélations entre les différentes variables avec XX-DTPA : éléments extractibles au DTPA, XX-CEC : éléments échangeables, CEC-T : CEC totale, %N : N total, %C : C total et %Corg : C organique

2.3. L'effet de l'inoculation sur la structure et la diversité des communautés bactériennes

L'analyse bioinformatique des données de génomique obtenues par séquençage à haut débit des échantillons d'ADNs de terres rhizosphériques et non rhizosphériques, inoculées ou non, aboutit à 1 474 602 séquences, regroupées sous 2 340 OTUs différentes appartenant à 22 phyla. Les abondances relatives de chaque phyla ont été calculées et les phyla représentés à moins de 1% dans les différents échantillons ont été regroupés sous la dénomination "Autres (<1%)" (*Armatimonadetes*, *Chlamydiae*, *Cyanobacteria*, *Elusimicrobia*, *Fibrobacteres*, *GAL15*, *Latescibacteria*, *Nitrospirae*, *Patescibacteria*, *Rokubacteria*, *Spirochaetes*, *Tenericutes*, *Verrucomicrobia* et *WPS-2*). Enfin, 0,36% des séquences n'ont pu être affiliées taxonomiquement.

Les huit phyla les mieux représentés sont : *Proteobacteria* (36,8%) > *Actinobacteria* (20,8%) > *Acidobacteria* (19,6%) > *Chloroflexi* (6,0%) > *Planctomycetes* (4,6%) > *Gemmatimonadetes* (4,5%) > *Bacteroidetes* (2,9%) > *Firmicutes* (1,2%) (Figure 50). Les abondances relatives des phyla des *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Gemmatimonadetes* et *Planctomycetes* à la récolte, et quels que soient les traitements, sont significativement différentes de celles à observées en début d'expérimentation avant inoculation (T0). Elles sont inférieures pour les phyla des *Acidobacteria* et *Gemmatimonadetes* et supérieures pour les phyla des *Actinobacteria* et *Planctomycetes*. Il n'y a pas de différences significatives entre les abondances relatives à T0 et celles des autres phyla. Concernant le phylum des *Gemmatimonadetes*, l'échantillon non planté inoculé avec la souche A113-23 possède une abondance relative significativement proche de celles retrouvées pour les terres rhizosphériques de *O. chalcidica*, inoculée ou non.

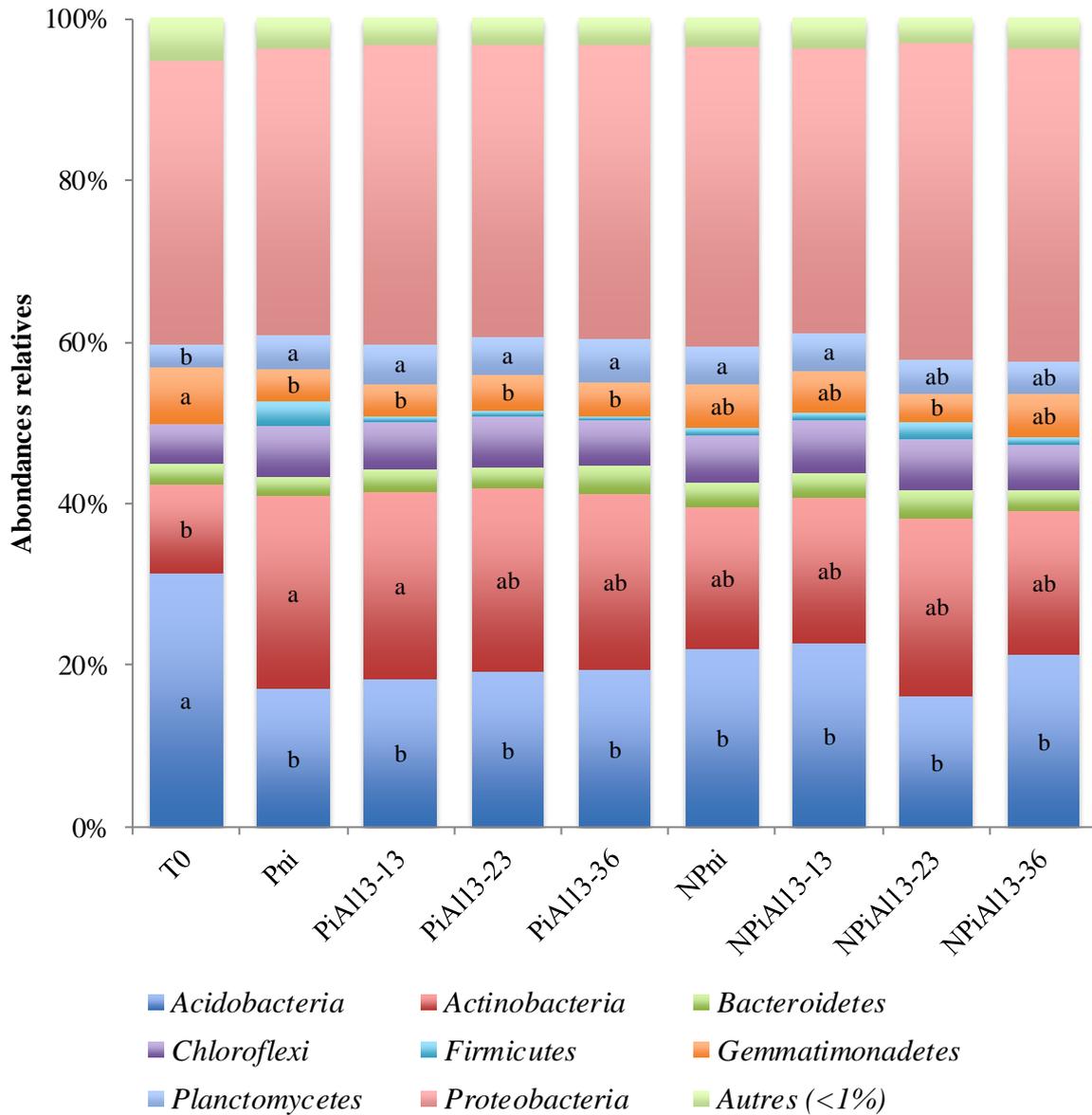


Figure 50 : Abondance relative des phyla majoritaires des terres à T0 et à la récolte, inoculées ou non par les 3 souches de PGPR

P : planté, NP : non planté, ni : non inoculé, iA113-13 : inoculé avec la souche A113-13, iA113-23 : inoculé avec la souche A113-23, iA113-36 : inoculé avec la souche A113-36 ; les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à $p = 0,05$ (TukeyHSD test), $n = 3$

Des corrélations de Spearman ont été calculées entre l'abondance relative des 13 phyla majoritaires et les paramètres abiotiques des terres rhizosphériques (Figure 51). Seules les corrélations significatives ($p < 0,1$) ont été retenues. L'abondance relative du phylum des *Gemmatimonadetes* est corrélée négativement avec les éléments échangeables des terres : Ca, K, Mg, Mn et Na. Les abondances relatives des phyla des *Acidobacteria* et *Planctomycetes* sont corrélées négativement avec de nombreuses variables abiotiques mais montrent une corrélation positive avec le pH. Inversement, les abondances relatives des phyla *Chloroflexi* et *Proteobacteria* sont corrélées négativement avec le pH. L'abondance relative du phylum des *Chloroflexi* est corrélée positivement avec le Mg échangeable. Celles des *Proteobacteria* sont également corrélées positivement avec l'Al extractible au DTPA, le Fe et le Ni échangeable et le Corg. Les abondances relatives des phyla des *Actinobacteria* et *Firmicutes* présentent de manière générale des corrélations positives avec les variables abiotiques alors qu'inversement celle du phylum des *Gemmatimonadetes* ne montre que des corrélations négatives.

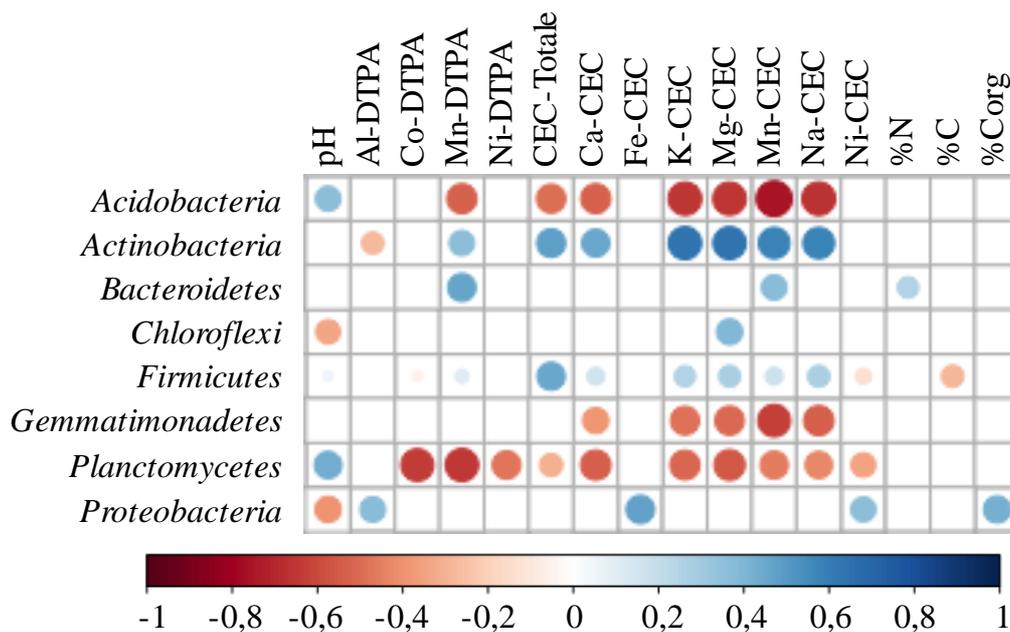


Figure 51 : Matrice de corrélations entre les paramètres abiotiques des terres à la récolte et les huit phyla bactériens majoritaires

basée sur le coefficient de corrélation r de Spearman, les blancs correspondent à un coefficient non significatif ($p > 0,1$) ; %N : % d'azote total, %C : % de carbone total, %Corg : % de C organique, xx-DTPA : éléments extractibles au DTPA, XX-CEC : éléments échangeables

Les indices d' α -diversité (OTUs observées, Chao1 et Shannon) ont été calculés pour les terres rhizosphériques et non rhizosphériques (Tableau 50). Aucune différence significative n'a été mise en évidence ($\alpha = 0,05$) entre les différents traitements. Les échantillons comprennent entre 2 143 et 2 266 OTUs sur les 2 340 OTUs observées. L'indice de Chao1 est compris entre 2 230 et 2 301. Ainsi, au minimum, 93% de la diversité réelle de nos échantillons est représentée ($\frac{\text{OTUs observées}}{\text{Chao1}} \times 100$). L'indice de Shannon est compris entre 9,37 et 9,75 soulignant une grande diversité au sein des différents échantillons.

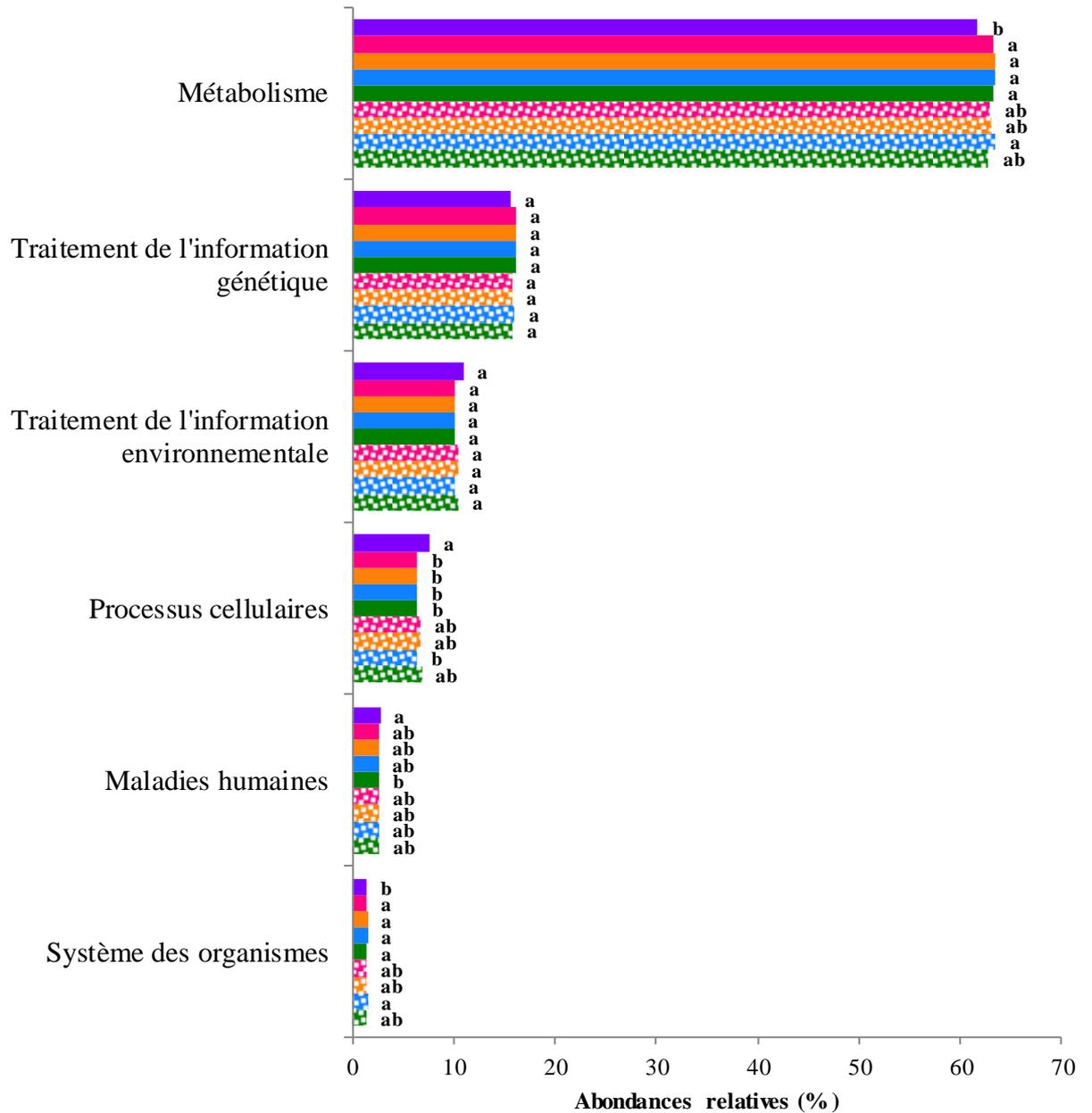
Tableau 50 : Indices d' α -diversité

P : planté, NP : non planté, ni : non inoculé, iA113-13 : inoculé avec la souche A113-13, iA113-23 : inoculé avec la souche A113-23, iA113-36 : inoculé avec la souche A113-36 ; la moyenne et l'écart type sont donnés pour les 3 répétitions

Echantillon	OTUs	Chao1	Shannon
T0	2143 ± 44	2230 ± 20	9,73 ± 0,10
Pni	2216 ± 51	2283 ± 32	9,51 ± 0,23
PiA113-13	2247 ± 46	2286 ± 27	9,71 ± 0,05
PiA113-23	2235 ± 66	2278 ± 51	9,70 ± 0,14
PiA113-36	2212 ± 97	2261 ± 68	9,56 ± 0,23
NPni	2244 ± 48	2295 ± 22	9,68 ± 0,04
NPiA113-13	2253 ± 19	2299 ± 21	9,75 ± 0,06
NPiA113-23	2187 ± 45	2236 ± 50	9,37 ± 0,13
NPiA113-36	2266 ± 17	2301 ± 20	9,65 ± 0,13

2.4. L'effet de l'inoculation sur la diversité fonctionnelle des communautés bactériennes

Les métagénomés prédits par le package Tax4Fun permettent de retrouver les six grandes familles de gènes classiques (Figure 52). Ces familles appartiennent aux fonctions "métabolisme", "traitement de l'information génétique", "traitement de l'information environnementale", "processus cellulaires", "maladies humaines" et "système des organismes". Aucune différence significative n'est mise en évidence pour les fonctions de traitement de l'information génétique et environnementale. Les gènes liés aux fonctions de métabolisme et du système des organismes sont statistiquement plus abondants pour les quatre modalités avec plante (inoculée ou non) et pour les terres non plantées inoculées avec la souche A113-23, en comparaison de T0. La tendance inverse se retrouve pour les gènes liés à la fonction de processus cellulaire, avec une abondance plus élevée à T0. Concernant les gènes liés à la fonction de maladie humaine, ils sont statistiquement plus abondants à T0 que pour la modalité plantée inoculée avec la souche A113-36.



■ T0 ■ Pni ■ PiA113-13 ■ PiA113-23 ■ PiA113-36 ■ NPni ■ NPiA113-13 ■ NPiA113-23 ■ NPiA113-36

Figure 52 : Abondances relatives (%) des familles de fonctions prédites pour les communautés bactériennes rhizosphériques des terres de culture

P : planté, NP : non planté, ni : non inoculé, iA113-13 : inoculé avec la souche A113-13, iA113-23 : inoculé avec la souche A113-23, iA113-36 : inoculé avec la souche A113-36 ; les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à $p = 0,05$ (test TukeyHSD), $n = 3$

A un niveau plus fin de l'analyse des familles de gènes, nous retrouvons 41 KO appartenant aux six grands groupes fonctionnels. Seuls les KO avec une abondance relative supérieure à 1% et présentant des différences significatives entre les différentes modalités de l'expérimentation ont été conservés sur la Figure 53. Ainsi, seules les familles "métabolisme" et "processus cellulaires" ont été conservées. La famille liée aux "processus cellulaires" est représentée par les gènes liés à la mobilité cellulaire et à la croissance et mort cellulaire. Ces gènes sont significativement plus abondants à T0 que pour les terres après récolte, qu'elles soient rhizosphériques ou non. Les gènes impliqués dans les fonctions liées au métabolisme sont les plus nombreux. Ceux liés au métabolisme des terpénoïdes et polycétides, lipidique, des xénobiotiques et des autres acides aminés sont significativement moins abondants à T0 que pour les terres après récolte. Inversement, les gènes liés à la biosynthèse et au métabolisme du glycane sont mieux représentés en début d'expérimentation à T0. Le métabolisme des carbohydrates, qui est le plus abondant, est significativement plus représenté dans les terres rhizosphériques après culture (que les plantes aient été inoculées ou non) que dans la terre issue du prélèvement à T0.

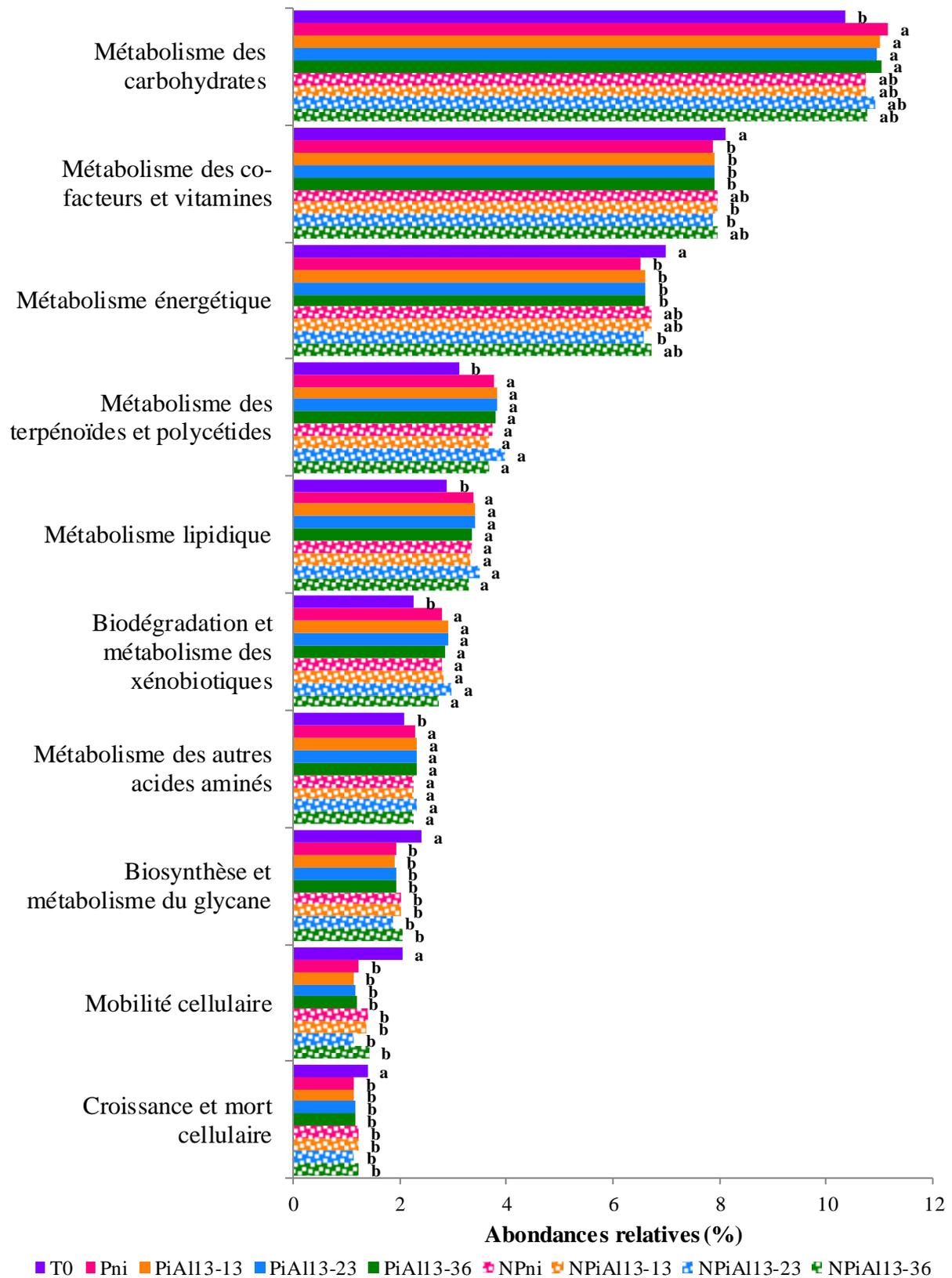


Figure 53 : Abondances relatives (%) des KO majoritaires (>1%) prédits pour les communautés bactériennes rhizosphériques des plantes hyperaccumulatrices

P : planté, NP : non planté, ni : non inoculée, iA113-13 : inoculé avec la souche A113-13, iA113-23 : inoculé avec la souche A113-23, iA113-36 : inoculé avec la souche A113-36 ; les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à p = 0,05 (test TukeyHSD), n = 3

Discussion : Inoculation de *Odontarrhena chalcidica* par des bactéries PGPR

Afin de stimuler l'agromine du Ni, une recherche de PGPR dans la rhizosphère de *O. chalcidica* a été effectuée. Ainsi, une proportion non négligeable de bactéries Ni^R existe dans la rhizosphère de cet hyperaccumulateur. En effet, nous avons retrouvé que 2,25% des bactéries cultivables étaient résistantes à 2,5 mM de Ni, alors qu'à 10 mM ce pourcentage chute à 0,7%. Ces résultats sont en accord avec ceux de Aboudrar *et al.* (2007) et Durand *et al.* (2015) qui, au travers de leurs études, obtenaient des pourcentages de bactéries Ni^R allant de 81% à 0,5 mM de Ni à 0,76% avec des milieux de culture contenant 10 mM de Ni. Ces concentrations de Ni peuvent sembler très élevées (400 à 1 000 fois plus) par rapport aux concentrations de Ni dans les sols ultramafiques (Bani *et al.*, 2015), mais il est établi qu'une quantité importante de Ni ajouté au milieu de culture est adsorbée sur la gélose. En outre, notre choix de concentrations importantes se justifie par le fait que nous souhaitions être aussi sélectifs que dans les nombreuses études précédentes quant au criblage de souches résistantes au Ni (Schlegel *et al.*, 1991 ; Abou-Shanab *et al.*, 2003b ; Turgay *et al.*, 2011 ; Cabello-Conejo *et al.*, 2014a).

Parmi ces bactéries résistantes, plus des trois quarts (82%) possèdent au moins un des traits PGP criblés. Ceci équivaut donc à 1,85% des bactéries rhizosphériques cultivables. Nos résultats sont ainsi en accord avec la littérature qui souligne que 2 à 5% des rhizobactéries cultivables ont un potentiel PGPR (Antoun et Kloepper, 2001).

Les PGPR peuvent appartenir à de nombreux genres bactériens (Kloepper *et al.*, 1989 ; Glick, 1995 ; Benizri *et al.*, 2001 ; Madhaiyan *et al.*, 2006 ; Jha et Saraf, 2015) et ont été, dans notre travail, affiliées aux genres *Chryseobacterium*, *Dyadobacter*, *Janthinobacterium*, *Methylobacterium*, *Rhodococcus*, *Shinella*, *Streptomyces* et *Tardiphaga*. Parmi ces genres, cinq possèdent les quatre traits PGP ciblés, à savoir une activité ACCd, une production de sidérophores, une capacité à solubiliser le phosphore et une production de composés auxiniques.

Le genre *Rhodococcus* est affilié au phylum des *Actinobacteria* et à la famille des *Nocardiaceae*. Les capacités PGPR du genre *Rhodococcus* sont connues avec une production de composés auxiniques, une solubilisation du P, une activité ACCd ou encore une production de sidérophores (Belimov *et al.*, 2005 ; Qaisrani *et al.*, 2014), ce qui correspond aux traits PGP que possèdent les 3 souches de *Rhodococcus* retenues. Belimov *et al.* (2005) ont mis en évidence une production de 35 $\mu\text{g AIA mg}^{-1}$ de protéines et de 10,5 $\mu\text{M d}'\alpha\text{-kétobutyrate mg}^{-1}$ de protéine h^{-1} , ce qui confirme les résultats obtenus pour les 3 souches de *Rhodococcus* isolées, avec respectivement de 0,4 à 73 $\mu\text{g AIA mg}^{-1}$ de protéines pour la production de composés auxiniques et de 0,7 à 10,5 $\mu\text{M d}'\alpha\text{-kétobutyrate mg}^{-1}$ de protéine h^{-1} pour l'activité ACCd. Álvarez-López *et al.* (2016b), après une inoculation de *Nicotiana tabacum* par une souche de *R. erythropolis* ont mis en évidence une plus forte accumulation de Cd et Zn par cette plante, du fait, en partie, des propriétés PGPR de la bactérie retenue dans leur étude. Cette souche a également exprimé son effet PGPR lors de la culture de plantes hyperaccumulatrices de Cd et Zn comme *Sedum plumbizincicola* (Liu *et al.*, 2015) ou d'As telle *Pteris vittata* (Yang *et al.*, 2012).

Bien que quatre souches appartenant au genre *Rhodococcus* aient été isolées et présentent, d'une part, une résistance au Ni et d'autre part, des propriétés PGPR, elles ont montré des aptitudes différentes à bioaccumuler le Ni dans leur compartiment intracellulaire. L'espèce considérée peut être à l'origine de cette internalisation plus ou moins importante. En effet, il a été démontré qu'une espèce du genre *Rhodococcus*, *Rhodococcus rhodochrous*, possède le transporteur de Co^{2+} NhlF, qui a une grande similarité avec la Ni perméase HoxN, et permet donc à la fois d'internaliser du Co et du Ni dans la cellule (Degen *et al.*, 1999). En présence uniquement de Ni, cette souche possède donc une meilleure aptitude à bioaccumuler le Ni dans son compartiment intracellulaire. Dans notre étude, la souche A113-36 est celle qui est la plus à même à bioaccumuler le Ni et pourrait posséder ce type de transporteur. Nous avons choisi de conserver ces 3 souches de *Rhodococcus*, dans la suite de notre étude, pour définir si une souche PGPR, plus ou moins fortement accumulatrice de Ni, peut modifier l'hyperaccumulation du métal par la plante elle-même.

L'inoculation de PGPR est une stratégie envisageable pour augmenter les performances des plantes hyperaccumulatrices et le rendement de l'agromine. Dans leur méta-analyse, Sessitsch *et al.* (2013) ont rapporté des résultats contrastés des effets de l'inoculation avec des souches PGPR sur les performances de différentes espèces végétales, observant tantôt une augmentation de la biomasse aérienne (68% des cas), tantôt une diminution (3% des cas), ou encore aucun effet (29% des cas). Les essais menés par Álvarez-López *et al.* (2016b) avec *Nicotiana tabacum* ont montré qu'une souche de *Rhodococcus erythropolis* PGPR peut engendrer une meilleure accumulation de métaux lorsque l'inoculation est faite au niveau du collet mais qu'elle reste sans effet lorsque l'inoculum est introduit directement dans la terre. Dans notre travail, l'hyperaccumulateur *O. Chalcidica* inoculé avec des souches PGPR isolées de la rhizosphère n'a montré aucune modification de sa production de biomasse et de la concentration du Ni dans ses tissus. La concentration de l'inoculum était pourtant conforme à celles classiquement utilisées lors des expérimentations testant des PGPR et était beaucoup plus élevée que dans l'expérience de Álvarez-López *et al.* (2016b) (170 fois). Ainsi, nos résultats reflétant une absence de réponse de *O. Chalcidica* à l'inoculation correspondent au tiers des situations rapportées par Sessitsch *et al.* (2013) et reflètent la complexité des interactions plante-microorganismes, amplifiée ici par la particularité des plantes hyperaccumulatrices.

L'accumulation du Ni est l'expression d'une gamme de propriétés liées au sol et à la plante. En ce qui concerne le sol, la fertilité physique et chimique est importante pour le développement des racines et la nutrition de la plante. La disponibilité du métal est aussi une propriété essentielle dans le contexte d'agromine, car elle contrôle les flux de Ni vers les surfaces racinaires et son absorption (Bani *et al.*, 2015). Les souches PGPR peuvent modifier la disponibilité du Ni dans le sol, comme cela a été montré avec *O. chalcidica* inoculé avec une souche PGPR (Abou-Shanab *et al.*, 2003a ; Becerra-Castro *et al.*, 2013 ; Durand *et al.*, 2015).

Dans notre expérience, nous observons que la concentration du Ni extractible au DTPA, observée en fin d'expérience, est diminuée par la présence de la plante. Cependant, l'inoculation est restée sans effet sur ce paramètre. Cette diminution est le résultat de l'épuisement par l'hyperaccumulateur de la fraction biodisponible du métal. Nous avons aussi observé des fluctuations de la concentration du Ni en solution au cours du temps. Elles montrent que la dynamique de l'élément est complexe et fortement modifiée par la présence de la plante. La concentration en solution à une période donnée dépend à la fois d'un effet direct de la plante en fonction de ses besoins en Ni, et d'un effet indirect par la modification de paramètres physico-chimiques par les racines actives. Ainsi de faibles concentrations en solution ont été observées après une période de forte demande de la plante, et des concentrations plus élevées ultérieurement en fin d'expérience, lorsque que la plante prélève moins ou plus du tout. Mais l'acidification de près d'une unité pH enregistrée en présence de plante a pu largement contribuer à la mise en solution du Ni (Babich *et al.*, 1980).

Bien que caractère bioaccumulateur du Ni par les souches PGPR n'a pas eu d'influence sur l'accumulation du métal par la plante inoculée, il est à l'origine du changement de dynamique du Ni dans le sol et, en particulier, la fraction extractible au DTPA. En effet, la souche faiblement bioaccumulatrice de Ni (A113-13) n'a pas eu d'effet, tandis que la souche fortement bioaccumulatrice (A113-36) a engendré une diminution du Ni extractible au DTPA dans la rhizosphère des plantes inoculées. Il faut admettre que cette dernière s'est implantée durablement dans la rhizosphère de *O. chalcidica* et qu'elle est à l'origine d'une augmentation d'activités enzymatiques microbiennes telles la phosphatase alcaline, la β -glucosidase et l'ACCd. La forte activité ACCd et la grande capacité à solubiliser le P pourraient expliquer que ces activités enzymatiques soient plus élevées dans les terres rhizosphériques de cette modalité. Elle induirait aussi une augmentation du pourcentage en C total et du pH. De plus, l'activité ACCd conduisant à la dégradation de l'ACC en source de C et N expliquerait également le fait que cette modalité soit corrélée à un pourcentage de C total élevé dans ces rhizosphères des plantes inoculées par cette souche (Glick, 2014)

Les valeurs les plus faibles de Ni extractible au DTPA observées dans les terres rhizosphériques de *O. chalcidica* inoculée par la souche bioaccumulatrice A113-36 démontrent qu'il pourrait y avoir une interaction forte entre la plante et la bactérie qui se traduit par une compétition pour le Ni. Les concentrations du Ni dans la plante (PA et PR) sont similaires avec ou sans inoculum. Ainsi, il est possible que la demande de la bactérie en Ni ait pénalisé la plante qui n'a pas pu "sur-accumuler" le Ni.

L'inoculation de *O. chalcidica* par la souche A113-23 n'engendre aucune discrimination vis-à-vis de *O. chalcidica* non inoculée. Cependant, il est possible d'observer une discrimination entre les échantillons non plantés inoculés avec la souche de *Rhodococcus* A113-23 en comparaison de ceux non plantés et non inoculés. De plus, les terres sans plante et inoculées avec cette souche ne possèdent pas la même diversité bactérienne que les autres terres nues, inoculées ou non. Ainsi, cette souche a eu la capacité de s'implanter dans les terres sans présence de plante, où la compétition bactérienne est moins rude que dans l'environnement rhizosphérique. La présence de la souche A113-23 dans les terres sans plante a induit une diminution de l'abondance relative du phylum des *Gemmatimonadetes*. Or, il a été démontré que ce phyla est sensible à la présence de métaux (Guo *et al.*, 2017), et c'est pour les terres non plantées inoculées par la souche A113-23 que les métaux sont les plus présents.

Concernant les rhizosphères de *O. chalcidica*, l'inoculation des souches PGPR n'a pas induit de changement drastique, ni dans la diversité bactérienne, ni dans les fonctions prédites. Ceci est encourageant dans le cadre d'une stratégie d'agromine couplée à une approche de bioaugmentation. En effet, des changements de la structure et diversité bactériennes éventuellement induits suite à l'inoculation de bactéries PGPR peuvent ne pas être souhaitables si ces inoculations induisaient la perte d'espèces indigènes importantes et de leurs fonctions, ce qui pourrait affecter le fonctionnement biologique du sol et le développement des cultures mises en place (Roesti *et al.*, 2006). Cependant, les analyses n'ont pas été faites directement après inoculation des milieux mais 2 mois après. L'impact de l'inoculation sur les communautés microbiennes a donc pu être atténué. Le processus de résilience permettrait d'expliquer cela, impliquant un retour de la communauté microbienne à sa composition d'origine après avoir été perturbée (Allison et Martiny, 2008) ; cette potentielle perturbation étant engendrée, dans notre travail, par une inoculation.

Conclusion

La compétition pour le Ni entre les plantes hyperaccumulatrices et les bactéries est une question essentielle dans une optique d'inoculation de PGPR pour l'optimisation de l'agromine. Les bactéries les plus représentées dans la rhizosphère de *O. chalcidica* sont affiliées au genre *Rhodococcus*. Trois des souches de *Rhodococcus* isolées de sa rhizosphère possèdent les quatre traits PGP criblés et présentent un profil de bioaccumulation du Ni différent, allant d'une faible bioaccumulation à une forte bioaccumulation de Ni. Nous avons testé en conditions contrôlées la réponse de la plante hyperaccumulatrice de Ni, inoculée par une bactérie bioaccumulatrice et choisie pour sa large gamme de traits PGP.

Nous montrons que la souche, fortement bioaccumulatrice de Ni, modifie la dynamique du Ni dans le sol par la diminution qu'elle engendre sur la fraction extractible du Ni. La plante quant à elle ne montre aucun changement dans sa capacité à accumuler le Ni. Il existe bien une compétition pour le Ni entre la plante et la bactérie inoculée. Celle-ci n'a par ailleurs pas montré les effets PGPR attendus.

Ainsi, pour une amélioration des rendements en Ni phytoextraits par les hyperaccumulateurs, il convient de cibler le potentiel de bioaccumulation des souches PGPR à inoculer pour être certain que le microorganisme introduit ne freine pas l'hyperaccumulation de métaux par la plante.

Conclusion générale et perspectives

Alors que la flore des environnements ultramafiques est bien caractérisée, la microflore hébergée dans la rhizosphère des hyperaccumulateurs reste mal connue. De plus, le déterminisme de la structuration et de la diversité bactérienne fait l'objet, dans la littérature, de controverses quant aux facteurs impliqués, *e.g.* le climat, l'espèce végétale, le type de sol. La description des cycles biogéochimiques du Ni dans les systèmes hyperaccumulateurs sols ultramafiques ainsi que le développement de l'agromine nécessitent une connaissance approfondie des interactions sol/racines/microorganismes et de leurs conséquences sur les flux de Ni vers et dans la plante.

Dans ce contexte, cette thèse s'est proposée de relever deux défis. Le premier a été de cerner le déterminisme de la diversité bactérienne rhizosphérique de plantes hyperaccumulatrices de Ni. Le second défi a été de tester l'intérêt de souches PGPR pour optimiser l'agromine, en s'attachant à l'importance des interactions rhizobactéries/hyperaccumulateurs/Ni.

Ainsi, la démarche s'est appuyée sur i) la prospection de régions ultramafiques sous deux climats contrastés en vue de sélectionner des hyperaccumulateurs, ii) la caractérisation des plantes et terres rhizosphériques prélevées et de la microflore associée, iii) la mise en œuvre d'approches de biologie moléculaire et d'analyses bioinformatiques pour cerner le déterminisme et les fonctions potentielles des communautés bactériennes, iv) l'isolement et l'identification de bactéries PGPR bioaccumulatrices de Ni, enfin v) un test d'optimisations de l'agromine avec l'hyperaccumulateur *O. chalcidica* inoculé par ces bactéries PGPR.

La première étape de cette recherche a permis de montrer que le déterminisme de la diversité des communautés bactériennes rhizosphériques en milieu ultramafique dépend étroitement de l'échelle spatiale considérée.

Par la caractérisation de la structure et de la diversité des communautés bactériennes dans quatre régions de latitudes différentes, nous montrons ainsi que, **à échelle mondiale, l'influence indirecte du climat sur la flore ultramafique est le facteur principal qui détermine la diversité des communautés bactériennes.** La diversité taxonomique (appréhendée par l'indice de Shannon) est plus faible pour les régions de faibles latitudes (climat tropical) alors qu'elle augmente pour celles des latitudes proches de 40° (climat méditerranéen). La latitude, qui intègre à la fois le type de climat et le type de végétation, est donc à l'origine du déterminisme de la diversité bactérienne rhizosphérique.

Pour le confirmer, il serait alors nécessaire d'étendre l'étude de la caractérisation de la diversité bactérienne à d'autres régions ultramafiques, sous d'autres latitudes, telles que les zones ultramafiques des Philippines (latitude 14°N), de Goiás au Brésil (latitude 15°S) ou de Nouvelle Calédonie (latitude 20°S). Sur la base d'une collection d'échantillons provenant d'un panel de zones ultramafiques plus large, il serait possible de construire un modèle prédictif de la diversité bactérienne (appréhendée par l'indice de Shannon) selon la latitude. Il serait également envisageable de mieux cerner l'influence du climat sur la diversité bactérienne rhizosphérique. Alors que le climat est le premier facteur régissant l'implantation des couverts végétaux, il n'a pas été possible, dans le cadre de cette thèse, d'évaluer qui du climat ou de l'espèce végétale, participe le plus à la structuration des communautés bactériennes. Pour éclaircir ce point, nous pourrions imaginer la mise en place d'expérimentations à l'image de celles conduites par Bonnier (1887), qui consisteraient soit i) à soumettre, en conditions contrôlées, une même plante hyperaccumulatrice de Ni à deux types de climats, à savoir méditerranéen et tropical, et de comparer ensuite la diversité des communautés bactériennes de sa rhizosphère soit ii) à envisager la caractérisation de la diversité des communautés bactériennes dans la rhizosphère d'une plante donnée, capable de se développer sur un gradient altitudinal important (et donc un climat différent) afin d'observer une modification éventuelle de la diversité des communautés bactériennes rhizosphériques. Ce dernier point renvoie à la notion de "plantation comparative" à l'aide de "jardins communs" (Lefèvre *et al.*, 2015), qui est l'outil le plus classique de la mesure de la diversité génétique de caractères adaptatifs et de leur plasticité des végétaux. Néanmoins, il conviendrait de s'assurer, sur la base de différents caractères phénotypiques (taille des individus végétaux, surfaces foliaires photosynthétiques, qualité et quantité de la rhizodéposition), de l'absence de toute plasticité phénotypique pour l'ensemble des caractères retenus du génotype étudié, afin d'être à même de ne cerner que l'effet du climat (ici l'altitude). Cette perspective apparaît donc difficile à envisager directement car elle nécessite de nombreuses mesures préalables.

A échelle plus restreinte, celle d'une région climatique, la physico-chimie des sols ultramafiques est le principal déterminant de la structure et de la diversité des communautés bactériennes, tandis que la nature de la plante hyperaccumulatrice n'exerce qu'une faible influence.

La comparaison de la diversité bactérienne de terres rhizosphériques et de terres non rhizosphériques permettrait certainement de préciser le rôle de la plante hyperaccumulatrice dans la sélection de bactéries spécifiques à son environnement racinaire. Il serait alors possible de mieux discriminer l'influence des paramètres physico-chimiques des terres sur la diversité bactérienne, considérés seuls (terres non rhizosphériques) ou modulés par la présence de la plante (terres rhizosphériques). Cela serait facilement envisageable dans la région des Balkans, où la végétation est peu dense. Cependant, sous climat tropical, le couvert végétal est d'une telle densité, que la végétation forme un tapis racinaire sur l'ensemble du territoire, impliquant l'absence de sol strictement non rhizosphérique. Pour pallier ce problème inhérent aux climats tropicaux, la mise en place d'expérimentations conduites en mésocosmes serait une alternative possible.

Nous avons montré aussi que ***R. bengalensis* exerce une influence largement supérieure à celle du sol sur la microflore bactérienne.** La plante paraît s'entourer, dans son environnement rhizosphérique, d'un cortège bactérien qui semble lui être propre. Nous avons émis plusieurs hypothèses pour expliquer cette particularité (*e.g.* transpiration élevée de la plante qui induirait une ambiance physico-chimique spécifique, exsudats racinaires qui favoriserait un cortège microbien particulier), mais *les mécanismes sous-jacents mériteraient d'être élucidés.* Plusieurs voies de recherche pourraient être envisagées. Une première serait d'étudier, *in situ*, la diversité bactérienne rhizosphérique de populations de *R. bengalensis* sur sols non ultramafiques, *e.g.* des populations dites "facultatives". Ceci permettrait, en comparaison avec nos résultats obtenus sur sols ultramafiques, de confirmer ou non, si cette espèce est à même de sélectionner un cortège microbien particulier, quelle que soit la physico-chimie du sol, comme en particulier, la concentration du Ni. Il serait également possible d'effectuer une expérimentation de "transplantation réciproque", en utilisant des individus de *R. bengalensis* issus de sols ultramafiques et non ultramafiques, plantés sur les deux types de sols. Ceci permettrait de cerner si les espèces issues de sols ultramafiques possèdent une diversité bactérienne proche, quel que soit le type de sol, et inversement, ce qui permettrait au final d'affirmer ou non si *R. bengalensis* sélectionne un microbiome identique quels que soient son origine et son support de culture.

Pour une approche à finalité plus appliquée, nous avons engagé le criblage de bactéries PGPR pour optimiser l'agromine. L'objectif était ici de répondre à la question, à ce jour jamais abordée dans la littérature, de la potentielle compétition pour le Ni entre une plante hyperaccumulatrice de Ni et des souches PGPR bioaccumulatrices de Ni. Alors que la souche PGPR fortement bioaccumulatrice de Ni n'a pas eu d'influence sur l'accumulation du métal par la plante inoculée, elle a modifié significativement la dynamique du Ni dans le sol par la diminution qu'elle engendre sur la fraction extractible du Ni. **Il existe donc une interaction forte entre la plante et la bactérie qui se traduit par une compétition pour le Ni.** Il semble cependant nécessaire de *réitérer l'expérimentation d'inoculation de *O. chalcidica* avec les trois souches de *Rhodococcus* PGPR sélectionnées.* Dans la mesure où il pourrait exister une certaine spécificité entre l'aptitude d'une souche bactérienne à coloniser un sol et la rhizosphère d'une plante, une nouvelle expérience pourrait être mise en place en choisissant de conduire la culture de *O. chalcidica* sur un sol albanais à partir de graines prélevées sur des individus se développant dans cet environnement. En effet, l'implantation des souches PGPR (la rhizocompétence) pourrait être optimale dans leur environnement d'origine et les souches inoculées montrer une meilleure colonisation de la rhizosphère de l'écotype de *O. chalcidica* dont elles sont issues. De plus, il peut être envisagé de modifier génétiquement les trois souches de *Rhodococcus* retenues pour leur faire exprimer la *green fluorescent protein* (protéine GFP isolée de la méduse *Aequorea victoria*, émettant une fluorescence sous UV) afin d'effectuer un suivi dans le temps de la potentielle colonisation et survie des souches PGPR dans les terres inoculées, avec ou sans présence de racines de *O. chalcidica*.

Nos travaux ont mis en évidence une **internalisation du Ni par certaines souches PGPR étudiées.** *La localisation cellulaire du Ni chez la souche de *Rhodococcus* capable de le bioaccumuler devrait être précisée.* Pour cela, il conviendrait d'envisager une fragmentation cellulaire qui permettrait de doser le Ni dans différents compartiments bactériens : cytoplasme, périplasma et membranes. Une approche de microscopie électronique à transmission couplée à l'analyse de spectroscopie des rayons X, déjà initiée en fin de thèse, pourrait permettre de localiser plus finement le Ni dans la cellule. L'application en MET serait envisagée, à la fois pour une analyse des cellules bactériennes entières, mais aussi uniquement sur les fractions membranaires. Ceci permettrait de discerner si c'est un processus de bioaccumulation qui est observé chez *Rhodococcus*, avec une internalisation du Ni, et/ou s'il s'agit d'adsorption du métal sur les membranes bactériennes.

L'inoculation de l'hyperaccumulateur *O. chalcidica* n'a pas induit de changements significatifs au niveau des communautés bactériennes telluriques, que ce soit en termes de diversité bactérienne ou fonctionnelle. De plus, cette inoculation n'a pas eu d'effet sur l'hyperaccumulation du métal par la plante mais il serait possible d'étudier l'impact d'une inoculation de bactérie PGPR bioaccumulatrice de Ni sur l'expression des gènes chez *O. chalcidica*. Ceci permettrait d'évaluer cet effet sur la plante elle-même, par comparaison du transcriptome des plantes en utilisant la stratégie de RNAseq. Il serait également possible de visualiser si une inoculation de bactéries PGPR peut entraîner une plus forte expression des transporteurs du Ni chez l'hyperaccumulateur ce qui induirait une augmentation de l'hyperaccumulation, déjà observée dans plusieurs études.

Nous avons établi que **la mise en place de l'agromine en climat tropical serait deux fois plus efficace, en termes de rendements en Ni, que l'agromine développée en Albanie** (Lopez *et al.*, 2018). Il apparaît donc important de *développer la phytextraction du Ni couplée à la bioaugmentation pour l'agromine en climat tropical*. Le criblage de bactéries PGPR a été également mené durant cette thèse (mais non présenté) à partir de la rhizosphère de *R. bengalensis* et *P. securinegoides*. L'étude directement sur le terrain, en Malaisie, pour améliorer les rendements en Ni par ces deux hyperaccumulateurs, *via* une inoculation de bactéries PGPR, s'avère indispensable désormais.

La caractérisation des communautés bactériennes de la rhizosphère de plantes hyperaccumulatrices endémiques aux régions ultramafiques, ainsi que des paramètres à l'origine de sa diversité, était jusqu'à ce jour peu abordée. Ce doctorat a contribué à une meilleure connaissance des acteurs microbiens en interaction avec ces plantes particulières. Cependant, de nouveaux questionnements ont été soulevés. Ainsi, il conviendrait de poursuivre les travaux entrepris afin d'aboutir à une meilleure compréhension du rôle de l'ensemble de ces acteurs et de leurs interactions, afin d'aboutir à une gestion optimisée des parcelles d'agromine.

Références

- Abouddrar, W., Schwartz, C., Benizri, E., Morel, J.L. et Boularbah, A. (2007) Soil microbial diversity as affected by the rhizosphere of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* under natural conditions. *International Journal of Phytoremediation* **9**: 41-52.
- Abou-Shanab, R.A.I., Angle, J.S., Delorme, T.A., Chaney, R.L., Van Berkum, P., Moawad, H. *et al.* (2003a) Rhizobacterial effects on nickel extraction from soil and uptake by *Alyssum murale*. *New Phytologist* **158**: 219-224.
- Abou-Shanab, R.A.I., Delorme, T.A., Angle, J.S., Chaney, R.L., Ghanem, K., Moawad, H. et Ghoulan, H.A. (2003b) Phenotypic characterization of microbes in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *International Journal of Phytoremediation* **5**: 367-379.
- Abou-Shanab, R.A.I., Angle, J. et Chaney, R. (2006) Bacterial inoculants affecting nickel uptake by *Alyssum murale* from low, moderate and high Ni soils. *Soil Biology and Biochemistry* **38**: 2882-2889.
- Abou-Shanab, R.A.I., van Berkum, P. et Angle, J.S. (2007) Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere* **68**: 360-367.
- Abou-Shanab, R.A.I., Ghanem, K., Ghanem, N. et Al-Kolaibe, A. (2008) The role of bacteria on heavy-metal extraction and uptake by plants growing on multi-metal-contaminated soils. *World J Microbiol Biotechnol* **24**: 253-262.
- Acosta-Martínez, V., Dowd, S., Sun, Y. et Allen, V. (2008) Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 2762-2770.
- Adams, D.O. et Yang, S.F. (1979) Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **76**: 170-174.
- Ahmed, E. et Holmström, S.J.M. (2014) Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology* **7**: 196-208.
- Alexander, D.B. et Zuberer, D.A. (1991) Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol Fert Soils* **12**: 39-45.
- Alexander, E.B. (2004) Varieties of ultramafic soil formation, plant cover and productivity. *Dans : Ultramafic rocks: Their soils, vegetation and fauna. Proceedings of the 4th international conference on serpentine ecology. Science Reviews, St. Albans, Herts, UK., p. 9-17.*
- Alkorta, I., Aizpurua, A., Riga, P., Albizu, I., Amézaga, I. et Garbisu, C. (2011) Soil enzyme activities as biological indicators of soil health. *Reviews on Environmental Health* **18**: 65-73.
- Allison, S.D. et Martiny, J.B.H. (2008) Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 11512-11519.
- Alvarez, A., Saez, J.M., Davila Costa, J.S., Colin, V.L., Fuentes, M.S., Cuozzo, S.A. *et al.* (2017) *Actinobacteria*: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. *Chemosphere* **166**: 41-62.
- Álvarez-Lopez, V., Prieto-Fernández, Á., Cabello-Conejo, M.I. et Kidd, P.S. (2016a) Organic amendments for improving biomass production and metal yield of Ni-hyperaccumulating plants. *Science of The Total Environment* **549**: 370-379.
- Álvarez-López, V., Prieto-Fernández, A., Janssen, J., Herzig, R., Vangronsveld, J. et Kidd, P.S. (2016b) Inoculation methods using *Rhodococcus erythropolis* strain P30 affects bacterial assisted phytoextraction capacity of *Nicotiana tabacum*. *International Journal of Phytoremediation* **18**: 406-415.
- Amann, R.L., Ludwig, W. et Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **59**: 143-169.

- Andreote, F.D., Azevedo, J.L. et Araújo, W.L. (2009) Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. *Brazilian Journal of Microbiology* **40**: 417-432.
- Antoun, H. et Kloepper, J. (2001) Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Dans : Encyclopedia of Genetics. Elsevier*, p. 1477-1480.
- Antoun, H. et Prévost, D. (2006) Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. *Dans : PGPR: biocontrol and biofertilisation.*, p. 1-38.
- Arianoutsou, M., Rundel, P.W. et Berry, W.L. (1993) Serpentine endemics as biological indicators of soil elemental concentrations. *Dans : Plants as biomonitors. Indicators for heavy metals in the terrestrial environment. Market B., Weinheim, Germany*, p. 179-189.
- Asher, C.J. (1991) Beneficial elements, functional nutrients, and possible new essential elements. *Micronutrients in Agriculture*, p. 703-723.
- Ashton, P.S. (1992) Species richness in plant communities. *Dans : Conservation Biology. Springer, Boston, MA*, p. 3-22.
- Abhauer, K.P., Wemheuer, B., Daniel, R. et Meinicke, P. (2015) Tax4Fun: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. *Bioinformatics* **31**: 2882-2884.
- Babich, H., Stotzy, G. et Ehrlich, H.L. (1980) Environmental factors that influence the toxicity of heavy metal and gaseous pollutants to microorganisms. *CRC Critical Reviews in Microbiology* **8**: 99-145.
- Badri, D.V., Chaparro, J.M., Zhang, R., Shen, Q. et Vivanco, J.M. (2013) Application of natural blends of phytochemicals derived from the root exudates of *Arabidopsis* to the soil reveal that phenolic related compounds predominantly modulate the soil microbiome. *J. Biol. Chem.* jbc.M112.
- Bahram, M., Hildebrand, F., Forslund, S.K., Anderson, J.L., Soudzilovskaia, N.A., Bodegom, P.M. *et al.* (2018) Structure and function of the global topsoil microbiome. *Nature* **560**: 233-237.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S. et Vivanco, J.M. (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 233-266.
- Baker, A.J.M. (1981) Accumulators and excluders – Strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition* **3**: 643-654.
- Baker, A.J.M. et Brooks, R.R. (1989) Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements: A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* **1**: 81-126.
- Baker, A.J.M., Proctor, J., van Balgooy, M.M.J. et Reeves, R.D. (1992) Hyperaccumulation of nickel by the flora of the ultramafics of Palawan, Republic of the Philippines. *Dans : The vegetation of ultramafic (serpentine) soils, Baker A.J.M., Proctor J., Reeves R.D. (éds)*, p. 291-304.
- Baker, A.J.M., McGrath, S., Reeves, R.D. et Smith, J.A.C. (2000) Metal hyperaccumulator plants: A review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water* **8**: 85-107.
- Ballard, H.E., de Paula-Souza, J. et Wahlert, G.A. (2014) *Violaceae*. *Dans : Flowering Plants. Eudicots: Malpighiales, The Families and Genera of Vascular Plants, Kubitzki, K. (éd), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg*, p. 303-322.
- Bani, A., Echevarria, G., Sulçe, S., Morel, J.L. et Mullai, A. (2007) *In-situ* phytoextraction of Ni by a native population of *Alyssum murale* on an ultramafic site (Albania). *Plant and Soil* **293**: 79-89.
- Bani, A., Echevarria, G., Mullaj, A., Reeves, R., Louis Morel, J. et Sulçe, S. (2009) Nickel hyperaccumulation by *Brassicaceae* in serpentine soils of Albania and northwestern Greece. *Northeastern Naturalist* **16**: 385-404.
- Bani, A., Pavlova, D., Echevarria, G., Mullai, A., Reeves, R.D., Morel, J.L. et Sulçe, S. (2010) Nickel hyperaccumulation by the species of *Alyssum* and *Thlaspi* (*Brassicaceae*) from the ultramafic soils of the Balkans. *Botanica Serbica* **34**: 3-14.
- Bani, A., Imeri, A., Echevarria, G., Pavlova, D., Reeves, R.D., Morel, J.L. et Sulçe, S. (2013) Nickel hyperaccumulation in the serpentine flora of Albania. *Fresenius Environmental Bulletin* **22**: 10.
- Bani, A., Echevarria, G., Sulçe, S. et Morel, J.L. (2015) Improving the agronomy of *Alyssum murale* for extensive phytomining: A five-year field study. *International Journal of Phytoremediation* **17**: 117-127.

- Barillot, C. (2012) Étude des potentialités rhizoremédiatrices et de la diversité des bactéries rhizosphériques d'*Arabidopsis halleri*, plante hyperaccumulatrice de Zn et Cd. Compiègne.
- Barns, S.M., Takala, S.L. et Kuske, C.R. (1999) Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom *Acidobacterium* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1731-1737.
- Baudoin, E., Benizri, E. et Guckert, A. (2002) Impact of growth stage on the bacterial community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting. *Applied Soil Ecology* **19**: 135-145.
- Beaman, J.H. (2005) Mount Kinabalu: Hotspot of plant diversity in Borneo. *Biologische Skrifter* 103-127.
- Becerra-Castro, C., Kidd, P., Kuffner, M., Prieto-Fernandez, A., Hann, S., Monterroso, C. et al. (2013) Bacterially induced weathering of ultramafic rock and its implications for phytoextraction. *Applied and Environmental Microbiology* **79**: 5094-5103.
- Becraft, E.D., Woyke, T., Jarett, J., Ivanova, N., Godoy-Vitorino, F., Poulton, N. et al. (2017) *Rokubacteria*: Genomic giants among the uncultured bacterial phyla. *Front. Microbiol.* **8**: 1-12.
- Belimov, A.A., Hontzeas, N., Safronova, V.I., Demchinskaya, S.V., Piluzza, G., Bullitta, S. et Glick, B.R. (2005) Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology and Biochemistry* **37**: 241-250.
- Benizri, E., Baudoin, E. et Guckert, A. (2001) Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology* **11**: 557-574.
- Benizri, E., Nguyen, C., Piutti, S., Slezack-Deschaumes, S. et Philippot, L. (2007) Additions of maize root mucilage to soil changed the structure of the bacterial community. *Soil Biology and Biochemistry* **39**: 1230-1233.
- Benizri, E. et Kidd, P.S. (2018) The role of the rhizosphere and microbes associated with hyperaccumulator plants in metal accumulation. Dans : *Agromining: Farming for metals: extracting unconventional resources using plants*, Van der Ent, A., Echevarria, G., Baker, A.J.M. et Morel, J.L. (éds), *Mineral Resource Reviews*. Springer International Publishing, Cham, p. 157-188.
- Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J. et Bakker, P.A.H.M. (2012) The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science* **17**: 478-486.
- Berg, G. et Smalla, K. (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* **68**: 1-13.
- Berger, V.I., Singer, D.A., Bliss, J.D. et Moring, B.C. (2011) Ni-Co Laterite Deposits of the World – Database and Grade and Tonnage Models. *U.S. Department of the Interior, U.S. Geological Survey Open-File Report*.
- Birkhofer, K., Bezemer, T.M., Bloem, J., Bonkowski, M., Christensen, S., Dubois, D. et al. (2008) Long-term organic farming fosters below and aboveground biota: Implications for soil quality, biological control and productivity. *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 2297-2308.
- Blaha, D., Prigent-Combaret, C., Mirza, M.S. et Moëgne-Loccoz, Y. (2006) Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic *Proteobacteria* and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiology Ecology* **56**: 455-470.
- Bollard, E.G. (1983) Involvement of unusual elements in plant growth and nutrition. *Encyclopedia of plant physiology. New series*.
- Bonnier, M.G. (1887) Note sur des cultures comparées des mêmes espèces à diverses altitudes. *Bulletin de la Société Botanique de France* **34**: 467-469.
- Boomer, S.M., Lodge, D.P., Dutton, B.E. et Pierson, B. (2002) Molecular characterization of novel red green nonsulfur bacteria from five distinct hot spring communities in Yellowstone National Park. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 346-355.
- Bordez, L., Jourand, P., Ducouso, M., Carriconde, F., Cavaloc, Y., Santini, S. et al. (2016) Distribution patterns of microbial communities in ultramafic landscape: a metagenetic approach highlights the strong relationships between diversity and environmental traits. *Molecular Ecology* **25**: 2258-2272.

- Bourceret, A., Cébron, A., Tisserant, E., Poupin, P., Bauda, P., Beguiristain, T. et Leyval, C. (2016) The bacterial and fungal diversity of an aged PAH- and heavy metal-contaminated soil is affected by plant cover and edaphic parameters. *Microb Ecol* **71**: 711-724.
- Bowen, G.D. et Rovira, A.D. (1999) The rhizosphere and its management to improve plant growth. Dans : *Advances in Agronomy, Sparks, D.L. (éd), Academic Press*, p. 1-102.
- Boyd, R.S. (2007) The defense hypothesis of elemental hyperaccumulation: status, challenges and new directions. *Plant and Soil* **293**: 153-176.
- Boyd, R.S., Davis, M.A., Wall, M.A. et Balkwill, K. (2002) Nickel defends the South African hyperaccumulator *Senecio coronatus* (Asteraceae) against *Helix aspersa* (Mollusca: Pulmonidae). *Chemoecology* **12**: 91-97.
- Boyd, R.S. et Jaffre, T. (2001) Phytoenrichment of soil Ni content by *Sebertia acuminata* in New Caledonia and the concept of elemental allelopathy. *South African Journal of Science* **97**: 535-538.
- Boyd, R.S. et Jaffré, T. (2009) Elemental concentrations of eleven New Caledonian plant species from serpentine soils: elemental correlations and leaf-age effects. *Northeastern Naturalist* 93-110.
- Brady, K.U., Kruckeberg, A.R. et Bradshaw, H.D. (2005) Evolutionary ecology of plant adaptation to serpentine soils. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **36**: 243-266.
- Branco, S. (2010) Serpentine soils promote ectomycorrhizal fungal diversity. *Molecular Ecology* **19**: 5566-5576.
- Broadhurst, C.L., Chaney, R.L., Angle, J.S., Mangel, T.K., Erbe, E.F. et Murphy, C.A. (2004) Simultaneous Hyperaccumulation of nickel, manganese, and calcium in *Alyssum* leaf trichomes. *Environmental Science & Technology* **38**: 5797-5802.
- Broadhurst, C.L., Tappero, R.V., Mangel, T.K., Erbe, E.F., Sparks, D.L. et Chaney, R.L. (2009) Interaction of nickel and manganese in accumulation and localization in leaves of the Ni hyperaccumulators *Alyssum murale* and *Alyssum corsicum*. *Plant Soil* **314**: 35-48.
- Broadhurst, C.L. et Chaney, R.L. (2016) Growth and metal accumulation of an *Alyssum murale* nickel hyperaccumulator ecotype co-cropped with *Alyssum montanum* and perennial ryegrass in serpentine soil. *Front Plant Sci* **7**: 451.
- Brooks, R.R. (1987) Serpentine and its vegetation: A multidisciplinary approach. *Discorides Press* 462.
- Brooks, R.R., Lee, J., Reeves, R.D. et Jaffré, T. (1977a) Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimen of indicator plants. *Journal of Geochemical Exploration* **7**: 49-57.
- Brooks, R.R., Wither, E.D. et Zepernick, B. (1977b) Cobalt and nickel in *Rinorea* species. *Plant Soil* **47**: 707-712.
- Brooks, R.R., Morrison, R.S., Reeves, R.D., Dudley, T.R. et Akman, Y. (1979) Hyperaccumulation of nickel by *Alyssum linnaeus* (Cruciferae). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **203**: 387-403.
- Brooks, R.R., Chambers, M.F., Nicks, L.J. et Robinson, B.H. (1998) Phytomining. *Trends in plant science* **3**: 359-362.
- Brooks, R.R. et Radford, C.C. (1978) Nickel accumulation by European species of the genus *Alyssum*. *Proc. R. Soc. Lond. B* **200**: 217-224.
- Brooks, R.R. et Wither, E.D. (1977) Nickel accumulation by *Rinorea bengalensis* (Wall.) O.K. *Journal of Geochemical Exploration* **7**: 295-300.
- Broughton, L.C. et Gross, K.L. (2000) Patterns of diversity in plant and soil microbial communities along a productivity gradient in a Michigan old-field. *Oecologia* **125**: 420-427.
- Buckley, D.H. et Schmidt, T.M. (2002) Exploring the biodiversity of soil – a microbial rain forest. *Biodiversity of microbial life* 183-208.
- Buée, M., De Boer, W., Martin, F., van Overbeek, L. et Jurkevitch, E. (2009a) The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant and Soil* **321**: 189-212.

- Buée, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R.H., Uroz, S. et Martin, F. (2009b) 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist* **184**: 449-456.
- Burd, G.I., Dixon, D.G. et Glick, B.R. (1998) A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Applied and environmental microbiology* **64**: 3663-3668.
- Burd, G.I., Dixon, D.G. et Glick, B.R. (2000) Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Can. J. Microbiol* **46**: 237-245.
- Butt, C.R.M. et Cluzel, D. (2013) Nickel laterite ore deposits: Weathered serpentinites. *Elements* **9**: 123-128.
- Cabello-Conejo, M.I., Becerra-Castro, C., Prieto-Fernández, A., Monterroso, C., Saavedra-Ferro, A., Mench, M. et Kidd, P.S. (2014a) Rhizobacterial inoculants can improve nickel phytoextraction by the hyperaccumulator *Alyssum pintodasilvae*. *Plant and Soil* **379**: 35-50.
- Cabello-Conejo, M.I., Prieto-Fernández, Á. et Kidd, P.S. (2014b) Exogenous treatments with phytohormones can improve growth and nickel yield of hyperaccumulating plants. *Science of The Total Environment* **495**: 1-8.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K. et al. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* **7**: 335-336.
- Carbonetto, B., Rascovan, N., Álvarez, R., Mentaberry, A. et Vázquez, M.P. (2014) Structure, composition and metagenomic profile of soil microbiomes associated to agricultural land use and tillage systems in Argentine pampas. *PLoS ONE* **9**: e99949.
- Cavagnaro, T. et Martin, A. (2011) Arbuscular mycorrhizas in southeastern Australian processing tomato farm soils. *Plant & Soil* **340**: 327-336.
- Cecchi, L., Gabbriellini, R., Arnetoli, M., Gonnelli, C., Hasko, A. et Selvi, F. (2010) Evolutionary lineages of nickel hyperaccumulation and systematics in European *Alyseae* (*Brassicaceae*): evidence from nrDNA sequence data. *Annals of Botany* **106**: 751-767.
- Cecchi, L., Battarini, I., Colzi, I., Coppi, A., Echevarria, G., Pazzagli, L. et al. (2018) The genus *Odontarrhena* (*Brassicaceae*) in Albania: Taxonomy and nickel accumulation in a critical group of metallophytes from a major serpentine hot-spot. *Phytotaxa* **351**: 1-28.
- Chanal, A., Chapon, V., Benzerara, K., Barakat, M., Christen, R., Achouak, W. et al. (2006) The desert of Tataouine: an extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria. *Environmental Microbiology* **8**: 514-525.
- Chaney, R. (1983) Plant uptake of inorganic waste constituents. *Land Treatment of Hazardous Wastes* 50-76.
- Chaney, R.L., Li, Y.-M., Brown, S.L., Homer, F., Malik, M., Angle, J.S. et al. (1999) Hyperaccumulator wild plants to develop commercial phytoextraction systems: Approaches and progress. *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water* 129-158.
- Chaney, R.L., Angle, J.S., Broadhurst, C.L., Peters, C.A., Tappero, R.V. et Sparks, D.L. (2007) Improved understanding of hyperaccumulation yields commercial phytoextraction and phytomining technologies. *Journal of Environmental Quality* **36**: 1429-1443.
- Chao, A. (1984) Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics* **11**: 265-270.
- Chardot, V., Massoura, S.T., Echevarria, G., Reeves, R.D. et Morel, J. L. (2005) Phytoextraction potential of the nickel hyperaccumulators *Leptoplax emarginata* and *Bornmuellera tymphaea*. *International Journal of Phytoremediation* **7**: 323-335.
- Chardot, V., Echevarria, G., Gury, M., Massoura, S. et Morel, J.L. (2007) Nickel bioavailability in an ultramafic toposequence in the Vosges Mountains (France). *Plant and Soil* **293**: 7-21.
- Chodak, M., Gołębiewski, M., Morawska-Płoskonka, J., Kuduk, K. et Niklińska, M. (2013) Diversity of microorganisms from forest soils differently polluted with heavy metals. *Applied Soil Ecology* **64**: 7-14.

- Costello, E.K., Halloy, S.R.P., Reed, S.C., Sowell, P. et Schmidt, S.K. (2009) Fumarole-supported islands of biodiversity within a hyperarid, high-elevation landscape on Socompa Volcano, Puna de Atacama, Andes. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 735-747.
- Cunningham, S.D. et Ow, D.W. (1996) Promises and prospects of phytoremediation. *Plant physiology* **110**: 715-719.
- Daghino, S., Murat, C., Sizzano, E., Girlanda, M. et Perotto, S. (2012) Fungal diversity is not determined by mineral and chemical differences in serpentine substrates. *PLoS ONE* **7**: e44233.
- Dalir, N. et Khoshgoftarmansh, A.H. (2014) Symplastic and apoplastic uptake and root to shoot translocation of nickel in wheat as affected by exogenous amino acids. *Journal of Plant Physiology* **171**: 531-536.
- DeBruyn, J.M., Nixon, L.T., Fawaz, M.N., Johnson, A.M. et Radosevich, M. (2011) Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of *Gemmatimonadetes* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 6295-6300.
- Dechamps, C., Noret, N., Mozek, R., Escarré, J., Lefèbvre, C., Gruber, W. et Meerts, P. (2008) Cost of adaptation to a metalliferous environment for *Thlaspi caerulescens*: a field reciprocal transplantation approach. *New Phytologist* **177**: 167-177.
- Degen, O., Kobayashi, M., Shimizu, S. et Eitinger, T. (1999) Selective transport of divalent cations by transition metal permeases: the *Alcaligenes eutrophus* HoxN and the *Rhodococcus rhodochrous* NhlF. *Archives of Microbiology* **171**: 139-145.
- DeGroot, S.H., Claassen, V.P. et Scow, K.M. (2005) Microbial community composition on native and drastically disturbed serpentine soils. *Soil Biology and Biochemistry* **37**: 1427-1435.
- Delmont, T.O., Simonet, P. et Vogel, T.M. (2012) Describing microbial communities and performing global comparisons in the 'omic era. *ISME J* **6**: 1625-1628.
- Deng, S., Popova, I.E., Dick, L. et Dick, R. (2013) Bench scale and microplate format assay of soil enzyme activities using spectroscopic and fluorometric approaches. *Applied Soil Ecology* **64**: 84-90.
- Dennis, P.G., Miller, A.J. et Hirsch, P.R. (2010) Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiology Ecology* **72**: 313-327.
- Dönmez, G. et Aksu, Z. (2001) Bioaccumulation of copper(ii) and nickel(ii) by the non-adapted and adapted growing *Candida sp.* *Water Research* **35**: 1425-1434.
- Duan, J. (2007) 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase genes in *Rhizobia*: Isolation and characterization. Waterloo.
- Durand, A., Piutti, S., Rue, M., Morel, J.L., Echevarria, G. et Benizri, E. (2015) Improving nickel phytoextraction by co-cropping hyperaccumulator plants inoculated by plant growth promoting rhizobacteria. *Plant and Soil* **2**: 179-192
- Duvigneaud, P. (1966) Note sur la biogéochimie des serpentines du Sud-Ouest de la France. *Bulletin de la Société Royale de Botanique de Belgique / Bulletin van de Koninklijke Belgische Botanische Vereniging* **99**: 271-329.
- Eapen, S. et D'Souza, S.F. (2005) Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotechnology Advances* **23**: 97-114.
- Echevarria, G. (2018) Genesis and behaviour of ultramafic soils and consequences for nickel biogeochemistry. Dans : *Agromining: Farming for Metals: Extracting Unconventional Resources Using Plants, Mineral Resource Reviews*, Van der Ent, A., Echevarria, G., Baker, A.J.M. et Morel, J.L. (éds), Springer International Publishing, Cham, p. 135-156.
- Epelde, L., Martín-Sánchez, I., González-Oreja, J.A., Anza, M., Gómez-Sagasti, M.T. et Garbisu, C. (2012) Impact of sources of environmental degradation on microbial community dynamics in non-polluted and metal-polluted soils. *Science of The Total Environment* **433**: 264-272.
- Erskine, P.D., Lee, G., Fogliani, B., L'Huillier, L. et McCoy, S. (2018) Incorporating hyperaccumulator plants into mine rehabilitation in the Asia-Pacific region. Dans : *Agromining: Farming for Metals:*

- Extracting Unconventional Resources Using Plants, Mineral Resource Reviews, Van der Ent, A., Echevarria, G., Baker, A.J.M. et Morel, J.L. (éds), Springer International Publishing, Cham, p. 189-204.*
- Everhart, J.L., McNear, D., Peltier, E., van der Lelie, D., Chaney, R.L. et Sparks, D.L. (2006) Assessing nickel bioavailability in smelter-contaminated soils. *Science of The Total Environment* **367**: 732-744.
- Farag, I.F., Youssef, N.H. et Elshahed, M.S. (2017) Global distribution patterns and pangenomic diversity of the candidate phylum “*Latescibacteria*” (WS3). *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.00521-17.
- Fein, J.B., Martin, A.M. et Wightman, P.G. (2001) Metal adsorption onto bacterial surfaces: development of a predictive approach. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **65**: 4267-4273.
- Fierer, N., Bradford, M.A. et Jackson, R.B. (2007) Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* **88**: 1354-1364.
- Fierer, N. et Jackson, R.B. (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *PNAS* **103**: 626-631.
- Fierer, N., Lauber, C.L., Ramirez, K.S., Zaneveld, J., Bradford, M.A. et Knight, R. (2012) Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *The ISME journal* **6**: 1007-1017.
- Fierer, N. et Lennon, J.T. (2011) The generation and maintenance of diversity in microbial communities. *Am. J. Bot.* **98**: 439-448.
- Figuerola, E.L.M., Guerrero, L.D., Türkowsky, D., Wall, L.G. et Erijman, L. (2015) Crop monoculture rather than agriculture reduces the spatial turnover of soil bacterial communities at a regional scale: Reduced turnover of soil bacterial communities. *Environmental Microbiology* **17**: 678-688.
- Finlay, B.J., Maberly, S.C. et Cooper, J.I. (1997) Microbial diversity and ecosystem function. *Oikos* **80**: 209-213.
- Fitzsimons, M.S. et Miller, R.M. (2010) Serpentine soil has little influence on the root-associated microbial community composition of the serpentine tolerant grass species *Avenula sulcata*. *Plant Soil* **330**: 393-405.
- Freitas, H., Prasad, M.N.V. et Pratas, J. (2004) Analysis of serpentinophytes from north-east of Portugal for trace metal accumulation – relevance to the management of mine environment. *Chemosphere* **54**: 1625-1642.
- Gadd, G.M. (1988) Accumulation of metals by microorganisms and algae. *Biotechnology. Vol. 6b, Special Microbial Processes* 401-433.
- Galey, M.L., van der Ent, A., Iqbal, M.C.M. et Rajakaruna, N. (2017) Ultramafic geocology of South and Southeast Asia. *Botanical Studies* **58**: 1-18.
- Garbaye, J. (2013) La symbiose mycorhizienne: une association entre les plantes et les champignons *Quae*. Versailles.
- Garbisu, C. et Alkorta, I. (2001) Phytoextraction: A cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology* **77**: 229-236.
- Gei, V., Erskine, P.D., Harris, H.H., Echevarria, G., Mesjasz-Przybyłowicz, J., Barnabas, A.D. et al. (2018) Tools for the discovery of hyperaccumulator plant species and understanding their ecophysiology. Dans : *Agromining: Farming for Metals: Extracting Unconventional Resources Using Plants, Mineral Resource Reviews, Van der Ent, A., Echevarria, G., Baker, A.J.M. et Morel, J.L. (éds), Springer International Publishing, Cham, p. 117-133.*
- Gendre, D., Czernic, P., Conéjéro, G., Pianelli, K., Briat, J.-F., Lebrun, M. et Mari, S. (2007) TcYSL3, a member of the YSL gene family from the hyper-accumulator *Thlaspi caerulescens*, encodes a nicotianamine-Ni/Fe transporter. *The Plant Journal* **49**: 1-15.
- Gentry, A.H. (1988) Changes in plant community diversity and floristic composition on environmental and geographical gradients. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **75**: 1-34.
- Ghaderian, S.M., Mohtadi, A., Rahiminejad, M.R. et Baker, A.J.M. (2007) Nickel and other metal uptake and accumulation by species of *Alyssum* (*Brassicaceae*) from the ultramafics of Iran. *Environmental Pollution* **145**: 293-298.

- Ghosh, M. et Singh, S. (2005) A comparative study of cadmium phytoextraction by accumulator and weed species. *Environmental Pollution* **133**: 365-371.
- Glick, B.R. (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **41**: 109-117.
- Glick, B.R. (2010) Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology advances* **28**: 367-374.
- Glick, B.R. (2014) Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research* **169**: 30-39.
- Glick, B.R., Penrose, D.M. et Li, J. (1998) A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology* **190**: 63-68.
- Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J. et Duan, J. (2007) Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur J Plant Pathol* **119**: 329-339.
- Glick, B.R. et Bashan, Y. (1997) Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnology Advances* **15**: 353-378.
- Glick, B.R. et Stearns, J.C. (2011) Making phytoremediation work better: Maximizing a plant's growth potential in the midst of adversity. *International Journal of Phytoremediation* **13**: 4-16.
- Gołębiewski, M., Deja-Sikora, E., Cichosz, M., Tretyn, A. et Wróbel, B. (2014) 16S rDNA pyrosequencing analysis of bacterial community in heavy metals polluted soils. *Microbial Ecology* **67**: 635-647.
- Gonçalves, S.C., Portugal, A., Gonçalves, M.T., Vieira, R., Martins-Loução, M.A. et Freitas, H. (2007) Genetic diversity and differential in vitro responses to Ni in *Cenococcum geophilum* isolates from serpentine soils in Portugal. *Mycorrhiza* **17**: 677-686.
- Goux, X., Calusinska, M., Fossépré, M., Benizri, E. et Delfosse, P. (2016) Start-up phase of an anaerobic full-scale farm reactor – Appearance of mesophilic anaerobic conditions and establishment of the methanogenic microbial community. *Bioresource Technology* **212**: 217-226.
- Gove, B., Hutchinson, J.J., Young, S.D., Craigon, J. et McGrath, S.P. (2002) Uptake of metals by plants sharing a rhizosphere with the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *International Journal of Phytoremediation* **4**: 267-281.
- Grayston, S.J. et Campbell, C.D. (1996) Functional biodiversity of microbial communities in the rhizospheres of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *Tree Physiol* **16**: 1031-1038.
- Grayston, S.J., Wang, S., Campbell, C.D. et Edwards, A.C. (1998) Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* **30**: 369-378.
- Grichko, V.P. et Glick, B.R. (2001) Ethylene and flooding stress in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **39**: 1-9.
- Guillot, S. et Hattori, K. (2013) Serpentinites: Essential roles in geodynamics, arc volcanism, sustainable development, and the origin of life. *Elements* **9**: 95-98.
- Guo, H., Nasir, M., Lv, J., Dai, Y. et Gao, J. (2017) Understanding the variation of microbial community in heavy metals contaminated soil using high throughput sequencing. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **144**: 300-306.
- Gurtler, V. et Stanisich, V.A. (1996) New approaches to typing and identification of bacteria using the 16s-23s rDNA spacer region. *Microbiology* **142**: 3-16.
- Hamer, D.H. (1986) Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.* **55**: 913-951.
- Han, Y., Wang, R., Yang, Z., Zhan, Y., Ma, Y., Ping, S. et al. (2015) 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas stutzeri* A1501 facilitates the growth of rice in the presence of salt or heavy metals. *J. Microbiol. Biotechnol.* **25**(7): 1119-1128.
- Harrison, S. et Rajakaruna, N. (2011) Serpentine: The evolution and ecology of a model system. *University of California Press*.
- Hartmann, A., Rothballer, M. et Schmid, M. (2008) Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil* **312**: 7-14.

- He, H., Veneklaas, E.J., Kuo, J. et Lambers, H. (2014) Physiological and ecological significance of biomineralization in plants. *Trends in Plant Science* **19**: 166-174.
- Herrera, A., Héry, M., Stach, J.E.M., Jaffré, T., Normand, P. et Navarro, E. (2007) Species richness and phylogenetic diversity comparisons of soil microbial communities affected by nickel-mining and revegetation efforts in New Caledonia. *European Journal of Soil Biology* **43**: 130-139.
- Hiltner, L. (1904) Über neuer Erfahrungen und probleme auf dem gebiet der bodenbakteriologie unter besonderer nerücksichtigung der gründung und brache. *Arbeiten aus dem Deutschen Landwirtschafts Geselschaft* **98**: 59-78.
- Hoffmann, P., Baker, A.J.M., Madulid, D.A. et Proctor, J. (2003) *Phyllanthus Balgooyi* (euphorbiaceae s.l.), a new nickel-hyperaccumulating species from Palawan and Sabah. *Blumea - Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants* **48**: 193-199.
- Honma, M. et Shimomura, T. (1978) Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agric. Biol. Chem.* **42**: 1825-1831.
- Hrynkiewicz, K., Złoch, M., Kowalkowski, T., Baum, C., Niedojadło, K. et Buszewski, B. (2015) Strain-specific bioaccumulation and intracellular distribution of Cd²⁺ in bacteria isolated from the rhizosphere, ectomycorrhizae, and fruitbodies of ectomycorrhizal fungi. *Environ Sci Pollut Res Int* **22**: 3055-3067.
- Hutchinson, G.E. (1943) The biogeochemistry of aluminum and of certain related elements. *The Quarterly Review of Biology* **18**: 1-29.
- Idris, R., Trifonova, R., Puschenreiter, M., Wenzel, W.W. et Sessitsch, A. (2004) Bacterial communities associated with flowering plants of the ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 2667-2677.
- Jacobson, C.B., Pasternak, J.J. et Glick, B.R. (1994) Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Canadian Journal of Microbiology* **40**: 1019-1025.
- Jaffré, T., Brooks, R.R., Lee, J. et Reeves, R.D. (1976) *Sebertia acuminata*: A hyperaccumulator of nickel from New Caledonia. *Science* **193**: 579-580.
- Jaffré, T., Pillon, Y., Thomine, S. et Merlot, S. (2013) The metal hyperaccumulators from New Caledonia can broaden our understanding of nickel accumulation in plants. *Front. Plant Sci.* **4**: 279.
- Jansen, S., Broadley, M.R., Robbrecht, E. et Smets, E. (2002) Aluminum hyperaccumulation in Angiosperms: A review of its phylogenetic significance. *The Botanical Review* **68**: 235-269.
- Janssen, P.H. (2006) Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 1719-1728.
- Janssen, P.H., Yates, P.S., Grinton, B.E., Taylor, P.M. et Sait, M. (2002) Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2391-2396.
- Jha, C.K. et Saraf, M. (2015) Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): a review. *Journal of Agricultural Research and Development* **5**: 108-119.
- Jhee, E.M., Boyd, R.S. et Eubanks, M.D. (2006) Effectiveness of metal-metal and metal-organic compound combinations against *Plutella xylostella*: Implications for plant elemental defense. *Journal of Chemical Ecology* **32**: 239-259.
- Jiang, C., Wu, Q.T., Sterckeman, T., Schwartz, C., Sirguey, C., Ouvrard, S. et al. (2010) Co-planting can phytoextract similar amounts of cadmium and zinc to mono-cropping from contaminated soils. *Ecological Engineering* **36**: 391-395.
- Jiang, C.A., Wu, Q. T., Goudon, R., Echevarria, G. et Morel, J.-L. (2015) Biomass and metal yield of co-cropped *Alyssum murale* and *Lupinus albus*. *Australian Journal of Botany*.
- Jiang, L., Song, M., Yang, L., Zhang, D., Sun, Y., Shen, Z. et al. (2016) Exploring the Influence of Environmental Factors on Bacterial Communities within the Rhizosphere of the Cu-tolerant plant, *Elsholtzia splendens*. *Scientific Reports* **6**: 36302.

- Kamnev, A.A., Tugarova, A.V., Antonyuk, L.P., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G. et Gardiner, P.H.E. (2005) Effects of heavy metals on plant-associated rhizobacteria: Comparison of endophytic and non-endophytic strains of *Azospirillum brasilense*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **19**: 91-95.
- Kamran, M.A., Eqani, S.A.M.A.S., Bibi, S., Xu, R., Amna, Monis, M.F.H. *et al.* (2016) Bioaccumulation of nickel by *E. sativa* and role of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) under nickel stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **126**: 256-263.
- Kandeler, E., Tscherko, D., Bruce, K.D., Stemmer, M., Hobbs, P.J., Bardgett, R.D. et Amelung, W. (2000) Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil. *Biol Fertil Soils* **32**: 390-400.
- Kandeler, F., Kampichler, C. et Horak, O. (1996) Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biol Fertil Soils* **23**: 299-306.
- Kay, K.M., Ward, K.L., Watt, L.R. et Schemske, D.W. (2011) Plant speciation. *Serpentine: the evolution and ecology of a model system* 71-96.
- Kazakou, E., Dimitrakopoulos, P.G., Baker, A.J.M., Reeves, R.D. et Troumbis, A.Y. (2008) Hypotheses, mechanisms and trade-offs of tolerance and adaptation to serpentine soils: from species to ecosystem level. *Biological Reviews*.
- Kazakou, E., Adamidis, G.C., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Godino, M. et Dimitrakopoulos, P.G. (2010) Species adaptation in serpentine soils in Lesbos Island (Greece): metal hyperaccumulation and tolerance. *Plant and Soil* **332**: 369-385.
- Khan, A.G. (2005) Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **18**: 355-364.
- Kidd, P., Barceló, J., Bernal, M.P., Navari-Izzo, F., Poschenrieder, C., Shilev, S. *et al.* (2009) Trace element behaviour at the root-soil interface: implications in phytoremediation. *Environmental and Experimental Botany* **67**: 243-259.
- Kidd, P.S., Bani, A., Benizri, E., Gonnelli, C., Hazotte, C., Kissler, J. *et al.* (2018) Developing sustainable agromining systems in agricultural ultramafic soils for nickel recovery. *Frontiers in Environmental Science*.
- Kidd, P.S. et Monterroso, C. (2005) Metal extraction by *Alyssum serpyllifolium* ssp. *lusitanicum* on mine-spoil soils from Spain. *Science of The Total Environment* **336**: 1-11.
- Kim, I.S., Kang, K.H., Johnson-Green, P. et Lee, E.J. (2003) Investigation of heavy metal accumulation in *Polygonum thunbergii* for phytoextraction. *Environmental Pollution* **126**: 235-243.
- Kloepper, J.W., Lifshitz, R. et Zablotowicz, R.M. (1989) Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 39-43.
- Kopecky, J., Kyselkova, M., Omelka, M., Cermak, L., Novotna, J., Grundmann, G.L. *et al.* (2011) Actinobacterial community dominated by a distinct clade in acidic soil of a waterlogged deciduous forest. *FEMS Microbiology Ecology* **78**: 386-394.
- Kuperman, R.G. et Carreiro, M.M. (1997) Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry* **29**: 179-190.
- Kuske, C.R., Ticknor, L.O., Miller, M.E., Dunbar, J.M., Davis, J.A., Barns, S.M. et Belnap, J. (2002) Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and the interspaces in an arid grassland. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1854-1863.
- Latour, X., Corberand, T., Laguerre, G., Allard, F. et Lemanceau, P. (1996) The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2449-2456.
- Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R. et Fierer, N. (2009) Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 5111-5120.

- Lebeau, T., Braud, A. et Jézéquel, K. (2008) Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: A review. *Environmental Pollution* **153**: 497-522.
- Lefèvre, F., Fady, B., Jean, F., Davi, H., Pichot, C. et Oddou-Muratorio, S. (2015) Les processus biologiques de réponse des arbres et forêts au changement climatique: adaptation et plasticité phénotypique. *Innovations Agronomiques* **47**: 63-79.
- Lenczewski, M., Rigg, L., Enright, N., Jaffre, T. et Kelly, H. (2009) Microbial communities of ultramafic soils in maquis and rainforest at Mont Do, New Caledonia. *Austral Ecology* **34**: 567-576.
- Lerner, A., Herschkovitz, Y., Baudoin, E., Nazaret, S., Moenne-Loccoz, Y., Okon, Y. et Jurkevitch, E. (2006) Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on rhizobacterial communities analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis and automated ribosomal intergenic spacer analysis. *Soil Biology and Biochemistry* **38**: 1212-1218.
- Leyval, C., Turnau, K. et Haselwandter, K. (1997) Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* **7**: 139-153.
- Li, Y., Feng, Y., Lv, G., Liu, B. et Qi, A. (2015) The phylogeny of *Alyssum* (*Brassicaceae*) inferred from molecular data. *Nordic Journal of Botany* **33**: 715-721.
- Li, Y.M., Chaney, R., Brewer, E., Roseberg, R., Angle, J.S., Baker, A. *et al.* (2003) Development of a technology for commercial phytoextraction of nickel: economic and technical considerations. *Plant and Soil* **249**: 107-115.
- Lienhard, P., Terrat, S., Prévost-Bouré, N.C., Nowak, V., Régnier, T., Sayphoummie, S. *et al.* (2014) Pyrosequencing evidences the impact of cropping on soil bacterial and fungal diversity in Laos tropical grassland. *Agron. Sustain. Dev.* **34**: 525-533.
- Likar, M. et Regvar, M. (2009) Application of temporal temperature gradient gel electrophoresis for characterisation of fungal endophyte communities of *Salix caprea* L. in a heavy metal polluted soil. *Science of The Total Environment* **407**: 6179-6187.
- Lipman, C.B. (1926) The bacterial flora of serpentine soils. *J Bacteriol* **12**: 315-318.
- Lipton, D.S., Blanchar, R.W. et Blevins, D.G. (1987) Citrate, Malate, and Succinate concentration in exudates from P-sufficient and P-stressed *Medicago sativa* L. seedlings. *Plant Physiology* **85**: 315-317.
- Liu, W., Wang, Q., Wang, B., Hou, J., Luo, Y., Tang, C. et Franks, A.E. (2015) Plant growth-promoting rhizobacteria enhance the growth and Cd uptake of *Sedum plumbizincicola* in a Cd-contaminated soil. *Journal of Soils and Sediments* **15**: 1191-1199.
- Liu, Z., Fu, B., Zheng, X. et Liu, G. (2010) Plant biomass, soil water content and soil N:P ratio regulating soil microbial functional diversity in a temperate steppe: A regional scale study. *Soil Biology and Biochemistry* **42**: 445-450.
- Liu, Z., Ge, H., Li, C., Zhao, Z., Song, F. et Hu, S. (2015) Enhanced phytoextraction of heavy metals from contaminated soil by plant co-cropping associated with PGPR. *Water, Air, & Soil Pollution* **226**: 29.
- Lombini, A., Dinelli, E., Ferrari, C. et Simoni, A. (1998) Plant-soil relationships in the serpentinite screes of Mt. Prinzera (Northern Apennines, Italy). *Journal of Geochemical Exploration* **64**: 19-33.
- Lopes, L.D., Pereira e Silva, M. de C. et Andreote, F.D. (2016) Bacterial abilities and adaptation toward the rhizosphere colonization. *Frontiers in Microbiology* **7**: 1341.
- Lopez, S., Piutti, S., Vallance, J., Morel, J.-L., Echevarria, G. et Benizri, E. (2017) Nickel drives bacterial community diversity in the rhizosphere of the hyperaccumulator *Alyssum murale*. *Soil Biology and Biochemistry* **114**: 121-130.
- Lopez, S., Benizri, E., Erskine, P.D., Morel, J.L., Lee, G., Permana, E., Echevarria, G., van der Ent, A. (2018) Biogeochemistry of the flora of Weda Bay, Halmahera Island (Indonesia) focusing on metal hyperaccumulation. *J Geochem. Explor.* En révision.
- Lorenz, N., Hintemann, T., Kramarewa, T., Katayama, A., Yasuta, T., Marschner, P. et Kandeler, E. (2006) Response of microbial activity and microbial community composition in soils to long-term arsenic and cadmium exposure. *Soil Biology and Biochemistry* **38**: 1430-1437.

- Lozupone, C., Lladser, M.E., Knights, D., Stombaugh, J. et Knight, R. (2011) UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *ISME J* **5**: 169-172.
- Lucisine, P., Echevarria, G., Sterckeman, T., Vallance, J., Rey, P. et Benizri, E. (2014) Effect of hyperaccumulating plant cover composition and rhizosphere-associated bacteria on the efficiency of nickel extraction from soil. *Applied Soil Ecology* **81**: 30-36.
- Lugtenberg, B.J.J. et Dekkers, L.C. (1999) What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environmental Microbiology* **1**: 9-13.
- Lundberg, D.S., Lebeis, S.L., Paredes, S.H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S. *et al.* (2012) Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* **488**: 86-90.
- Ma, Y., Rajkumar, M. et Freitas, H. (2009) Improvement of plant growth and nickel uptake by nickel resistant-plant-growth promoting bacteria. *Journal of hazardous materials* **166**: 1154-1161.
- Madhaiyan, M., Suresh Reddy, B.V., Anandham, R., Senthilkumar, M., Poonguzhali, S., Sundaram, S.P. et Sa, T. (2006) Plant growth-promoting *Methylobacterium* induces defense responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared with rot pathogens. *Current Microbiology* **53**: 270-276.
- Maestri, E., Marmiroli, M., Visioli, G. et Marmiroli, N. (2010) Metal tolerance and hyperaccumulation: Costs and trade-offs between traits and environment. *Environmental and Experimental Botany* **68**: 1-13.
- Mandimba, G., HeulDans : T., Bally, R., Guckert, A. et Balandreau, J. (1986) Chemotaxis of free-living nitrogen-fixing bacteria towards maize mucilage. *Plant Soil* **90**: 129-139.
- Marschner, H. (1991) Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. *Plant Soil* **134**: 1-20.
- Marschner, P., Crowley, D. et Yang, C.H. (2004) Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil* **261**: 199-208.
- Marschner, P., Crowley, D. et Rengel, Z. (2011) Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis – model and research methods. *Soil Biology and Biochemistry* **43**: 883-894.
- Martens, S.N. et Boyd, R.S. (1994) The ecological significance of nickel hyperaccumulation: a plant chemical defense. *Oecologia* **98**: 379-384.
- Martiny, J.B.H., Bohannan, B.J.M., Brown, J.H., Colwell, R.K., Fuhrman, J.A., Green, J.L. *et al.* (2006) Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology* **4**: 102-112.
- McGrath, S.P. et Zhao, F.-J. (2003) Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology* **14**: 277-282.
- McNear, D.H., Peltier, E., Everhart, J., Chaney, R.L., Sutton, S., Newville, M. *et al.* (2005) Application of quantitative fluorescence and absorption-edge computed microtomography to image metal compartmentalization in *Alyssum murale*. *Environmental Science & Technology* **39**: 2210-2218.
- Mejárez, M. et Bülow, L. (2001) Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends in Biotechnology* **19**: 67-73.
- Mellis, E.V., Cruz, M.C.P. da et Casagrande, J.C. (2004) Nickel adsorption by soils in relation to pH, organic matter, and iron oxides. *Scientia Agricola* **61**: 190-195.
- Mengoni, A., Barzanti, R., Gonnelli, C., Gabbrielli, R. et Bazzicalupo, M. (2001) Characterization of nickel-resistant bacteria isolated from serpentine soil. *Environmental Microbiology* **3**: 691-698.
- Mengoni, A., Grassi, E., Barzanti, R., Biondi, E.G., Gonnelli, C., Kim, C.K. et Bazzicalupo, M. (2004) Genetic diversity of bacterial communities of serpentine soil and of rhizosphere of the nickel-hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. *Microbial Ecology* **48**: 209-217.
- Mengoni, A., Schat, H. et Vangronsveld, J. (2010) Plants as extreme environments? Ni-resistant bacteria and Ni-hyperaccumulators of serpentine flora. *Plant and Soil* **331**: 5-16.
- Metzker, M.L. (2010) Sequencing technologies – the next generation. *Nature Reviews Genetics* **11**: 31-46.
- Meyer, O. (1994) Functional groups of microorganisms. *Dans : Biodiversity and Ecosystem Function, Praktische Zahnmedizin Odonto-Stomatologie Pratique Practical Dental Medicine, Schulze, E.-D. et Mooney, H.A. (éds), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, p. 67-96.*

- Mishra, D. et Kar, M. (1974) Nickel in plant : growth and metabolism. *The botanical review* **40**: 395-452.
- Moëgne-Loccoz, Y. et Défago, G. (2004) Life as a biocontrol pseudomonad. *Dans : Pseudomonas: Volume 1 Genomics, Life Style and Molecular Architecture, Ramos, J.-L. (éd), Springer US, Boston, MA*, p. 457-476.
- Morel, J.L. (2013) Using plants to “micro-mine” metals.
- Morel, J.L., Guckert, A., Nicolardot, B., Benistant, D., Catroux, G. et Germon, J.-C. (1986) Etude de l'évolution des caractéristiques physico-chimiques et de la stabilité biologique des ordures ménagères au cours du compostage. *Agronomie* **6**: 693-701.
- Morel, J.L., Chenu, C. et Lorenz, K. (2014) Ecosystem services provided by soils of urban, industrial, traffic, mining, and military areas (SUITMAs). *Journal of Soils and Sediments*.
- Morgan, J.A.W., Bending, G.D. et White, P.J. (2005) Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *J Exp Bot* **56**: 1729-1739.
- Mudd, G.M. (2009) Nickel sulfide versus laterite : The hard sustainability challenge remains. *Canadian Metallurgical Society, Sudbury, Ontario, Canada*.
- Naether, A., Foessel, B.U., Naegele, V., Wüst, P.K., Weinert, J., Bonkowski, M. *et al.* (2012) Environmental factors affect acidobacterial communities below the subgroup level in grassland and forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.01325-12.
- Nahon, D. (2003) Altérations dans la zone tropicale. Signification à travers les mécanismes anciens et/ou encore actuels. *Comptes Rendus Geoscience* **335**: 1109-1119.
- Nannipieri, P., Giagnoni, L., Renella, G., Puglisi, E., Ceccanti, B., Masciandaro, G. *et al.* (2012) Soil enzymology: classical and molecular approaches. *Biol Fertil Soils* **48**: 743-762.
- Nascimento, F.X., Rossi, M.J., Soares, C.R.F.S., McConkey, B.J. et Glick, B.R. (2014) New insights into 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase phylogeny, evolution and ecological significance. *PLoS ONE* **9**: e99168.
- Nemergut, D.R., Cleveland, C.C., Wieder, W.R., Washenberger, C.L. et Townsend, A.R. (2010) Plot-scale manipulations of organic matter inputs to soils correlate with shifts in microbial community composition in a lowland tropical rain forest. *Soil Biology and Biochemistry* **42**: 2153-2160.
- Nguyen, C. (2003) Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie* **23**: 375-396.
- Nkrumah, P.N., Baker, A.J.M., Chaney, R.L., Erskine, P.D., Echevarria, G., Morel, J.L. et van der Ent, A. (2016) Current status and challenges in developing nickel phytomining: an agronomic perspective. *Plant and Soil* **2**: 55-69.
- Nkrumah, P.N., Chaney, R.L. et Morel, J.L. (2018a) Agronomy of ‘metal crops’ used in agromining. *Dans : Agromining: Farming for Metals, Van der Ent, A., Echevarria, G., Baker, A.J.M. et Morel, J.L. (éds), Springer International Publishing, Cham*, p. 19-38.
- Nkrumah, P.N., Echevarria, G., Erskine, P.D. et van der Ent, A. (2018b) Nickel hyperaccumulation in *Antidesma montis-silam*: from herbarium discovery to collection in the native habitat. *Ecological Research* **33**: 675-685.
- Nübel, U., Bateson, M.M., Vandieken, V., Wieland, A., Kühl, M. et Ward, D.M. (2002) Microscopic examination of distribution and phenotypic properties of phylogenetically diverse *Chloroflexaceae*-related bacteria in hot spring microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4593-4603.
- Nultsch, W. (1998) Botanique générale De Boeck Université Thieme Verlag. Bruxelles.
- Nwuche, C.O. et Ugoji, E.O. (2010) Effect of co-existing plant specie on soil microbial activity under heavy metal stress. *International Journal of Environmental Science and Technology* **7**: 697-704.
- Oline, D.K. (2006) Phylogenetic comparisons of bacterial communities from serpentine and nonserpentine soils. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 6965-6971.
- Ozawa, T., Imai, Y., Sukiman, H.I., Karsono, H., Ariani, D. et Saono, S. (1999) Low pH and aluminum tolerance of *Bradyrhizobium* strains isolated from acid soils in Indonesia. *Soil Science and Plant Nutrition* **45**: 987-992.

- Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G.A., Piotrowska-Seget, Z. et Cameotra, S.S. (2011) Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. *International Journal of Molecular Sciences* **12**: 633-654.
- Pal, A., Dutta, S., Mukherjee, P.K. et Paul, A.K. (2005) Occurrence of heavy metal-resistance in microflora from serpentine soil of Andaman. *Journal of Basic Microbiology* **45**: 207-218.
- Pal, A. et Paul, A.K. (2010) Nickel uptake and intracellular localization in *Cupriavidus pauculus* KPS 201, native to ultramafic ecosystem. *Advances in Bioscience and Biotechnology* **01**: 276-280.
- Pal, A., Wauters, G. et Paul, A.K. (2007) Nickel tolerance and accumulation by bacteria from rhizosphere of nickel hyperaccumulators in serpentine soil ecosystem of Andaman, India. *Plant and Soil* **293**: 37-48.
- Penrose, D.M. et Glick, B.R. (2003) Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia plantarum* **118**: 10-15.
- Perron, K., Caille, O., Rossier, C., Delden, C. van, Dumas, J.-L. et Köhler, T. (2004) CzcR-CzcS, a Two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **279**: 8761-8768.
- Pessoa-Filho, M., Barreto, C.C., Junior, F.B. dos R., Fragoso, R.R., Costa, F.S., Mendes, I. de C. et Andrade, L.R.M. de (2015) Microbiological functioning, diversity, and structure of bacterial communities in ultramafic soils from a tropical savanna. *Antonie van Leeuwenhoek* **107**: 935-949.
- Philippot, L., Bru, D., Saby, N., Čuhel, J., Arrouays, D., Šimek, M. et Hallin, S. (2009) Spatial patterns of bacterial taxa in nature reflect ecological traits of deep branches of the 16S rRNA bacterial tree. *Environmental microbiology* **11**: 3096-3104.
- Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P. et van der Putten, W.H. (2013) Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology* **11**: 789-799.
- Pollard, A.J., Powell, K.D., Harper, F.A. et Smith, J.A.C. (2002) The genetic basis of metal hyperaccumulation in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **21**: 539-566.
- Pollard, A.J., Reeves, R.D. et Baker, A.J.M. (2014) Facultative hyperaccumulation of heavy metals and metalloids. *Plant Science* **217-218**: 8-17.
- Proctor, J., Lee, Y.F., Langley, A.M., Munro, W.R.C. et Nelson, T. (1988) Ecological studies on Gunung Silam, a small ultrabasic mountain in Sabah, Malaysia. *I. Environment, Forest Structure and Floristics. Journal of Ecology* **76**: 320-340.
- Proctor, J., Phillipps, C., Duff, G.K., Heaney, A. et Robertson, F.M. (1989) Ecological studies on Gunung Silam, a small ultrabasic mountain in Sabah, Malaysia. *II. Some Forest Processes. Journal of Ecology* **77**: 317-331.
- Proctor, J. et Woodell, S.R.J. (1975) The ecology of serpentine soils. *Dans : Advances in Ecological Research, MacFadyen, A. (éd), Academic Press*, p. 255-366.
- Qaisrani, M.M., Mirza, M.S., Zaheer, A. et Malik, K.A. (2014) Isolation and identification by 16S rRNA sequence analysis of *Achromobacter*, *Azospirillum* and *Rhodococcus* strains from the rhizosphere of maize and screening for the beneficial effect on plant growth. *Pak J Agri Sci* **51**: 91-99.
- Raaijmakers, J.M., Vlami, M. et de Souza, J.T. (2002) Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**: 537-547.
- Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L., Janssen, P.H., Hippe, H. et Stackebrandt, E. (1996) *Clostridium paradoxum* DSM 7308T contains multiple 16S rRNA genes with heterogeneous intervening sequences. *Microbiology (Reading, Engl.)* **142**: 2087-2095.
- Rajkumar, M., Ae, N. et Freitas, H. (2009a) Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. *Chemosphere* **77**: 153-160.
- Rajkumar, M., Vara Prasad, M.N., Freitas, H. et Ae, N. (2009b) Biotechnological applications of serpentine soil bacteria for phytoremediation of trace metals. *Critical Reviews in Biotechnology* **29**: 120-130.
- Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M.N.V. et Freitas, H. (2012) Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances* **30**: 1562-1574.

- Rajkumar, M. et Freitas, H. (2008) Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere* **71**: 834-842.
- Ramette, A. et Tiedje, J.M. (2007) Multiscale responses of microbial life to spatial distance and environmental heterogeneity in a patchy ecosystem. *PNAS* **104**: 2761-2766.
- Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E. et Bouharmont, J. (2007) Biologie végétale *De Boeck, Bruxelles*.
- Reeves, R.D. (1999) Nickel hyperaccumulation in the serpentine flora of Cuba. *Annals of Botany* **83**: 29-38.
- Reeves, R.D. (2003) Tropical hyperaccumulators of metals and their potential for phytoextraction. *Plant and Soil* **249**: 57-65.
- Reeves, R.D. (2006) Hyperaccumulation of trace elements by plants. *Dans : Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils, Morel, J.-L., Echevarria, G. et Goncharova, N. (éds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, p. 25-52.
- Reeves, R.D., Brooks, R.R. et Dudley, T.R. (1983) Uptake of nickel by species of *Alyssum*, *Bornmuellera*, and other genera of old world tribus *alysseae*. *Taxon* **32**: 184-192.
- Reeves, R.D., Baker, A.J.M., Becquer, T., Echevarria, G. et Miranda, Z.J.G. (2007) The flora and biogeochemistry of the ultramafic soils of Goiás state, Brazil. *Plant Soil* **293**: 107-119.
- Reeves, R.D., Adigüzel, N. et Baker, A.J. (2009) Nickel hyperaccumulation in *Bornmuellera kiyakii* Aytaç & Aksoy and associated plants of the *Brassicaceae* from Kızıldağ (Derebucak, Konya-Turkey). *Turkish Journal of Botany* **33**: 33-40.
- Reeves, R.D., Baker, A.J.M., Jaffré, T., Erskine, P.D., Echevarria, G. et van der Ent, A. (2017) A global database for plants that hyperaccumulate metal and metalloïd trace elements. *New Phytologist* **218**: 407-411.
- Reeves, R.D., van der Ent, A. et Baker, A.J.M. (2018) Global distribution and ecology of hyperaccumulator plants. *Dans : Agromining: Farming for Metals, Van der Ent, A., Echevarria, G., Baker, A.J.M. et Morel, J.L. (éds), Springer International Publishing, Cham*, p. 75-92.
- Reeves, R.D. et Adigüzel, N. (2008) The nickel hyperaccumulating plants of the serpentines of Turkey and adjacent areas: a review with new data. *Turkish Journal of Biology* **32**: 143-153.
- Reller, L.B., Weinstein, M.P. et Petti, C.A. (2007) Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clin Infect Dis* **44**: 1108-1114.
- Rešetnik, I., Satovic, Z., Schneeweiss, G.M. et Liber, Z. (2013) Phylogenetic relationships in *Brassicaceae* tribe *Alysseae* inferred from nuclear ribosomal and chloroplast DNA sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* **69**: 772-786.
- Richau, K.H., Kozhevnikova, A.D., Seregin, I.V., Vooijs, R., Koevoets, P.L.M., Smith, J.A.C. et al. (2009) Chelation by histidine inhibits the vacuolar sequestration of nickel in roots of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol.* **183**: 106-116.
- Riesenfeld, C.S., Goodman, R.M. et Handelsman, J. (2004) Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environ. Microbiol.* **6**: 981-989.
- Rivière, J. (1960) Etude de la rhizosphère du blé. *Ann. Agron.* **11**: 397-381.
- Rodionov, D.A., Vitreschak, A.G., Mironov, A.A. et Gelfand, M.S. (2003) Comparative genomics of the vitamin B12 metabolism and regulation in *Prokaryotes*. *J. Biol. Chem.* **278**: 41148-41159.
- Rodríguez, H. et Fraga, R. (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* **17**: 319-339.
- Roesch, L.F., Fulthorpe, R.R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A.K., Kent, A.D. et al. (2007) Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME journal* **1**: 283-290.
- Roesti, D., Gaur, R., Johri, B.N., Imfeld, G., Sharma, S., Kawaljeet, K. et Aragno, M. (2006) Plant growth stage, fertiliser management and bio-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria affect the rhizobacterial community structure in rain-fed wheat fields. *Soil Biology and Biochemistry* **38**: 1111-1120.

- Roti, J.R. (1982) Heat-induced cell death and radiosensitization: molecular mechanisms. *Natl Cancer Inst Monogr* **61**: 3-10.
- Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P.C., Lauber, C.L., Lozupone, C., Caporaso, J.G. *et al.* (2010) Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME journal* **4**: 1340-1351.
- Rue, M., Vallance, J., Echevarria, G., Rey, P. et Benizri, E. (2015) Phytoextraction of nickel and rhizosphere microbial communities under mono- or multispecies hyperaccumulator plant cover in a serpentine soil. *Australian Journal of Botany* **63**: 92-102.
- Saad, R., Kobaissi, A., Robin, C., Echevarria, G. et Benizri, E. (2016) Nitrogen fixation and growth of *Lens culinaris* as affected by nickel availability: A pre-requisite for optimization of agromining. *Environmental and Experimental Botany* **131**: 1-9.
- Saad, R.F., Kobaissi, A., Machinet, G., Villemin, G., Echevarria, G. et Benizri, E. (2017) Crop rotation associating a legume and the nickel hyperaccumulator *Alyssum murale* improves the structure and biofunctioning of an ultramafic soil. *Ecological Research*. **33**: 799-810
- Saad, R.F., Kobaissi, A., Amiaud, B., Ruelle, J. et Benizri, E. (2018) Changes in physicochemical characteristics of a serpentine soil and in root architecture of a hyperaccumulating plant cropped with a legume. *J Soils Sediments* **18**: 1994-2007.
- Sachs, J.L., Kembel, S.W., Lau, A.H. et Simms, E.L. (2009) *In situ* phylogenetic structure and diversity of wild *Bradyrhizobium* communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 4727-4735.
- Sánchez-López, A.S., Thijs, S., Beckers, B., González-Chávez, M.C., Weyens, N., Carrillo-González, R. et Vangronsveld, J. (2018) Community structure and diversity of endophytic bacteria in seeds of three consecutive generations of *Crotalaria pumila* growing on metal mine residues. *Plant and Soil* **422**: 51-66.
- Sandaa, R.-A., Torsvik, V., Enger, Ø., Daae, F.L., Catsberg, T. et Hahn, D. (1999) Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS Microbiology Ecology* **30**: 237-251.
- Sanger, F., Nicklen, S. et Coulson, A.R. (1992) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* **24**: 104-108.
- Schalk, I.J., Hannauer, M. et Braud, A. (2011) New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance: Siderophores and metals other than iron. *Environmental Microbiology* **13**: 2844-2854.
- Schechter, S.P. et Bruns, T.D. (2008) Serpentine and non-serpentine ecotypes of *Collinsia sparsiflora* associate with distinct arbuscular mycorrhizal fungal assemblages. *Mol. Ecol.* **17**: 3198-3210.
- Schipper, L.A. et Lee, W.G. (2004) Microbial biomass, respiration and diversity in ultramafic soils of West Dome, New Zealand. *Plant and Soil* **262**: 151-158.
- Schlegel, H.G., Cosson, J.-P. et Baker, A.J.M. (1991) Nickel-hyperaccumulating Plants Provide a Niche for Nickel-resistant Bacteria. *Botanica Acta* **104**: 18-25.
- Schloss, P.D. (2008) Evaluating different approaches that test whether microbial communities have the same structure. *The ISME Journal* **2**: 265-275.
- Schmidt, A., Haferburg, G., Sineriz, M., Merten, D., Büchel, G. et Kothe, E. (2005) Heavy metal resistance mechanisms in *Actinobacteria* for survival in AMD contaminated soils. *Chemie der Erde - Geochemistry* **65**: 131-144.
- Schmidt, W. (1999) Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. *New Phytologist* **141**: 1-26.
- Schmitt, M., Boras, S., Tjoa, A., Watanabe, T. et Jansen, S. (2016) Aluminium accumulation and intra-tree distribution patterns in three *Arbor aluminosa* (*Symplocos*) species from central Sulawesi. *PLOS ONE* **11**: e0149078.
- Seldin, L., Rosado, A.S., Cruz, D.W. da, Nobrega, A., Elsas, J.D. van et Paiva, E. (1998) Comparison of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from rhizoplane, rhizosphere, and non-root-associated soil from maize planted in two different Brazilian soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3860-3868.

- Semenov, A.M., van Bruggen, A.H.C. et Zelenev, V.V. (1999) Moving waves of bacterial populations and total organic carbon along roots of wheat. *Microb Ecol* **37**: 116-128.
- Sessitsch, A., Kuffner, M., Kidd, P., Vangronsveld, J., Wenzel, W.W., Fallmann, K. et Puschenreiter, M. (2013) The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry* **60**: 182-194.
- Shallari, S., Schwartz, C., Hasko, A. et Morel, J.L. (1998) Heavy metals in soils and plants of serpentine and industrial sites of Albania. *Sci. Total Environ.* **209**: 133-142.
- Siles, J.A., Cajthaml, T., Filipová, A., Minerbi, S. et MargesDans : R. (2017) Altitudinal, seasonal and interannual shifts in microbial communities and chemical composition of soil organic matter in Alpine forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* **112**: 1-13.
- Singer, A.C., Bell, T., Heywood, C.A., Smith, J.A.C. et Thompson, I.P. (2007) Phytoremediation of mixed-contaminated soil using the hyperaccumulator plant *Alyssum lesbiacum*: Evidence of histidine as a measure of phytoextractable nickel. *Environmental Pollution* **147**: 74-82.
- Singh, B.K., Munro, S., Potts, J.M. et Millard, P. (2007) Influence of grass species and soil type on rhizosphere microbial community structure in grassland soils. *Applied Soil Ecology* **36**: 147-155.
- Sinha, R.P. et Häder, D.-P. (2002) UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1**: 225-236.
- Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S. et al. (2001) Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4742-4751.
- So, N.W., Rho, J.Y., Lee, S.Y., Hancock, I.C. et Kim, J.H. (2001) A lead-absorbing protein with superoxide dismutase activity from *Streptomyces subrutilus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **194**: 93-98.
- Somers, E., Vanderleyden, J. et Srinivasan, M. (2004) Rhizosphere bacterial signalling: A love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology* **30**: 205-240.
- Španiel, S., Kempa, M., Salmerón-Sánchez, E., Fuertes-Aguilar, J., Mota, J.F., Al-Shehbaz, I.A. et al. (2015) AlyBase: database of names, chromosome numbers, and ploidy levels of *Alyseae* (*Brassicaceae*), with a new generic concept of the tribe. *Plant Systematics and Evolution* **301**: 2463-2491.
- Staley, J.T. et Konopka, A. (1985) Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**: 321-346.
- Stearns, J.C., Shah, S., Greenberg, B.M., Dixon, D.G. et Glick, B.R. (2005) Tolerance of transgenic canola expressing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase to growth inhibition by nickel. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**: 701-708.
- Stefanowicz, A.M., Niklińska, M. et Laskowski, R. Metals affect soil bacterial and fungal functional diversity differently. *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**: 591-598.
- Steinuer, K., Chatzinotas, A. et Eisenhauer, N. (2016) Root exudate cocktails: the link between plant diversity and soil microorganisms? *Ecology and Evolution* **6**: 7387-7396.
- Stephan, A., Meyer, A.H. et Schmid, B. (2000) Plant diversity affects culturable soil bacteria in experimental grassland communities. *Journal of Ecology* **88**: 988-998.
- Stevenson, B.S., Eichorst, S.A., Wertz, J.T., Schmidt, T.M. et Breznak, J.A. (2004) New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4748-4755.
- Stoltz, E. et Greger, M. (2002) Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb and Zn by four wetland plant species growing on submerged mine tailings. *Environmental and Experimental Botany* **47**: 271-280.
- Sugau, J.B. et van der Ent, A. (2015) *Pittosporum peridoticola* (*Pittosporaceae*), a new ultramafic obligate species restricted to Kinabalu Park (Sabah, Malaysia). *Botanical Studies* **57**: 4.
- Sylvain, I. et McKenna, M.A. (2008) High soil nickel enhances seed weight and seedling growth in *Alyssum murale*, a nickel-hyperaccumulator. Milwaukee, Wisconsin.
- Tabatabai, M.A. et Bremner, J.M. (1972) Assay of urease activity in soils. *Soil Biology and Biochemistry* **4**: 479-487.

- Tang, Y.-T., Deng, T.-H.-B., Wu, Q.-H., Wang, S.-Z., Qiu, R.-L., Wei, Z.-B. *et al.* (2012) Designing cropping systems for metal-contaminated sites: A review. *Pedosphere* **22**: 470-488.
- Tappero, R., Peltier, E., Gräfe, M., Heidel, K., Ginder-Vogel, M., Livi, K.J.T. *et al.* (2007) Hyperaccumulator *Alyssum murale* relies on a different metal storage mechanism for cobalt than for nickel. *New Phytologist* **175**: 641-654.
- Ter Steege, H., Sabatier, D., Castellanos, H., Van Andel, T., Duivenvoorden, J., Adalardo De Oliveira, A. *et al.* (2000) An analysis of the floristic composition and diversity of Amazonian forests including those of the Guiana Shield. *Journal of Tropical Ecology* **16**: 801-828.
- Thomas, F., Hehemann, J.-H., Rebuffet, E., Czejek, M. et Michel, G. (2011) Environmental and gut *Bacteroidetes*: The food connection. *Frontiers in Microbiology* **2**: 93.
- Thorsen, M.K., Brandt, K.K. et Nybroe, O. (2013) Abundance and diversity of culturable *Pseudomonas* constitute sensitive indicators for adverse long-term copper impacts in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **57**: 933-935.
- Tkacz, A., Cheema, J., Chandra, G., Grant, A. et Poole, P.S. (2015) Stability and succession of the rhizosphere microbiota depends upon plant type and soil composition. *The ISME Journal* **9**: 2349-2359.
- Tonin, C., Vandenkoornhuyse, P., Joner, E.J., Straczek, J. et Leyval, C. (2001) Assessment of arbuscular mycorrhizal fungi diversity in the rhizosphere of *Viola calaminaria* and effect of these fungi on heavy metal uptake by clover. *Mycorrhiza* **10**: 161-168.
- Torsvik, V., Daae, F.L., Sandaa, R.-A. et Øvreås, L. (1998) Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology* **64**: 53-62.
- Torsvik, V. et Øvreås, L. (2002) Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* **5**: 240-245.
- Turgay, O.C., Görmez, A. et Bilen, S. (2011) Isolation and characterization of metal resistant-tolerant rhizosphere bacteria from the serpentine soils in Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment* **184**: 515-526.
- Urban, A., Puschenreiter, M., Strauss, J. et Gorfer, M. (2008) Diversity and structure of ectomycorrhizal and co-associated fungal communities in a serpentine soil. *Mycorrhiza* **18**: 339-354.
- Valls, M. et de Lorenzo, V. (2002) Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 327-338.
- van Capelle, C., Schrader, S. et Brunotte, J. (2012) Tillage-induced changes in the functional diversity of soil biota – A review with a focus on German data. *European Journal of Soil Biology* **50**: 165-181.
- van der Ent, A., Baker, A.J.M., van Balgooy, M.M.J. et Tjoa, A. (2013a) Ultramafic nickel laterites in Indonesia (Sulawesi, Halmahera): Mining, nickel hyperaccumulators and opportunities for phytomining. *Journal of Geochemical Exploration* **128**: 72-79.
- van der Ent, A., Mulligan, D. et Erskine, P. (2013b) Discovery of nickel hyperaccumulators from Kinabalu Park, Sabah (Malaysia) for potential utilization in phytomining. *Stuart Winchester, Fernando Valenzuela et David Mulligan, Santiago, Chili*, p. 213-221.
- van der Ent, A. (2015) Heavy Metal Farming. *Australasian Science* 26-27.
- van der Ent, A., van Balgooy, M. et van Welzen, P. (2015a) *Actephila alanbakeri* (Phyllanthaceae): A new nickel hyperaccumulating plant species from localised ultramafic outcrops in Sabah (Malaysia). *Botanical Studies* **57**: 1-8.
- van der Ent, A., Erskine, P. et Sumail, S. (2015b) Ecology of nickel hyperaccumulator plants from ultramafic soils in Sabah (Malaysia). *Chemoecology* **25**: 243-259.
- van der Ent, A. et Mulligan, D. (2015) Multi-element concentrations in plant parts and fluids of Malaysian nickel hyperaccumulator plants and some economic and ecological considerations. *Journal of Chemical Ecology* **41**: 396-408.
- van der Ent, A., Callahan, D.L., Noller, B.N., Mesjasz-Przybylowicz, J., Przybylowicz, W.J., Barnabas, A. et Harris, H.H. (2017) Nickel biopathways in tropical nickel hyperaccumulating trees from Sabah (Malaysia). *Scientific Reports* **7**: 41861.

- van der Ent, A., Mulligan, D.R., in, R. et Erskine, P.D. (2018) Foliar elemental profiles in the ultramafic flora of Kinabalu Park (Sabah, Malaysia). *Ecological Research* **33**: 659-674.
- Verbruggen, E., Röling, W.F.M., Gamper, H.A., Kowalchuk, G.A., Verhoef, H.A. et Heijden, M.G.A. van der (2010) Positive effects of organic farming on below-ground mutualists: large-scale comparison of mycorrhizal fungal communities in agricultural soils. *New Phytologist* **186**: 968-979.
- Verbruggen, N., Hermans, C. et Schat, H. (2009) Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants: Tansley review. *New Phytologist* **181**: 759-776.
- Volesky, B. et Holan, Z.R. (1995) Biosorption of heavy metals. *Biotechnology Progress* **11**: 235-250.
- Walker, C.D., Graham, R.D., Madison, J.T., Cary, E.E. et Welch, R.M. (1985) Effects of Ni deficiency on some nitrogen metabolites in cowpeas (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Plant Physiology* **79**: 474-479.
- Wang, A.S., Angle, J.S., Chaney, R.L., Delorme, T.A. et McIntosh, M. (2006) Changes in soil biological activities under reduced soil pH during *Thlaspi caerulescens* phytoextraction. *Soil Biology and Biochemistry* **38**: 1451-1461.
- Wang, H.B., Wong, M.H., Lan, C.Y., Baker, A.J.M., Qin, Y.R., Shu, W.S. *et al.* (2007) Uptake and accumulation of arsenic by 11 *Pteris* taxa from southern China. *Environmental Pollution* **145**: 225-233.
- Wang, Y., Li, Q., Shi, J., Lin, Q., Chen, X., Wu, W. et Chen, Y. (2008) Assessment of microbial activity and bacterial community composition in the rhizosphere of a copper accumulator and a non-accumulator. *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 1167-1177.
- Ward, N.L., Challacombe, J.F., Janssen, P.H., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Wu, M. *et al.* (2009) Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 2046-2056.
- Warwick, S.I., Sauder, C.A. et Al-Shehbaz, I.A. (2008) Phylogenetic relationships in the tribe *Alysseae* (*Brassicaceae*) based on nuclear ribosomal ITS DNA sequences. *Botany* **86**: 315-336.
- Wei, Z.B., Guo, X.F., Wu, Q.T., Long, X.X. et Penn, C.J. (2011) Phytoextraction of heavy metals from contaminated soil by co-cropping with chelator application and assessment of associated leaching risk. *International Journal of Phytoremediation* **13**: 717-729.
- Welch, R.M. (1981) The biological significance of nickel. *Journal of Plant Nutrition* **3**: 345-356.
- Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., Gardener, B.B.M. et Thomashow, L.S. (2002) Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **40**: 309-348.
- Whipps, J.M. (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* **52**: 487-511.
- Whiting, S.N., De Souza, M.P. et Terry, N. (2001a) Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. *Environmental science & technology* **35**: 3144-3150.
- Whiting, S.N., Leake, J.R., McGrath, S.P. et Baker, A.J.M. (2001b) Hyperaccumulation of Zn by *Thlaspi caerulescens* can ameliorate Zn toxicity in the rhizosphere of cocropped *Thlaspi arvense*. *Environmental Science and Technology* **35**: 3237-3241.
- Whittaker, R.H. (1954) The ecology of serpentine soils. *Ecology* **35**: 258-288.
- Wither, E.D. et Brooks, R.R. (1977) Hyperaccumulation of nickel by some plants of Southeast Asia. *Journal of Geochemical Exploration* **8**: 579-583.
- Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271.
- Woodward, F.I. (1987) Climate and plant distribution. *Cambridge University Press*.
- Woollard, P.M., Mehta, N.A.L., Vamathevan, J.J., Van Horn, S., Bonde, B.K. et Dow, D.J. (2011) The application of next-generation sequencing technologies to drug discovery and development. *Drug Discovery Today* **16**: 512-519.
- Wu, C.H., Wood, T.K., Mulchandani, A. et Chen, W. (2006) Engineering plant-microbe symbiosis for rhizoremediation of heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 1129-1134.
- Wu, Q.T., Hei, L., Wong, J., Schwartz, C. et Morel, J.L. (2007) Co-cropping for phyto-separation of zinc and potassium from sewage sludge. *Chemosphere* **68**: 1954-1960.

- Xhaferri, B., Bani, A., Echevarria, G. et Gjeta, E. (2017) Variation in nickel accumulation in organs of *Alyssum murale* from serpentine site of Albania. *Albanian Journal of Agricultural Sciences* 553-556.
- Xu, Z., Yu, G., Zhang, X., Ge, J., He, N., Wang, Q. et Wang, D. (2015) The variations in soil microbial communities, enzyme activities and their relationships with soil organic matter decomposition along the northern slope of Changbai Mountain. *Applied Soil Ecology* **86**: 19-29.
- Yamada, T. et Sekiguchi, Y. (2009) Cultivation of uncultured *Chloroflexi* subphyla: Significance and ecophysiology of formerly uncultured *Chloroflexi* « *Subphylum I* » with natural and biotechnological relevance. *Microbes and Environments* **24**: 205-216.
- Yang, Q., Tu, S., Wang, G., Liao, X. et Yan, X. (2012) Effectiveness of applying arsenate reducing bacteria to enhance arsenic removal from polluted soils by *Pteris vittata* L. *International Journal of Phytoremediation* **14**: 89-99.
- Yang, X., Feng, Y., He, Z. et Stoffella, P.J. (2005) Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **18**: 339-353.
- Yasir, M., Azhar, E.I., Khan, I., Bibi, F., Baabdullah, R., Al-Zahrani, I.A. et Al-Ghamdi, A.K. (2015) Composition of soil microbiome along elevation gradients in southwestern highlands of Saudi Arabia. *BMC Microbiology* **15**: 1-9.
- Yu, Z., Gunn, L., Wall, P. et Fanning, S. (2017) Antimicrobial resistance and its association with tolerance to heavy metals in agriculture production. *Food Microbiology* **64**: 23-32.
- Zan, N.R., Datta, S.P., Rattan, R.K., Dwivedi, B.S. et Meena, M.C. (2013) Prediction of the solubility of zinc, copper, nickel, cadmium, and lead in metal-contaminated soils. *Environmental Monitoring and Assessment* **185**: 10015-10025.
- Zayed, A., Gowthaman, S. et Terry, N. (1998) Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. duckweed. *Journal of Environmental Quality* **27**: 715-721.
- Zhang, L., Angle, J.S. et Chaney, R.L. (2007) Do high-nickel leaves shed by the nickel hyperaccumulator *Alyssum murale* inhibit seed germination of competing plants? *New Phytologist* **173**: 509-516.
- Zhuang, X., Chen, J., Shim, H. et Bai, Z. (2007) New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment international* **33**: 406-413.

Annexes

Annexe 1 : La diversité des communautés bactériennes en climat tempéré (Grèce)

1. La caractérisation des échantillons

1.1. Les sites sélectionnés

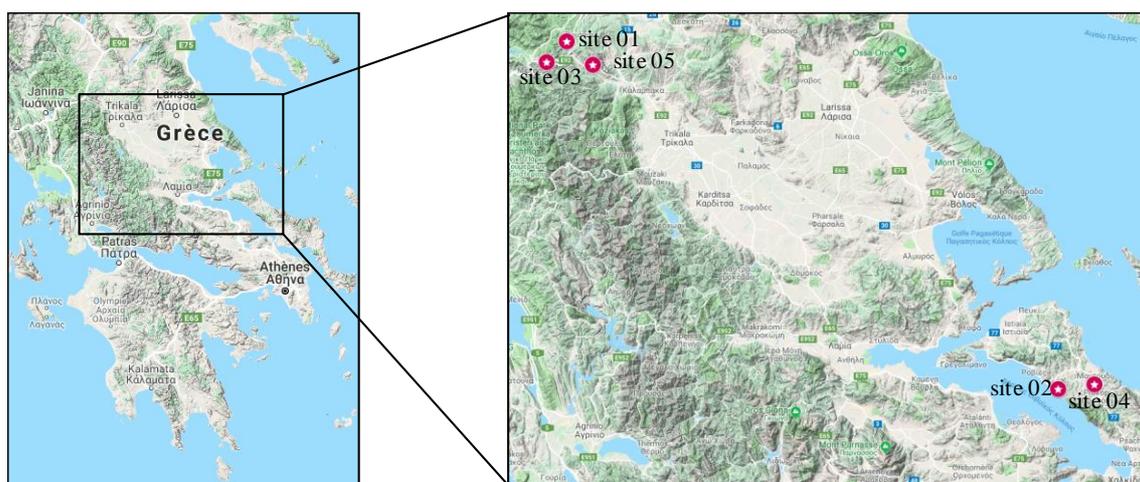


Figure 54 : Carte géographique des 5 sites de prélèvements

Tableau 51 : Sites, espèces et codes des plantes hyperaccumulatrices prélevées

Site	Appellation	Altitude (m)	Plantes et codes
01	Koutsoufliani	1000	<i>O. chalcidica</i> (Oc-01a, Oc-01b)
02	Limni	5	<i>O. muralis</i> s.l. (Om-02a, Om-02b, Om-02c)
03	Malakasi	1680	<i>B. tymphaea</i> (Bt-03)
04	Ile d'Eubée	35	<i>L. emarginata</i> (Le-04a, Le-04b), <i>Noccaea</i> sp. (No-04), <i>O. chalcidica</i> (Oc-04)
05	Trigona	860	<i>C. thracica</i> (Ct-05), <i>L. emarginata</i> (Le-05)

Tableau 52 : pH, N et C totaux et C organique des terres rhizosphériques

Bt : *B. tymphaea*, Ct : *C. thracica*, Le : *L. emarginata*, No : *Noccaea* sp., Om : *O. muralis* s.l., Oc : *O. chalcidica*

Echantillon	pH	%N	%C	%Corg
Oc-01a	8,03	0,363	7,083	3,680
Oc-01b	7,32	0,195	2,544	2,483
Om-02a	7,81	0,214	2,566	2,633
Om-02b	8,08	0,206	3,141	2,890
Om-02c	8,16	0,161	2,013	1,972
Bt-03	6,65	0,593	7,010	6,524
Le-04a	6,83	0,555	7,913	7,177
Le-04b	7,07	0,335	4,123	3,913
No-04	7,46	0,427	5,535	5,228
Oc-04	8,15	0,141	1,622	1,426
Ct-05	7,08	0,411	5,080	4,943
Le-05	6,34	0,842	9,387	8,924

Tableau 53 : Eléments totaux des terres rhizosphériques

Bt : *B. tymphaeae*, Ct : *C. thracica*, Le : *L. emarginata*, No : *Noccaea* sp., Om : *O. muralis* s.l.,
Oc : *O. chalcidica*

Echantillon	Al (mg g ⁻¹)	Ca (mg g ⁻¹)	Fe (mg g ⁻¹)	K (mg g ⁻¹)	Mg (mg g ⁻¹)	P (µg g ⁻¹)
Oc-01a	22	96	34	3,1	53	366
Oc-01b	31	5,3	89	1,6	64	501
Om-02a	7,5	3,4	45	1,5	146	240
Om-02b	4,8	6,8	66	1,4	133	190
Om-02c	9,8	2,6	76	2,3	102	193
Bt-03	32	6,5	52	4,3	35	727
Le-04a	10	4,6	71	2,1	57	586
Le-04b	5,9	2,5	73	1,4	101	415
No-04	6,3	6,1	69	1,7	95	368
Oc-04	6,3	2,4	83	1,3	90	135
Ct-05	13	3,4	71	1,7	53	915
Le-05	12	4,5	86	2,7	48	1468

Tableau 54 : Eléments traces métalliques totaux des terres rhizosphériques

Bt : *B. tymphaeae*, Ct : *C. thracica*, Le : *L. emarginata*, No : *Noccaea* sp., Om : *O. muralis* s.l.,
Oc : *O. chalcidica*

Echantillon	Mn (mg g ⁻¹)	Co (µg g ⁻¹)	Cr (µg g ⁻¹)	Cu (µg g ⁻¹)	Ni (mg g ⁻¹)	Zn (µg g ⁻¹)
Oc-01a	0,7	40	155	34	0,6	53
Oc-01b	1,5	121	333	71	1,8	84
Om-02a	1,5	114	297	14	1,4	77
Om-02b	1,4	145	169	21	1,9	65
Om-02c	1,4	131	275	16	2,5	71
Bt-03	2,3	56	400	37	0,8	120
Le-04a	1,3	122	385	24	2,8	101
Le-04b	1,8	137	315	16	3,2	84
No-04	1,1	113	394	16	2,9	76
Oc-04	1,4	138	467	11	3,7	68
Ct-05	1,4	126	368	13	2,5	91
Le-05	1,1	98	416	31	3,2	218

Tableau 55 : Métaux extractibles au DTPA des terres rhizosphériques

Bt : *B. tymphaeae*, Ct : *C. thracica*, Le : *L. emarginata*, No : *Noccaea* sp., Om : *O. muralis* s.l.,
Oc : *O. chalcidica*

Echantillons	Mn (µg g ⁻¹)	Fe (µg g ⁻¹)	Co (µg g ⁻¹)	Ni (µg g ⁻¹)	Cu (µg g ⁻¹)	Zn (µg g ⁻¹)	Pb (µg g ⁻¹)
Oc-01a	24	14	0,8	39	1,1	1,5	0,3
Oc-01b	19	47	1,0	97	4,3	1,0	0,3
Om-02a	42	23	2,2	20	0,9	1,9	1,0
Om-02b	29	19	1,8	23	0,9	1,5	0,6
Om-02c	45	20	2,4	24	0,6	0,6	0,4
Bt-03	53	54	0,5	133	1,6	2,8	1,0
Le-04a	68	77	3,2	400	1,2	9,1	1,8
Le-04b	29	50	1,3	137	0,9	3,6	0,7
No-04	60	23	3,6	82	0,9	2,5	0,8
Oc-04	14	5,3	0,6	51	0,3	0,7	<LQ
Ct-05	54	46	2,9	343	1,3	4,7	0,5
Le-05	87	89	3,2	296	5,5	52	0,3

Tableau 56 : CEC totale et éléments échangeables des terres rhizosphériques

Bt : *B. tympeae*, Ct : *C. thracica*, Le : *L. emarginata*, No : *Noccaea* sp., Om : *O. muralis* s.l.,
Oc : *O. chalcidica*

Echantillons	CEC totale ($\text{cmol}^+ \text{kg}^{-1}$)	Ca ($\text{cmol}^+ \text{kg}^{-1}$)	K ($\text{cmol}^+ \text{kg}^{-1}$)	Mg ($\text{cmol}^+ \text{kg}^{-1}$)	Mn ($\text{cmol}^+ \text{kg}^{-1}$)	Ni ($\text{cmol}^+ \text{kg}^{-1}$)
Oc-01a	25	20	0,54	3,1	0,005	<LQ
Oc-01b	34	9,9	0,22	21	0,007	0,066
Om-02a	21	10	0,36	7,3	0,006	<LQ
Om-02b	21	11	0,48	7,4	0,003	<LQ
Om-02c	20	5,4	0,56	9,8	0,013	<LQ
Bt-03	20	14	0,62	3,0	0,076	0,096
Le-04a	37	10	0,77	20	0,044	0,095
Le-04b	29	8,1	0,89	16	0,007	0,040
No-04	34	15	1,04	14	0,014	0,009
Oc-04	34	7,9	1,46	20	<LQ	0,015
Ct-05	37	8,6	0,47	23	0,030	0,102
Le-05	51	15	3,02	28	0,162	0,251

1.2. L'hyperaccumulation du Ni par les plantes échantillonnées

Tableau 57 : Macronutriments des parties aériennes et racinaires des plantes hyperaccumulatrices

PA : parties aériennes, PR : parties racinaires, Bt : *B. tympeae*, Ct : *C. thracica*, Le : *L. emarginata*,
No : *Noccaea* sp., Om : *O. muralis* s.l., Oc : *O. chalcidica*

Echantillons	Partie	Ca (mg g^{-1})	K (mg g^{-1})	Mg (mg g^{-1})	P ($\mu\text{g g}^{-1}$)	S ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Oc-01a	PA	26	13	1,8	1,5	3,3
	PR	6,6	10	1,3	1,5	3,7
Oc-01b	PA	14	14	2,9	1,8	2,2
	PR	2,1	11	1,8	1,7	3,5
Om-02a	PA	32	5,9	18	0,6	1,4
	PR	5,7	8,5	2,5	1,1	2,5
Om-02b	PA	33	7,8	3,8	1,2	2,0
	PR	5,1	4,2	20	0,7	1,7
Om-02c	PA	12	3,0	5,9	0,6	1,3
	PR	3,6	4,8	2,5	0,6	1,9
Bt-03	PA	12	12	1,6	1,3	3,6
	PR	3,6	6,7	1,9	0,6	1,8
Le-04a	PA	13	10	3,3	0,7	3,6
	PR	1,9	6,5	0,8	0,4	2,8
Le-04b	PA	5,3	8,7	2,0	1,8	3,4
	PR	3,7	7,5	1,7	1,5	2,5
No-04	PA	7,9	12	4,2	1,0	1,8
	PR	4,1	15	7,1	2,5	3,5
Oc-04	PA	8,0	5,8	5,8	0,9	1,6
	PR	2,5	2,2	8,2	0,4	0,8
Ct-05	PA	8,6	12	5,8	0,9	1,2
	PR	2,1	7,8	3,9	1,8	1,9
Le-05	PA	7,6	15	3,2	2,1	3,6
	PR	2,6	15	2,6	2,9	3,9

Tableau 58 : Micronutriments des parties aériennes et racinaires des plantes hyperaccumulatrices

PA : parties aériennes, PR : parties racinaires, Bt : *B. tympheae*, Ct : *C. thracica*, Le : *L. emarginata*,
No : *Noccaea* sp., Om : *O. muralis* s.l., Oc : *O. chalcidica*

Echantillons	Partie	Al ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cr ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Co ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Ni ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Oc-01a	PA	96	<LQ	2,6	4446	3,6	126
	PR	1095	7,8	<LQ	1248	4,1	84
Oc-01b	PA	291	3,6	13	13385	1,8	146
	PR	572	7,0	3,9	2560	3,4	86
Om-02a	PA	443	21	11	165	<LQ	14
	PR	50	3,6	<LQ	18	<LQ	<LQ
Om-02b	PA	152	3,0	12	3696	1,7	61
	PR	697	35	24	1066	3,5	34
Om-02c	PA	278	9,4	6,3	1519	1,6	23
	PR	106	7,0	2,7	798	1,4	21
Bt-03	PA	417	7,4	3,0	3203	3,9	131
	PR	523	11	2,6	2339	3,2	112
Le-04a	PA	143	5,6	7,9	14864	2,5	191
	PR	59	1,7	<LQ	3692	1,8	99
Le-04b	PA	49	<LQ	<LQ	3546	1,9	70
	PR	121	5,4	2,5	2366	2,3	57
No-04	PA	318	12	6,6	6810	2,3	327
	PR	507	32	10	2724	<LQ	876
Oc-04	PA	256	24	8,6	2112	<LQ	46
	PR	707	67	11	508	<LQ	15
Ct-05	PA	203	6,7	5,4	2756	5,1	55
	PR	390	14	5,9	2214	8,0	49
Le-05	PA	29	<LQ	6,3	11243	2,1	176
	PR	413	18	11	3583	2,9	118

**Tableau 59 : Facteur de bioconcentration (BCF) et de transfert (TF)
des hyperaccumulateurs**

Bt : *B. tympheae*, Ct : *C. thracica*, Le : *L. emarginata*, No : *Noccaea* sp., Om : *O. muralis* s.l.,
Oc : *O. chalcidica*

Echantillon	BCF	TF
Oc-01a	115	3,6
Oc-01b	138	5,2
Om-02a	8,1	9,2
Om-02b	161	3,5
Om-02c	63	1,9
Bt-03	24	1,4
Le-04a	37	4,0
Le-04b	26	1,5
No-04	83	2,5
Oc-04	41	4,2
Ct-05	8,0	1,2
Le-05	38	3,1

2. La diversité bactérienne des plantes hyperaccumulatrices de Ni

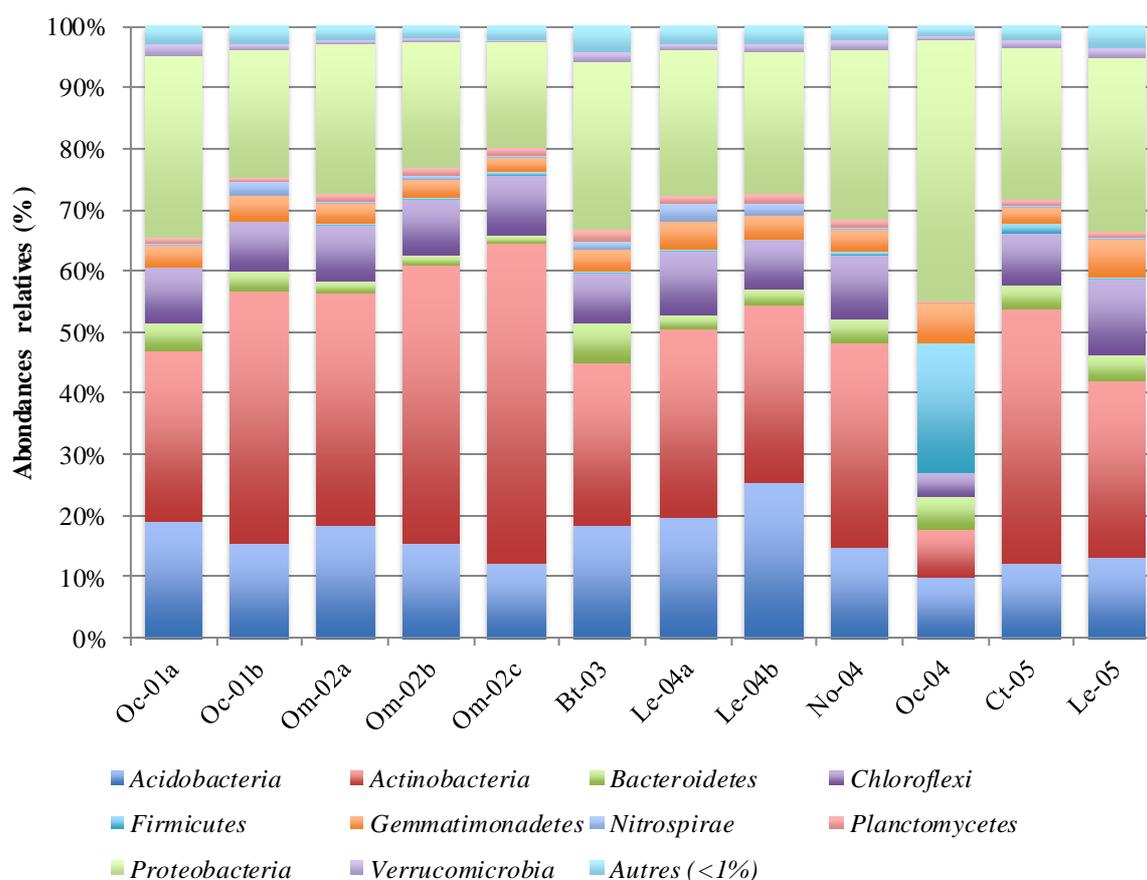


Figure 55 : Abondance relative des phyla majoritaires des terres rhizosphériques

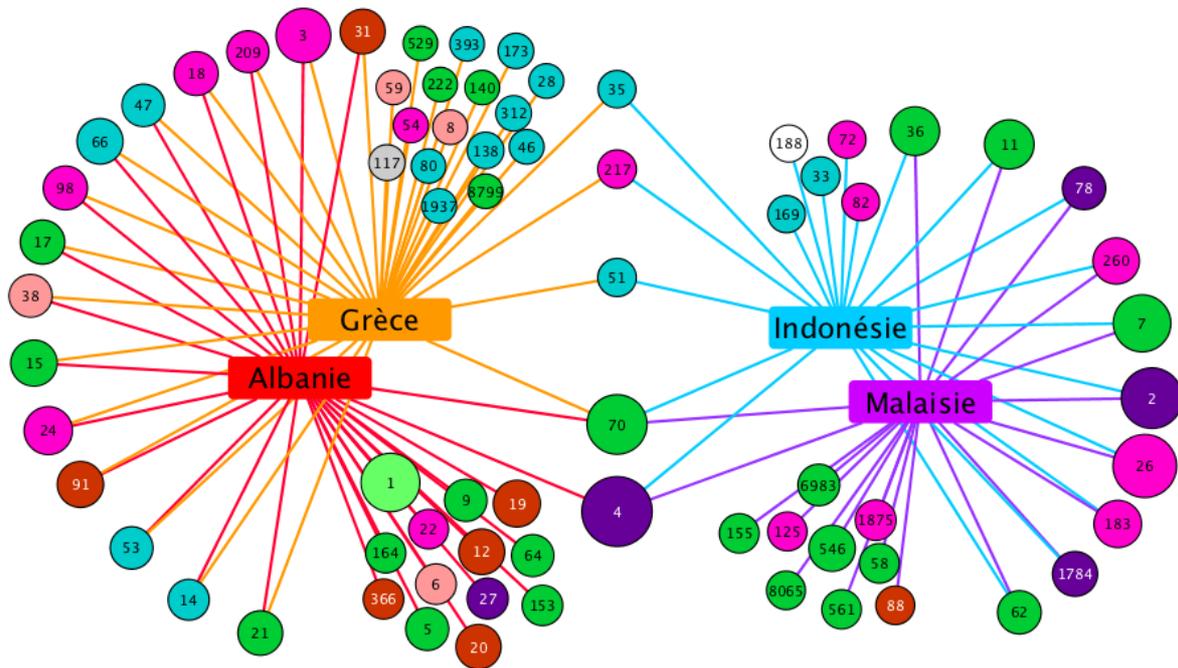
Bt : *B. tymphaea*, Ct : *C. thracica*, Le : *L. emarginata*, No : *Noccaea* sp., Om : *O. muralis* s.l., Oc : *O. chalcidica*, Autres regroupe les phyla possédant une abondance relative <1% : *Armatimonadetes*, *BJ-169*, *BRC1*, *Caniatus Berkelbacteria*, *Chlamydiae*, *Chlorobi*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Elusimicrobia*, *FBP*, *FCPU426*, *Fibrobacteres*, *Gracilibacteria*, *Hydrogenedentes*, *Ignavibacteriae*, *Latescibacteria*, *Microgenomates*, *Omnitrophica*, *Parcubacteria*, *Peregrinibacteria*, *Saccharibacteria*, *Tectomicrobia*, *Tenericutes*, *TM6*, *WS2*, *WS6*, *WWE3*

Tableau 60 : Indices d' α -diversité

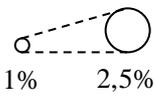
Bt : *B. tymphaea*, Ct : *C. thracica*, Le : *L. emarginata*, No : *Noccaea* sp., Om : *O. muralis* s.l.,
Oc : *O. chalcidica*

Echantillons	OTUs	Chao1	Shannon
Oc-01a	3031	3394	9.66
Oc-01b	2433	2867	9.29
Om-02a	2578	2897	9.38
Om-02b	2526	2863	9.33
Om-02c	1615	2136	9.07
Bt-03	3549	3804	9.83
Le-04a	2543	3269	9.42
Le-04b	2802	3338	9.65
No-04	3051	3487	9.83
Oc-04	2737	3134	8.59
Ct-05	3007	3447	9.55
Le-05	2698	3029	9.45

Annexe 2 : Affiliations taxonomiques relatives au réseau d'OTUs



- | | | |
|-------------------------|---------------------------|--------------------------|
| ● <i>Acidobacteria</i> | ● <i>Chloroflexi</i> | ● <i>Nitrospirae</i> |
| ● <i>Actinobacteria</i> | ● <i>Firmicutes</i> | ● <i>Proteobacteria</i> |
| ● <i>Bacteroidetes</i> | ● <i>Gemmatimonadetes</i> | ● <i>Verrucomicrobia</i> |

Abondances relatives : 

1% 2,5%

Figure 56 : Détail du réseau basé sur les OTUs >1% d'abondance relative dans les terres rhizosphériques d'Albanie (en rouge), de Grèce (en orange), d'Indonésie (en bleu) et de Malaisie (en violet)

Tableau 61 : Détail de l'affiliation taxonomique des OTUs

Numéros OTU	Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre
1875	<i>Acidobacteria</i>	<i>Blastocatellia</i>	<i>Blastocatellales</i>	<i>Blastocatellaceae</i>	<i>I1-24</i>
3, 18, 24, 54, 72, 98, 183 et 209	<i>Acidobacteria</i>	<i>Blastocatellia</i>	<i>Blastocatellales</i>	<i>Blastocatellaceae</i>	<i>RB41</i>
26 et 125	<i>Acidobacteria</i>	<i>Subgroup_2</i>	<i>Subgroup_2_or</i>	<i>Subgroup_2_fa</i>	<i>Subgroup_2_ge</i>
82 et 260	<i>Acidobacteria</i>	<i>Subgroup_5</i>	<i>Subgroup_5_or</i>	<i>Subgroup_5_fa</i>	<i>Subgroup_5_ge</i>
22 et 217	<i>Acidobacteria</i>	<i>Subgroup_6</i>	<i>Subgroup_6_or</i>	<i>Subgroup_6_fa</i>	<i>Subgroup_6_ge</i>
393	<i>Actinobacteria</i>	<i>Acidimicrobiia</i>	<i>Acidimicrobiales</i>	<i>uncultured</i>	<i>uncultured_ge</i>
33	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Frankiales</i>	<i>Frankiaceae</i>	<i>Jatrophihabitans</i>
66	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Frankiales</i>	<i>Geodermatophilaceae</i>	<i>Geodermatophilus</i>
1937	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Frankiales</i>	<i>Geodermatophilaceae</i>	<i>Geodermatobacter</i>
53	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Propionibacteriales</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Micrococcus</i>
138 et 312	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Streptomycetales</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i>
28	<i>Actinobacteria</i>	<i>MB-A2-108</i>	<i>MB-A2-108_or</i>	<i>MB-A2-108_fa</i>	<i>MB-A2-108_ge</i>
14, 35 et 169	<i>Actinobacteria</i>	<i>Thermoleophila</i>	<i>Gaiellales</i>	<i>Gaiellaceae</i>	<i>Gaiella</i>
80	<i>Actinobacteria</i>	<i>Thermoleophila</i>	<i>Gaiellales</i>	<i>uncultured</i>	<i>uncultured_ge</i>
47	<i>Actinobacteria</i>	<i>Thermoleophila</i>	<i>Solirubrobacterales</i>	<i>288-2</i>	<i>288-2_ge</i>
51	<i>Actinobacteria</i>	<i>Thermoleophila</i>	<i>Solirubrobacterales</i>	<i>Elev-16S-1332</i>	<i>Elev-16S-1332_ge</i>
173	<i>Actinobacteria</i>	<i>Thermoleophila</i>	<i>Solirubrobacterales</i>	<i>Solirubrobacteraceae</i>	<i>Solirubrobacter</i>
46	<i>Actinobacteria</i>	<i>unclassified</i>	<i>unclassified</i>	<i>unclassified</i>	<i>unclassified</i>
1	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Flavobacterium</i>
8	<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolineae</i>	<i>Anaerolineales</i>	<i>Anaerolineaceae</i>	<i>uncultured</i>
38 et 59	<i>Chloroflexi</i>	<i>KD4-96</i>	<i>KD4-96_or</i>	<i>KD4-96_fa</i>	<i>KD4-96_ge</i>
6	<i>Chloroflexi</i>	<i>P2-11E</i>	<i>P2-11E_or</i>	<i>P2-11E_fa</i>	<i>P2-11E_ge</i>
117	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>
91 et 366	<i>Gemmatimonadetes</i>	<i>Gemmatimonadetes</i>	<i>Gemmatimonadales</i>	<i>Gemmatimonadaceae</i>	<i>Gemmatimonas</i>
12, 20, 31 et 88	<i>Gemmatimonadetes</i>	<i>Gemmatimonadetes</i>	<i>Gemmatimonadales</i>	<i>Gemmatimonadaceae</i>	<i>uncultured</i>
19	<i>Gemmatimonadetes</i>	<i>Longimicrobia</i>	<i>Longimicrobiales</i>	<i>Longimicrobiaceae</i>	<i>unclassified</i>
2, 4, 78 et 1784	<i>Nitrospirae</i>	<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospirales</i>	<i>0319-6A21</i>	<i>0319-6A21_ge</i>
27	<i>Nitrospirae</i>	<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospirales</i>	<i>Nitrospiraceae</i>	<i>Nitrospira</i>
70	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
561	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Xanthobacteraceae</i>	<i>unclassified</i>
7	<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Xanthobacteraceae</i>	<i>uncultured</i>
164 et 15	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Rhizobacter</i>
21 et 9	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>unclassified</i>
153	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>unclassified</i>
8065	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Neisseriales</i>	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Chromobacterium</i>
5 et 17	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Nitrosomonadales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	<i>uncultured</i>
6983	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Azospira</i>
529	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Rhodocyclales</i>	<i>Rhodocyclaceae</i>	<i>unclassified</i>
64	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>SC-I-84</i>	<i>SC-I-84_fa</i>	<i>SC-I-84_ge</i>
8799	<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>TRA3-20</i>	<i>TRA3-20_fa</i>	<i>TRA3-20_ge</i>
62	<i>Proteobacteria</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfurellales</i>	<i>Desulfurellaceae</i>	<i>H16</i>
36	<i>Proteobacteria</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Myxococcales</i>	<i>unclassified</i>	<i>unclassified</i>
11	<i>Proteobacteria</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>NBI-j</i>	<i>NBI-j_fa</i>	<i>NBI-j_ge</i>
222	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>unclassified</i>
140	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>unclassified</i>
155	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>uncultured</i>	<i>uncultured_ge</i>
546	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Acidibacter</i>
58	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Steroidobacter</i>
188	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Spartobacteria</i>	<i>Chthoniobacteriales</i>	<i>DA101_soil_group</i>	<i>DA101_soil_group_ge</i>

Annexe 3 : Corrélations entre l'abondance relative des familles de gènes représentées à plus de 1% et les variables abiotiques des sols

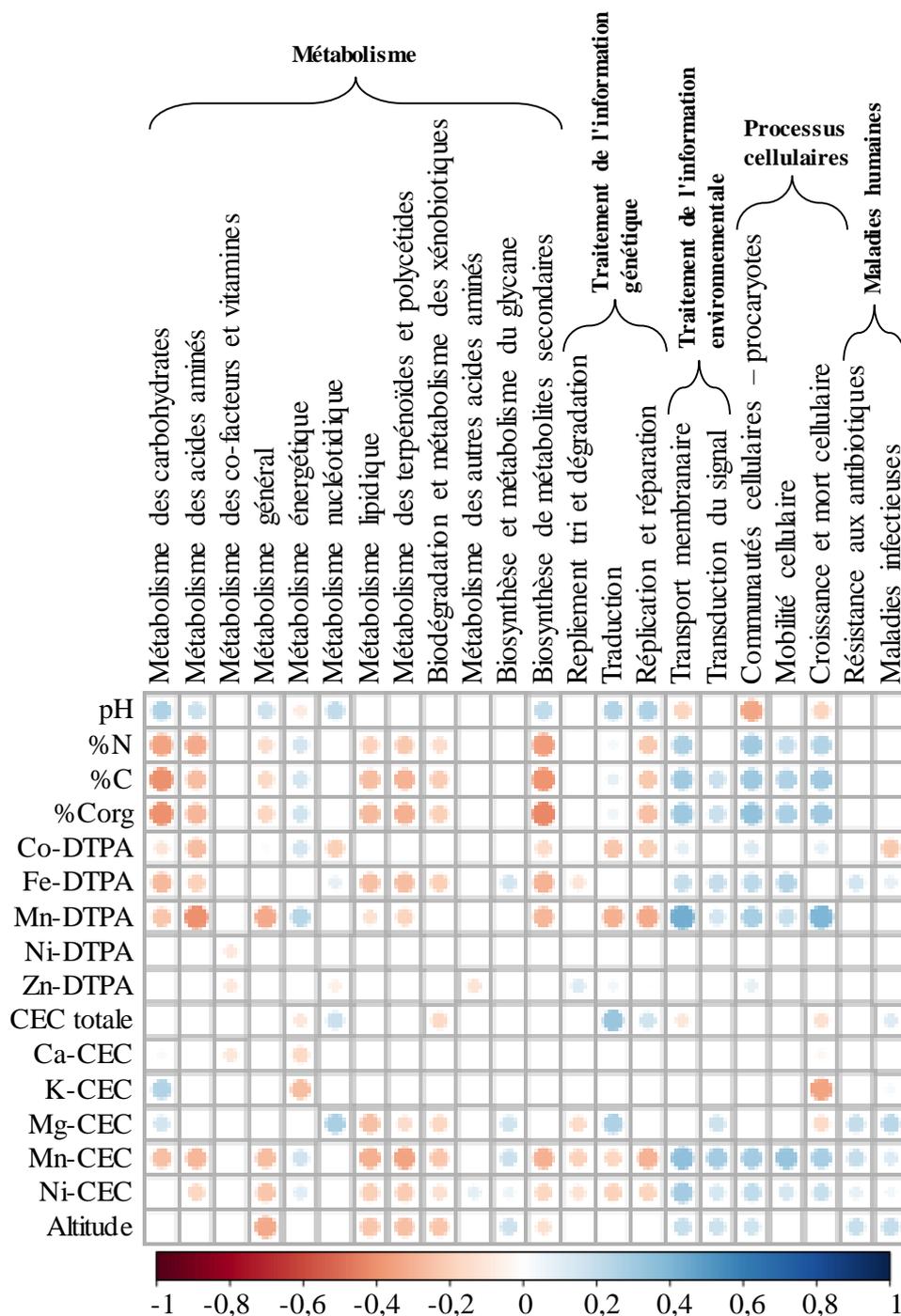


Figure 57 : Matrice de corrélations entre les paramètres abiotiques et les KO majoritaires (>1%) prédits des communautés bactériennes basée sur le coefficient de corrélation r de Spearman, les blancs signalent que le coefficient n'est pas significatif ($p > 0,1$)

Annexe 4 : Tampon PBS

Composants	Volumes
NaCl	4 g
Na ₂ HPO ₄	0,72 g
KH ₂ PO ₄	0,12 g
H ₂ O _d	Qsp 500 mL

Le pH est ajusté à 7,2 avec un ajout d'HCl et le tampon est autoclavé avant utilisation.

Annexe 5 : Milieu minimum DF

Solution en éléments traces

Composants	Quantités
H ₃ BO ₃	10 mg
MnSO ₄ H ₂ O	11,19 mg
ZnSO ₄ 7H ₂ O	124,6 mg
CuSO ₄ 5H ₂ O	78,22 mg
MoO ₃	10 mg
H ₂ O _d	Qsp 100 mL

Solution de fer

Composants	Quantités
FeSO ₄ 7H ₂ O	100 mg
H ₂ O _d	Qsp 10 mL

Milieu DF

Composants	Quantités
KH ₂ PO ₄	4 g
Na ₂ HPO ₄	6 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2 g
Glucose	2 g
Acide gluconique	2 g
Acide citrique	2 g
Solution en éléments traces	100 µL
Solution de fer	100 µL
H ₂ O _d	Qsp 1 L

Le milieu est autoclavé avant utilisation en conditions stériles.

Annexe 6 : Milieu CAS

Pour 1 L de solution de milieu CAS il convient de mélanger 800 mL de solution tampon principal autoclavée, 70 mL de solution tampon auxiliaire autoclavée, 30 mL de solution de casaminoacide 10% filtrée à 0,2 µm et 100 mL de solution indicatrice Fe-CAS autoclavée.

Solution tampon principal (pH 6,8)	
Composants	Quantités
KH ₂ PO ₄	0,3 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1,0 g
PIPES	30,24 g
Agar	15,0 g
H ₂ O _d	Qsp 800 mL

Solution indicatrice Fe-CAS	
Composants	Quantités
FeCl ₃ 6H ₂ O	2,7 mg
Hcl 0,56 M	180 µL
CAS	60,5 mg
HDTMA bromide	72,8 mg
H ₂ O _d	Qsp 100 mL

Solution tampon auxiliaire	
Composants	Quantités
Glucose	2 g
Mannitol	2 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	493 mg
CaCl ₂ 2H ₂ O	11 mg
MnSO ₄ H ₂ O	1,17 mg
H ₃ BO ₃	1,4 mg
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,04 mg
ZnSO ₄ 7H ₂ O	1,2 mg
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	1 mg
H ₂ O _d	Qsp 70 mL

Solution de casaminoacide 10%	
Composants	Quantités
Hydrate de caséine	3 g
H ₂ O _d	Qsp 30 mL

Annexe 7 : Milieu PVK

Composants	Quantités
Agar	15 g
Glucose	10 g
CaHPO ₄	5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
NaCl	0,2 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,1 g
Kcl	0,2 g
Extrait de levure	0,5 g
MnSO ₄ •H ₂ O	2 mg
FeSO ₄ •7H ₂ O	2 mg
H ₂ O _d	Qsp 1 L

Le milieu est autoclavé avant coulage des boîtes de Petri.

Annexe 8 : Paramètres biotiques et abiotiques des terres de cultures

Tableau 62 : Activités enzymatiques des terres de culture

P : planté, NP : non planté, ni : non inoculé, iA113-13 : inoculé avec la souche A113-13, iA113-23 : inoculé avec la souche A113-23, iA113-36 : inoculé avec la souche A113-36 ; la moyenne et l'écart type sont donnés pour les 3 répétitions, les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à $p = 0,05$ (TukeyHSD test)

Echantillon	Uréase	Arylsulfatase	β -glucosidase	Phosphatase alcaline	ACCd
T0	75 ± 74	121 ± 81	117 ± 57	558 ± 129	11 ± 16
Pni	6,3 ± 11 b	261 ± 144	72 ± 78	313 ± 39	133 ± 96
PiA113-13	34 ± 5,4 a	217 ± 123	250 ± 75	286 ± 107	55 ± 36
PiA113-23	13 ± 8,1 ab	164 ± 139	151 ± 79	319 ± 212	115 ± 113
PiA113-36	22 ± 5,2 ab	119 ± 127	213 ± 70	362 ± 104	65 ± 67
NPni	13 ± 9,3 ab	208 ± 32	263 ± 82	316 ± 134	92 ± 56
NPiA113-13	12 ± 13 ab	318 ± 193	235 ± 59	329 ± 83	74 ± 54
NPiA113-23	32 ± 13 ab	193 ± 134	173 ± 171	303 ± 139	53 ± 70
NPiA113-36	25 ± 3,5 ab	334 ± 27	116 ± 116	326 ± 172	16 ± 27

Tableau 63 : pH, N et C totaux et C organique des terres de culture

P : planté, NP : non planté, ni : non inoculé, iA113-13 : inoculé avec la souche A113-13, iA113-23 : inoculé avec la souche A113-23, iA113-36 : inoculé avec la souche A113-36 ;
la moyenne et l'écart type sont donnés pour les 3 répétitions

Echantillon	pH	%N	%C	%Corg
T0	5,34 ± 0,02	0,30 ± 0,01	3,49 ± 0,02	3,42 ± 0,05
Pni	4,84 ± 0,08	0,30 ± 0,02	3,97 ± 0,32	3,67 ± 0,06
PiA113-13	4,79 ± 0,03	0,29 ± 0,01	3,78 ± 0,09	3,65 ± 0,22
PiA113-23	4,80 ± 0,08	0,30 ± 0,01	3,96 ± 0,12	3,78 ± 0,11
PiA113-36	4,84 ± 0,14	0,31 ± 0,02	3,95 ± 0,24	3,74 ± 0,20
NPni	4,86 ± 0,08	0,32 ± 0,04	4,04 ± 0,66	3,71 ± 0,19
NPiA113-13	4,78 ± 0,02	0,30 ± 0,02	3,75 ± 0,32	3,61 ± 0,07
NPiA113-23	4,71 ± 0,02	0,31 ± 0,02	3,74 ± 0,19	4,30 ± 0,17
NPiA113-36	4,79 ± 0,06	0,30 ± 0,02	3,76 ± 0,13	3,78 ± 0,19

Tableau 64 : Métaux biodisponibles (mg kg⁻¹) des terres de culture

P : planté, NP : non planté, ni : non inoculé, iA113-13 : inoculé avec la souche A113-13, iA113-23 : inoculé avec la souche A113-23, iA113-36 : inoculé avec la souche A113-36 ;
la moyenne et l'écart type sont donnés pour les 3 répétitions, les lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes à p = 0,05 (TukeyHSD test)

Echantillon	Al	Co	Fe	Mn	Ni
T0	97 ± 2,4	1,1 ± 0,01	66 ± 38	30 ± 0,48	17 ± 0,10
Pni	114 ± 5,7	1,1 ± 0,09	147 ± 7,4 bcd	29 ± 1,5	18 ± 1,2 ab
PiA113-13	117 ± 7,4	1,2 ± 0,10	150 ± 8,3 abcd	30 ± 2,0	19 ± 1,4 ab
PiA113-23	109 ± 3,2	1,1 ± 0,04	142 ± 2,7 d	27 ± 0,89	17 ± 0,77 b
PiA113-36	109 ± 3,9	1,1 ± 0,13	141 ± 3,0 d	28 ± 3,1	17 ± 0,57 b
NPni	111 ± 4,9	1,2 ± 0,13	152 ± 7,3 abcd	29 ± 3,1	19 ± 0,86 ab
NPiA113-13	116 ± 0,6	1,3 ± 0,09	164 ± 3,1 a	30 ± 2,2	20 ± 1,0 a
NPiA113-23	113 ± 3,2	1,3 ± 0,07	156 ± 3,8 abc	32 ± 2,1	19 ± 0,51 ab
NPiA113-36	114 ± 1,9	1,3 ± 0,09	161 ± 3,9 ab	30 ± 2,0	20 ± 0,79 ab

Tableau 65 : CEC totale et éléments échangeables (cmol⁺ kg⁻¹) des terres de culture

P : planté, NP : non planté, ni : non inoculé, iA113-13 : inoculé avec la souche A113-13, iA113-23 : inoculé avec la souche A113-23, iA113-36 : inoculé avec la souche A113-36 ;
la moyenne et l'écart type sont donnés pour les 3 répétitions

Echantillon	CEC totale	Ca	K	Mg	Mn	Ni
T0	6,9 ± 0,34	1,7 ± 0,04	0,95 ± 0,02	2,6 ± 0,07	0,08 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Pni	5,5 ± 0,37	1,4 ± 0,01	0,65 ± 0,02	1,7 ± 0,12	0,09 ± 0,00	0,03 ± 0,00
PiA113-13	5,5 ± 0,27	1,5 ± 0,02	0,70 ± 0,01	1,9 ± 0,14	0,10 ± 0,00	0,04 ± 0,00
PiA113-23	5,4 ± 0,35	1,4 ± 0,08	0,65 ± 0,04	1,8 ± 0,17	0,09 ± 0,01	0,03 ± 0,00
PiA113-36	5,1 ± 0,35	1,4 ± 0,02	0,60 ± 0,03	1,6 ± 0,09	0,09 ± 0,01	0,03 ± 0,00
NPni	5,4 ± 0,32	1,4 ± 0,16	0,66 ± 0,15	1,7 ± 0,37	0,09 ± 0,01	0,03 ± 0,00
NPiA113-13	5,4 ± 0,24	1,5 ± 0,18	0,67 ± 0,11	1,7 ± 0,28	0,09 ± 0,01	0,04 ± 0,00
NPiA113-23	5,5 ± 0,10	1,6 ± 0,03	0,71 ± 0,02	2,0 ± 0,15	0,10 ± 0,00	0,04 ± 0,00
NPiA113-36	5,3 ± 0,52	1,5 ± 0,13	0,65 ± 0,13	1,8 ± 0,24	0,09 ± 0,01	0,03 ± 0,00

Déterminisme de la diversité bactérienne rhizosphérique des hyperaccumulateurs de nickel

La connaissance de la diversité microbienne des milieux ultramafiques est essentielle pour établir le fonctionnement écologique de ces milieux, qui présentent de fortes teneurs en Ni et sont caractérisés par une flore particulière, *e.g.* plantes hyperaccumulatrices de Ni. La rhizosphère des hyperaccumulateurs comporte une forte proportion de bactéries résistantes au Ni, qui peuvent aussi agir sur la nutrition des plantes et sur les propriétés physico-chimiques du sol. Le premier défi de cette thèse a été de cerner le déterminisme de la diversité bactérienne de la rhizosphère d'hyperaccumulateurs de Ni. Le second a été de tester l'intérêt de souches PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) pour optimiser l'agromine à partir d'interactions entre les rhizobactéries et les hyperaccumulateurs de Ni. La démarche s'est appuyée sur un ensemble de prospections dans deux régions climatiques et sur des analyses de séquençage haut débit. Des tests de cultures de plantes hyperaccumulatrices inoculées ont également été conduits. Les résultats montrent que le déterminisme de la diversité bactérienne est variable selon l'échelle spatiale. A l'échelle mondiale, le type de végétation est le facteur majeur structurant les communautés bactériennes, elle-même contrôlée indirectement par le climat. L'influence directe du climat (température et humidité) sur la diversité est significative mais moindre. A l'échelle d'une région climatique, la physico-chimie des sols ultramafiques structure et détermine la diversité des communautés bactériennes rhizosphériques. Enfin, l'inoculation de souches PGPR fortement bioaccumulatrices de Ni modifie la dynamique du Ni dans le sol, ce qui démontre qu'il existe une compétition pour le Ni entre la plante et la bactérie inoculée. En conclusion, le déterminisme de la diversité des communautés bactériennes rhizosphériques est dépendant de l'échelle spatiale considérée. En outre, le choix de la souche PGPR à inoculer, dans un contexte d'amélioration de l'agromine du Ni, est primordial.

Mots clés : *Odontarrhena chalcidica*, sols ultramafiques, agromine, PGPR, séquençage Illumina, Tax4Fun

Determinism of the bacterial rhizosphere diversity of nickel hyperaccumulators

Knowledge of the microbial diversity in ultramafic areas is essential to establish the ecological functioning of these environments, which display high level of Ni and are characterized by the presence of particular plants, *e.g.* Ni hyperaccumulators. The rhizosphere of these plants promotes a high proportion of Ni resistant bacteria that can act on plant nutrition and soil physicochemical properties. The first challenge of this thesis was to understand the bacterial rhizosphere diversity of Ni hyperaccumulators. The second was to test the interest of PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) strains in order to improve agromining based on rhizobacteria and Ni hyperaccumulators interactions. The approach was based on two-contrasted climatic areas prospection and on high-throughput sequencing analyzes. Tests on culture of hyperaccumulator plants inoculated were also conducted. The results show that the determinism of this bacterial diversity is variable according to the spatial scale. On a global scale, the vegetation type, indirectly influenced by the climate, is the major factor structuring bacterial communities. The direct influence of the climate (temperature and humidity) on bacterial diversity is significant but lower. At the scale of a climatic region, the physic-chemistry of ultramafic soils structures and determines the rhizosphere bacterial community diversity. Finally, the inoculation of highly Ni bioaccumulative PGPR strains modifies the Ni dynamic in the soil, demonstrating that there is a competition for this metal between the inoculated bacteria and the hyperaccumulator plant. In conclusion, the rhizosphere bacterial community diversity is dependent on the considered spatial scale. Furthermore, these results emphasize how the choice of the PGPR strain to inoculate is important in order to improve Ni agromining.

Key words: *Odontarrhena chalcidica*, ultramafic soils, agromining, PGPR, Illumina sequencing, Tax4Fun