MONTPELLIER SUPAGRO

ECOLE DOCTORALE : SYSTEMES INTEGRES EN BIOLOGIE, AGRONOMIE, GEOSCIENCES, HYDROSCIENCES ET ENVIRONNEMENT (SIBAGHE)

INSTITUT SUPERIEUR AGRONOMIQUE DE CHOTT MERIAM UNIVERSITE DE SOUSSE

ECOLE DOCTORALE : AGRONOMIE ET ENVIRONNEMENT

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE MONTPELLIER SUPAGRO / INSTITUT SUPERIEUR AGRONOMIQUE DE CHOTT-MERIAM

Disciplines : Microbiologie, Parasitologie / Agriculture Durable

Présentée et soutenue publiquement par

SOUSSOU Souhir

Le 17 avril 2013

Adaptation de la symbiose Fabacées-rhizobium aux sites miniers : Absorption du zinc par *Anthyllis vulneraria* et analyse de la diversité des bactéries symbiotiques d'*Hedysarum coronarium*

JURY

Chedly ABDELLY, Professeur Centre de Biotechnologie de Borj Cédria, Tunis	**Rapporteur**
René BALLY, Directeur de Recherche CNRS, Marseille	**Rapporteur**
Mohamed BANNI, Maître de Conférences ISB, Monastir	**Examinateur**
Patrick TAILLIEZ, Ingénieur de Recherche UM2, Montpellier	**Examinateur**
Hamadi BOUSSETTA, Professeur ISA-Chott-Meriam, Sousse	**Co-directeur de thèse**
Jean-Claude CLEYET-MAREL, Directeur de Recherche INRA, Montpellier	**Directeur de thèse**
Brigitte BRUNEL, Professeur Montpellier SupAgro, Montpellier	**Invitée**

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Mes chers parents : ***Mohamed Mansour*** *et* ***Najoua*** *pour tous leurs efforts, leur soutien sans faille, leur amour et leurs encouragements. Je voudrais leur exprimer ma reconnaissance et ma profonde affectation.*

Ma grande mère ***Latifa*** *pour son amour et ses prières.*

Mes sœurs ***Assawer****,* ***Asma, Tayssir*** *et mon frère* ***Mohamed Hassan****.*

Votre fierté de moi me vaut tous les diplômes du monde

"Rien de grand ne se fait sans passion "

Remerciements

Au terme de ce parcours aussi passionnant qu'escarpé et avant d'exposer le fruit de trois années d'efforts, il m'est particulièrement agréable en ces quelques lignes de remercier et d'exprimer ma reconnaissance envers tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à sa réalisation.

Je remercie chaleureusement M. **Michel LEBRUN**, directeur du Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM), pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire. Je le remercie également pour sa bienveillance, ses conseils et les connaissances qu'il m'a transmises dans le monde de la physiologie végétale.

Les mots ne seront certainement pas assez forts pour exprimer ma gratitude et ma reconnaissance envers mes trois encadrants de thèse :

Tout d'abord, je remercie mon directeur de thèse, M. **Jean-Claude CLEYET-MAREL**, qui m'a fait confiance. Sa disponibilité et tout le temps qu'il a bien voulu m'accorder, m'ont été très précieux. Si la thèse s'est si bien déroulée pour moi, c'est notamment grâce à lui, à ses qualités de pédagogue enthousiaste, et à ses nombreux conseils toujours utiles et pertinents. De plus, j'ai partagé avec mon cher chef de bons moments en dehors du laboratoire et en particulier sur le terrain où en plus d'être un bon directeur, il m'a fait profiter de son expertise et nos discussions m'ont permis d'entretenir vis-à-vis de toute chose un esprit critique.

Je tiens à remercier également mon co-directeur de thèse, M. **Hamadi BOUSSETTA,** qui m'a offert l'opportunité d'accomplir mes études dans son Laboratoire de Biochimie et de Toxicologie Environnementale à l'Institut Supérieur Agronomique de Chott-Meriam (ISA-CM). Je le remercie tout particulièrement pour la grande confiance qu'il m'a témoignée dès mes premiers pas dans le monde de la recherche jusqu'à aujourd'hui. Il m'a toujours soutenue dans mes projets en me laissant toute la latitude dont j'avais besoin et je le remercie aussi pour son aide et son soutien en toute circonstance.

J'exprime ma gratitude à Mme **Brigitte BRUNEL**, co-directrice de thèse, pour son encadrement et son aide. Malgré son emploi du temps de professeur très chargé, Brigitte n'a pas hésité à me transmettre ses conseils pertinents et à me guider pour acquérir des connaissances en phylogénie.

Je voudrais remercier ensuite les membres de jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je remercie vivement M. **Chedly ABDELLY**, Professeur au Centre de Biotechnologie à Borj Cédria (Tunisie), et M. **René BALLY**, Directeur de Recherche au Centre National de Recherche Scientifique, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse et ce malgré leurs engagements et les contraintes de temps et de délais. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je souhaite remercier également M. **Mohamed BANNI**, Maître de conférences à l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir, et M. **Patrick TAILLIEZ**, Ingénieur de Recherche à l'Institut National de la Recherche Agronomique, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examinateurs. Votre participation est un grand honneur pour moi.

Cette thèse a été financée en grande partie par une bourse Averroès et je remercie tout le personnel administratif de l'Institut des Régions Chaudes et particulièrement, M. **Jean-Luc BOSIO**, Mme **Corinne PICKETT** et Mme **Gisèle ANDRE** pour m'avoir suivi et offert toutes les conditions favorables durant mon séjour. Je remercie également l'Université de Sousse et ses responsables qui m'ont donné la chance d'avoir cette bourse et particulièrement M. **Fayçal MANSOURI**, directeur de l'Université de Sousse, **Mme Latifa KECHICHE,** sous directrice à l'Université de Sousse, et sans oublier M. **Mongi SEFFENE**.

Un grand merci à Mme **Marie-Pierre ISAURE** et Mme **Stéphanie MAHIEU**, membres de mon comité de thèse, qui ont suivi avec attention mon travail. Je n'oublierai jamais leurs encouragements promulgués lors des rencontres de ces comités.

Je tiens ici à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance à M. **José ESCARRE** pour sa généreuse collaboration. Ses connaissances en écologie et en statistique m'ont été très utiles pour l'avancement de mon travail.

J'adresse mes remerciements les plus profonds à M. **Mohamed BANNI** pour son aide, ses conseils et ses encouragements. Qu'il trouve ici le témoignage de mon estime et l'expression de ma profonde gratitude.

Je tiens à exprimer également mes remerciements à M. **Abdelhamid BOUJELBENE,** Directeur de l'ISA-CM.

Je souhaite remercier aussi M. **Moncef BEN HAMMOUDA,** professeur à l'Ecole Supérieure d'Agriculture du Kef, et M. **Noufel ABD RABBA** pour leur aide et leur généreuse collaboration.

J'exprime également mes vifs remerciements à M. **Pierre BERTHOLMIEU,** professeur à SupAgro et M. **Patrick DOUMAS,** chercheur INRA, pour leur généreuse collaboration.

Une pensée me vient bien évidemment pour ma chère **Lucette MAURE**, qui comprend tellement ce que je vis. Elle a été un support incroyable durant ma thèse avec ses compliments et son attention à mon égard. Elle a été mon réconfort dans les moments de doute. Je remercie Lucette pour son aide et ses initiatives chaque fois que j'en ai eu besoin. Je la remercie également pour tous ses conseils à la paillasse qui étaient pour moi indispensables pour mieux comprendre l' « abc » de la microbiologie. Partager le bureau avec elle et mon directeur de thèse, nous a permis de former une équipe bien solide.

Je souhaite remercier très chaleureusement **Claire SERRA-WITTLING**. Il est difficile de trouver des qualificatifs assez forts pour souligner sa gentillesse, son humilité et sa patience à prodiguer des conseils pertinents.

Mention spéciale à **Nathalie PUJET** qui m'a soutenue chaque fois que je suis rentrée dans son bureau pour demander « des trucs » parfois trop compliqués. Très humblement, je voudrais lui dire merci pour son soutien pendant mes périodes de doute et pour ses encouragements multiples et répétés. Me considérer comme sa fille a toujours été pour moi une source de force et de bonheur. Ma chère, « que serais-je sans toi… »

C'est difficile d'écrire en quelques lignes un remerciement à **Naïma REZKALLAH**. Ma chère, « Que serait le labo sans toi ? ». Une seconde maman pour tous les thésards et stagiaires du Labo et qui est toujours prête à rendre service. Merci ma chère pour tous les moments inoubliables qu'on a partagés ensemble. Je n'oublierai jamais tes bras qui étaient toujours ouverts chaque fois que j'ai traversé des moments difficiles.

J'exprime également mes vifs remerciements à **Christine LE ROUX** pour ses encouragements, sa sympathie et son aide. Je lui témoigne ma profonde reconnaissance et mon profond respect.

Un remerciement particulier me vient pour une personne que je respectais beaucoup mais qui n'est plus là. **Gisèle LAGUERRE** était toujours à mon écoute, elle m'avait beaucoup aidé et avec ces quelques lignes je souhaite lui rendre hommage. Gisèle nous a quittés trop tôt, mais elle nous a laissé toute une richesse et des connaissances dans le monde des rhizobium.

Une pensée me vient bien évidemment pour mes copains et copines de thèse. Merci pour leurs aides et leurs encouragements. Je pense en particulier à **Imene** avec qui j'ai partagé ses 3 années de thèse, ses galères mais aussi des bons moments. Toutes les deux on était des inséparables. Je tiens également à remercier **Rémy** qui était toujours là pour me remonter le moral et m'aider. Je pense aussi à **Géraldine** avec qui j'ai partagé de bons moments. Merci **GG** de m'avoir appris l' « abc » de la biologie moléculaire et pour ta disponibilité chaque fois que je t'ai demandé de l'aide. Je ne peux pas non plus ne pas penser à **Caroline** pour son humour et son amitié. Mes remerciements s'adressent également à mes amis africains, **Amadou, Eddy et Fatou**. Leur présence n'était pour moi « que du bonheur ». Une autre pensée particulière est destinée à **Khaled**, son soutien moral m'a toujours était très utile. Mes remerciements s'adressent également à **Waseem** et **Nassira** avec qui j'ai partagé de bons moments.

Durant ces trois années de thèse, j'ai eu la chance de côtoyer de nombreuses personnes attachantes : que toutes soient remerciées pour les bons moments partagés, pour leur aide et pour leurs encouragements. Je pense notamment (pardon à ceux que j'oublie) à **Anouk FAVRY**, **Djamel GULLY**, **Ezékiel BAUDOIN**, **Fabienne CARTIEAUX, Delphine PATREL**, **Joël FARDOUX**, **Eric GIRAUD**, **Clémence CHAINTREUIL**, **Marc LEPETIT**, **Marc BOURSOT**, **Jean-François ARRIGHI**, **Cathy MORTIER**, **Philippe DE**

LAJUDIE, **Lionel MOULIN**, **Nico NOUWEN**, **Odile DOMERGUE**, **Pierre TISSEYRE**, **Pierre CZERNIC**, **Agnieszka KLONOWSKA**, **Karine HEULIN, Antoine LE QUERE, Hervé SANGUIN**, **Antoine GALIANA** et **Yves PRIN**.

Je voudrais témoigner ma profonde reconnaissance à toute l'équipe du laboratoire de Biochimie et de Toxicologie Environnementale à l'ISA-CM pour leurs disponibilités et l'ambiance familiale qu'ils ont installée au sein du laboratoire.

Je tiens à remercier **Tasnime MAGHRAOUI, Sana ROMDHANE**, **Sanaa WAHBI, Raya ABDEDAIEM**, **Roba MOHAMAD** et **Alessandra PONTIROLI** et je leur souhaite bon courage pour la suite.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans une pensée pour mes amies **Amal, Inès, Ibtisseme, Zaineb, Naziha** et **Naouel** qui pendant toutes ces années étaient là pour me soutenir malgré la distance.

J'en oublie certainement et je vous prie de bien vouloir m'en excuser ...

Avant-propos

Ce manuscrit conclut trois ans de travail de thèse en co-tutelle réalisée entre Montpellier SupAgro au Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM) et l'Institut Supérieur Agronomique de Chott-Meriam (ISA-CM) / Université de Sousse au Laboratoire de Biochimie et de Toxicologie Environnementale. Ce travail a été financé en grande partie par la bourse Averroès (20 mois), une bourse Utique (3 mois) et enfin par un contrat CDD de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) au sein du LSTM.

Sommaire

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES 13

LISTE DES ABREVIATIONS 16

LISTE DES FIGURES 20

LISTE DES TABLEAUX 25

INTRODUCTION GENERALE 27

1. CONTEXTE GENERAL ET PROBLEMATIQUES 27
2. OBJECTIFS DE THESE 30
3. PLAN DE LA THESE 31

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 32

1. CARACTERISTIQUES DES POLLUTIONS PAR LES METAUX 32
   1.1. Les Eléments-Traces Métalliques 33
   1.2. Toxicité des métaux 34
      1.2.1. Effet de la toxicité des métaux sur la santé humaine 35
      1.2.2. Effet de la toxicité des métaux sur les végétaux 36
   1.3. Contamination des sols par les métaux 37
      1.3.1. Contamination des sols agricoles 37
      1.3.2. Les sites pollués suite aux activités minières 39
2. LES PLANTES, LES MICROORGANISMES ET LEURS ADAPTATIONS A LA PRESENCE DE METAUX 40
   2.1. Adaptation des plantes aux milieux extrêmes 40
   2.2. Hyperaccumulation des ETMs : étude de l'absorption et du transport de Zn 43
   2.3. Réhabilitation des écosystèmes métallifères par phytoremédiation 46
3. ASSOCIATION RHIZOBIUM-LEGUMINEUSE 51
   3.1. La symbiose rhizobium-légumineuse 51
   3.2. Les légumineuses 55
   3.3. Les rhizobium 56
      3.3.1. L'ADN ribosomal 16S 59

3.3.2. Les gènes de ménage 59
3.3.3. Les gènes de nodulation 60
4. LES BACTERIES ET RESISTANCE AUX METAUX 61
4.1. Résistance au zinc 62
4.2. Résistance au cadmium 64
4.3. Exemples de bactéries symbiotiques résistantes aux métaux 65
5. INFLUENCE DE L'ASSOCIATION RHIZOBIUM-LEGUMINEUSE SUR L'ABSORPTION DES METAUX 66
6. RE-FONCTIONNALISATION ECOLOGIQUE DES SOLS ET DES SUBSTRATS MINIERS A FORTES TENEURS EN ETMS EN UTILISANT LES PROPRIETES DES PLANTES ET DES MICROORGANISMES METALLICOLES : PERSPECTIVES 68
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES 69
1. ABSORPTION ET ACCUMULATION DU ZINC CHEZ *ANTHYLLIS VULNERARIA*, LEGUMINEUSE RETENUE COMME MODELE D'ETUDE 69
1.1. Le modèle d'étude : *Anthyllis vulneraria* 69
1.1.1. Caractéristiques morphologiques 70
1.1.2. Répartition des sous-espèces d'*Anthyllis vulneraria* utilisées dans notre étude 70
1.1.2.1. Sous-espèces originaires des sols pollués 71
1.1.2.2. Sous-espèces originaires des sols non pollués 73
1.2. Pré-culture des plantes 74
1.3. Exposition des plantes au zinc en conditions d'hydroponie 75
1.4. Analyses statistiques 77
2. ETUDE DE LA DIVERSITE PHENOTYPIQUE ET GENOTYPIQUE DES BACTERIES SYMBIOTIQUES FIXATRICES D'AZOTE ASSOCIEES A DES LEGUMINEUSES METALLICOLES, PRESENTES EN TUNISIE 77
2.1. Sites prospectés en Tunisie 77
2.1.1. Aperçu général sur les sites miniers étudiés 78
2.1.1.1. Mine de Fej El Hdoum 78
2.1.1.2. Mine de Fed Hassène 79
2.1.1.3. Mine de Bou Aouane 79
2.1.2. Observations sur le terrain et prélèvements de sol et de matériel végétal 80
2.1.2.1. Ancienne mine de Fej El Hdoum 80

2.1.2.2. Prélèvements de sols et substrats miniers sur trois anciennes mines tunisiennes.. 82
2.1.2.3. Piégeage des bactéries symbiotiques présentes dans les échantillons de sol en utilisant *Hedysarum coronarium* 83
2.1.2.4. Multiplication des graines 83
2.1.2.5. Isolement des bactéries symbiotiques 84
2.2. Etude phylogénétique des souches isolées à partir de nodosités d'*Hedysarum coronarium* 85
2.3. Caractérisation de la tolérance bactérienne aux métaux 90
2.4. Hybridation ADN-ADN 91
2.5. Tests de nodulation et de fixation 91
3. ADAPTATION D'*ANTHYLLIS VULNERARIA*, D'*HEDYSARUM CORONARIUM* ET DE *MEDICAGO ORBICULARIS* A LA CONTAMINATION METALLIQUE ET INFLUENCE DES BACTERIES SYMBIOTIQUES 92
3.1. Sols… 92
3.2. Matériel biologique 94
3.3. Conduite de l'expérimentation 94
3.4. Inoculum 95
3.5. Les analyses statistiques 95

CHAPITRE III : ABSORPTION ET ACCUMULATION DU ZINC CHEZ *ANTHYLLIS VULNERARIA*, LEGUMINEUSE RETENUE COMME MODELE D'ETUDE 96

1. INTRODUCTION 96
2. RESULTATS 97
2.1. Biomasse aérienne et racinaire 97
2.2. Biomasse des nodosités 102
2.3. Mesures de fluorescence des feuilles 103
2.4. Concentration en zinc dans les parties aériennes et racinaires des différentes sous-espèces d'*A. vulneraria* 105
2.5. Concentration en zinc dans les nodosités 108
3. DISCUSSION 109

CHAPITRE IV : ETUDE DE LA DIVERSITE PHENOTYPIQUE ET GENOTYPIQUE DES BACTERIES SYMBIOTIQUES FIXATRICES D'AZOTE ASSOCIEES A DES LEGUMINEUSES METALLICOLES, PRESENTES EN TUNISIE 114

1. INTRODUCTION 114
2. RESULTATS 116
   2.1. Analyse des sols 116
   2.2. Isolement des rhizobia à partir de nodosités prélevées sur des plantes 119
   2.3. Piégeages bactériens 119
   2.4. Etudes phylogénétiques des souches isolées à partir d'*Hedysarum coronarium* .. 119
      2.4.1. Analyses phylogénétiques des séquences du gène *rec*A 121
      2.4.2. Analyses phylogénétiques des séquences du gène *atp*D 124
      2.4.3. Analyses phylogénétiques des séquences d'ADN ribosomal 16S 126
      2.4.4. Amplification des séquences des gènes *nod*A et *nod*C 130
   2.5. Test de nodulation et de fixation 130
   2.6. Caractéristiques de tolérance aux métaux 133
   2.7. Hybridation ADN-ADN 134
3. DISCUSSION 135

CHAPITRE V : ADAPTATION D'*ANTHYLLIS VULNERARIA*, D'*HEDYSARUM CORONARIUM* ET DE *MEDICAGO ORBICULARIS* A LA CONTAMINATION METALLIQUE ET INFLUENCE DES BACTERIES SYMBIOTIQUES 140

1. INTRODUCTION 140
2. RESULTATS 142
   2.1. Biomasse aérienne et racinaire 142
   2.2. Biomasse des nodosités 146
   2.3. Mesures de fluorescence des feuilles 147
3. DISCUSSION 149

CHAPITRE VI : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 153

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 163

ANNEXES 191

Liste des publications et communications scientifiques

➢ Publications

- **Soussou S.**, Mahieu S., Brunel B., Escarré J., Lebrun M., Banni M., Boussetta H., Cleyet-Marel J.C., 2013. Zinc accumulation patterns in four *Anthyllis vulneraria* subspecies supplemented with mineral nitrogen or grown in the presence of their symbiotic bacteria. **Soumis à Plant and Soil (Chapitre III).**

- **Soussou S.**, Banni M., Serra-Wittling C., Brunel B., Mauré L., Boussetta H., Cleyet-Marel J.C. 2012. Tolérance de la luzerne *Medicago orbicularis* à la contamination métallique et influence des bactéries symbiotiques isolées de l'ancien site minier de Fej El Hdoum. **Journal de l'Association Africaine de Microbiologie et d'Hygiène Alimentaire 24(24) : 8-14 (une partie du chapitre V), Annexe 1.**

- **Soussou S.**, Maynaud G., Brunel B., Serra-Wittling C., Mauré L., Boussetta H., Cleyet-Marel J.C. Phenotypic and genotypic diversity of symbiotic nitrogen-fixing bacteria associated with legumes metallicolous, present in Tunisia. **In preparation. (Chapitre IV).**

- Maynaud G., Willems A., **Soussou S.,** Vidal C., Mauré L., Moulin L.,Cleyet-Marel J.C., Brunel B., 2012**.** Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria. **Systematic and Applied Microbiology 35 :65-72. Annexe 2.**

- Mahieu S., **Soussou S.**, Cleyet-Marel J.C., Brunel B., Mauré L., Lefèbvre C., Escarré J. 2012. Local Adaptation of Metallicolous and Non-Metallicolous *Anthyllis vulneraria* Populations: Their Utilization in Soil Restoration. **Restoration Ecology. DOI: 10.1111/j.1526-100X.2012.00927.x. Annexe 3.**

➢ Communications scientifiques

- Cleyet-Marel J.C., Mahieu S., Frérot H., Vidal C., Escarré J., Mauré L., **Soussou S.**, CollinC. , Brahic P., Brunel B. : Réhabilitation des milieux fortement dégradés en milieu méditerranéen : valorisation du potentiel des associations symbiotiques plantes-microorganismes en ingénierie écologique. **Association Marocaine de Biotechnologie Microbienne et de Protection des Ressources Naturelles, Marrakech (2-5 novembre 2009). Communication orale**

- **Soussou S.,** Brunel B., Escarré J., Lebrun M., Boussetta H. et Cleyet-Marel J.C. : Absorption des métaux par des légumineuses métallicoles et analyse de la diversité des bactéries symbiotiques qui leur sont associées dans les anciennes mines du Nord de la Tunisie. **Printemps de Baillarguet à Montpellier : (27-28 mai 2010). Communication orale**

- **Soussou S.,** Brunel B., Escarré J., Lebrun M., Boussetta H. et Cleyet-Marel J.C. : Absorption des métaux par des légumineuses métallicoles et analyse de la diversité des bactéries symbiotiques qui leur sont associées dans les anciennes mines du Nord de la Tunisie. **Journées de SPE (Santé des Plantes et Environnement) à Sophia Antipolis (22-25 juin 2010). Poster**

- **Soussou S.,** Maynaud G., Brunel B., Mahieu S., Vidal C., Escarré J., Lebrun M., Mauré L., Banni M., Boussetta H. et Cleyet-Marel J.C. : Adaptation de la symbiose légumineuses-bactéries symbiotiques à de fortes teneurs en métaux pour l'aménagement de sites miniers. **Congrés AFEM (5ème colloque de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne) à Hammemet (14-16 novembre 2011). Communication orale**

- **Soussou S.,** Brunel B., Mahieu S., Escarré J., Lebrun M., Mauré L., Banni M., Boussetta H. et Cleyet-Marel J.C. : Influence of *Mesorhizobium* sp. on zinc accumulation in four subspecies of *Anthyllis vulneraria*. **Congrès Plantes-Bactéries à Aussois (30 janvier-3 février 2012). Communication orale**

- **Soussou S.,** Brunel B., Mahieu S., Vidal C., Escarré J., Lebrun M., Mauré L., Banni M., Boussetta H. et Cleyet-marel J.C. : Adaptation de la symbiose légumineuses-bactéries symbiotiques à de fortes teneurs en métaux pour l'aménagement de sites minier symbiotiques à de fortes teneurs en métaux pour l'aménagement de sites miniers. **Journées du réseau "environnements miniers méditerranéens" à Montpellier (14-16 mai 2012). Communication orale**

- **Soussou S.**, Mahieu S., Brunel B., Escarré J., Lebrun M., Banni M., Boussetta H., Cleyet-Marel J.C. Symbiosis with *Mesorhizobium* sp. affects Zn accumulation patterns among four *Anthyllis vulneraria* subspecies. **Congrès ISME (14th International Symposium on Microbial Ecology) à Copenhague, Danemark (19-24 août 2012). Poster**

- Huguet S., **Soussou S.**, Cleyet-Marel J.C., Trcera N., Isaure M.P. Rhizostabilzation of a mine tailing higly contaminated: Previous study of Cd localization and speciation in *Anthyllis vulneraria*. **Congrès ICHMET (16th International Conference on Heavy Metals in the Environment) à Rôme, Italie : (22-27 septembre 2012). Poster**

Liste des abréviations

A. arenaria	*Armeria arenaria*
A. halleri	*Arabidopsis halleri*
A. v.	*Anthyllis vulneraria*
A. vulneraria	*Anthyllis vulneraria*
ADEME	Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie
ADN	Acide Désoxyribo-Nucléique
ADNr	Acide Désoxyribo-Nucléique Ribosomal
Ag	argent
Al	aluminium
ANR	Agence nationale de la recherche
APCA	Assemblée Permanente des Chambres d'Agriculture
ARN	Acide RiboNucléique
As	arsenic
ATP	Adénosine-TriPhosphate
Au	or
B	bore
C	carbone
Ca	calcium
Cd	cadmium
CDF	Cation Diffusion Facilitator
CEC	capacité d'échange cationique
Cl	chlore
cm	centimètre
CMI	concentration minimale inhibitrice
Co	cobalt
Cr	chrome

Cu	cuivre
°C	degré Celsius
DF	Degré de liberté
dNTPs	desoxyriboNucleotides TriPhosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Collection allemande de microorganismes et de cultures cellulaires)
DTPA	Acide Diéthylène Triamine Penta acétique
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétraacétique
EEC	Commission Européenne-Environnement
ETMs	éléments-traces métalliques
F. arvernensis	*Festuca arvernensis*
Fe	fer
FNs	Facteurs Nod
FRD	Ferric Reductase Defective
g	gramme
GTR	General Time Reversible model
h	heure
H	hydrogène
H. coronarium	*Hedysarum coronarium*
ha	hectare
Hg	mercure
HMA	Heavy Metal ATPase
HME-RND	Heavy Metal Efflux Resistance Nodulation and cell-Division
IRT	Iron-Responsive Transporter
K	potassium
kg	kilogramme
km	kilometer
m	mètre
M	Molaire
M. metallidurans	*Mesorhizobium metallidurans*
M. orbicularis	*Medicago orbicularis*

Mg	magnésium
mg	milli-gramme
MHX	Mg^{2+} and Zn^{2+}/H^{+} exchanger
min	minute
MIT	Metal inorganic transport
ml	milli-litre
mm	milli-mètre
mM	milli-Molaire
µ	micron
µg	micro-gramme
µl	micro-litre
µm	micro-mètre
µM	micro-Molaire
Mn	manganèse
MO	matière organique
Mo	molybdène
mol	mole
MT	métallothionéines
N	azote
N	normalité
N. caerulescens	*Nocceae caerulescens*
n.s.	non significatif
N_2	diazote
Na	sodium
NFU	Nouvelles Fonctions Urbaines
ng	nano-gramme
Ni	nickel
Nod	nodulation
O	oxygène
OD	Densité Optique
P	phosphore
Pb	plomb

PCR	Polymerase Chain Reaction
PGPR	Plant Growth-Promoting Rhizobacteria
pH	potentiel d'Hhdrogène
R.	*Rhizobium*
RNase	Ribonuclease
RND	Resistance Nodulation celle Division
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	rotation par minute
S	soufre
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Se	sélénium
smt	metallothionine locus
sp.	espèce
SPAD	Soil-Plant Analyses Development
spp.	sous-espèce
Sr	strontium
SSC	Saline Sodium Citrate
t	tonne
T°	température
U	Unité
UE	Union Européenne
UFC	Unité Formant une Colonie
YEM	Yeast Extract Mannitol
YSL	yellow-stripe 1-like
ZIP	**Z**inc-regulated transporter **I**ron-regulated transporter **P**roteins
Zn	zinc
ZNT	Zn-Cd transport DNAc (ADN complémentaire)
[Zn]	concentration de zinc

Liste des figures

Figure 1 : Relations dose-réponse entre les éléments essentiels (A) et non essentiels (B) chez les plantes et les mammifères y compris l'Homme. 34

Figure 2 : Les différentes stratégies adoptées par les plantes en réponse à une contrainte métallique présente dans le sol. 41

Figure 3 : Schéma représentant le transport du Zn dans les racines de *Noccaea caerulescens*. 45

Figure 4 : Utilisation des plantes hyperaccumulatrices pour la phytoextraction. 47

Figure 5 : Réhabilitation des sols pollués par phytostabilisation. 49

Figure 6 : Exemple de phytostabilisation avec un couvert végétal de *Festuca arvernensis* métallicole (Les Avinières : ancienne mine de Zn). 50

Figure 7 : Echanges de signaux lors de la mise en place de symbiose rhizobium/légumineuse. 53

Figure 8 : Différents stades de développement des nodosités de type indéterminé (en haut du schéma) et déterminé (en bas). 54

Figure 9 : Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S α-, β et γ-protéobacteries. 56

Figure 10 : Mécanismes de résistance au zinc chez les bactéries. 63

Figure 11 : Principales familles de protéines impliquées dans le métabolisme du cadmium chez les bactéries. 65

Figure 12 : Végétation d'*Armeria arenaria* et de *Festuca arvernensis* cultivée en présence ou non d'*Anthyllis vulneraria* sous-espèce *carpatica* en première séquence de végétation. 67

Figure 13 : *Anthyllis vulneraria* (Les Avinières à St Laurent le Minier). 70

Figure 14 : Répartition des différentes sous-espèces d'*Anthyllis vulneraria* utilisées dans notre étude. 71

Figure 15 : Mine des Avinières (43°55'58.55" N et 3° 39'59.10" E). 72

Figure 16 : Mine d'Eylie (42°49'58.19" N et 0° 56'13.84" E). 73

Figure 17 : Disposition de l'expérimentation lors de la culture des plants d'*Anthyllis* en serre. 75

Figure 18 : Disposition de l'expérimentation pour la culture des plantes d'*Anthyllis* dans la chambre de culture lors de l'exposition au zinc. 76

Figure 19 : Localisation des quatre anciens sites miniers prospectés au nord de la Tunisie. . 78

Figure 20 : Photo de la mine de Fej El Hdoum (9° 06' 12.70" E 36° 22' 44.56" N). 79

Figure 21 : *Hedysarum coronarium* observée sur le site minier de Fej El Hdoum. 80

Figure 22 : *Hedysarum coronarium* en fleur et avec des gousses en formation. 81

Figure 23 : Exemple de transect réalisé sur chaque ancien site minier pour le prélèvement des échantillons de sols..... 82

Figure 24 : Disposition des plantes sous ombrière au moment de la floraison. 83

Figure 25 : Nodosités présentes sur les racines d'*Hedysarum coronarium* prélevée sur le site de Fej El Hdoum. 84

Figure 26 : Nodosités observées sur les racines de plants de *Medicago* sp. prélevés sur le site de Fej El Hdoum (Tunisie). 85

Figure 27 : Biomasse aérienne (en gramme par plante (a) et biomasse racinaire (b) des quatre sous-espèces d'*A. vulneraria* (*A. vulneraria* sous-espèce *carpatica*, *boscii*, *praepropera* et *vulneraria*) alimentées en azote avec3 mM KNO_3 dans la solution nutritive hydroponique et exposées à trois concentrations de zinc (0, 250 et 1000 µM). 99

Figure 28 : Biomasse aérienne (a) et racinaire (b) des quatre sous-espèces d'*A. vulneraria* (*A. vulneraria* sous-espèces *carpatica*, *boscii*, *praepropera* et *vulneraria*) inoculées avec les bactéries symbiotiques STM2683 et STM2682 dans une solution nutritive hydroponique avec les trois concentrations de zinc (0, 250 et 1000 µM). 100

Figure 29 : Biomasse des nodosités des quatre sous-espèces d'*A. vulneraria* (*A.v.* sous-espèce *carpatica*, *A.v.* sous-espèce *boscii*, *A.v.* sous-espèce *praepropera* et *A.v.* sous-espèce *vulneraria*) inoculées avec les bactéries symbiotiques STM2683 ou STM2682. 102

Figure 30 : Mesures de fluorescence des feuilles chez les quatre sous-espèces (*A. vulneraria carpatica*, *boscii*, *praepropera* et *vulneraria*) alimentées avec 3 mM de KNO_3 ou inoculées avec des bactéries symbiotiques et exposées à trois concentrations de zinc (0, 250 et 1000 µM). 104

Figure 31 : Aspects des différentes sous-espèces d'*Anthyllis vulneraria* cultivées en hydroponie avec une solution nutritive contenant 1000 Zn µM. Chaque espèce a été cultivée en présence de 3 mM de KNO_3 ou inoculée soit avec la souche STM2683, soit avec la souche STM2682. 104

Figure 32 : Concentration en zinc dans les parties aériennes (a) et racinaires (b) des sous-espèces *carpatica*, *boscii*, *praepropera* et *vulneraria* alimentées en azote avec 3 mM de KNO_3 dans la solution nutritive hydroponique et exposées à trois concentrations de zinc (0, 250 et 1000 µM). 106

Figure 33 : Concentrations en zinc dans les parties aériennes (a) et racinaires (b) chez les sous-espèces *carpatica*, *boscii*, *praepropera* et *vulneraria* inoculées avec les bactéries symbiotiques ou alimentées avec 3mm KNO_3 dans une solution nutritive hydroponique et exposées à trois concentrations de zinc (0, 250 et 1000 µM). 107

Figure 34 : Concentrations en Zn dans les nodosités chez les sous-espèces *carpatica*, *boscii*, *praepropera* et *vulneraria* inoculées avec des souches bactériennes symbiotiques STM2683 ou STM2682 exposées à trois concentrations de Zn : 0, 250 et 1000 µM. 108

Figure 35 : Arbre phylogénétique des séquences partielles du gène *rec*A (459 nucléotides) construit par la méthode du maximum de vraisemblance selon le modèle GTR. 122

Figure 36 : Arbre phylogénétique du gène *rec*A construit par la méthode du maximum de vraisemblance selon le modèle GTR. 123

Figure 37 : Arbre phylogénétique du gène *atp*D construit par la méthode de maximum de vraisemblance selon le modèle GTR. 125

Figure 38 : Arbre phylogénétique des séquences partielles de l'ADN ribosomal 16S (1433 pb) construit avec les souches isolées de nodosités d'*H. coronarium* présente sur les sites de Fej el Hdoum et El Krib. 128

Figure 39 : Arbre phylogénétique des séquences partielles de l'ADN ribosomal 16S (1238 pb) construit avec les souches isolées de nodosités d'*H. coronarium* présente sur les sites de Fej el Hdoum, El Krib et les souches types de *Rhizobium*. 129

Figure 40 : Biomasse aérienne et racinaire et biomasse des nodosités des plantes d'*Hedysarum coronarium* inoculées avec les représentants des groupes *rec*A en les comparant avec des témoins non inoculées. 131

Figure 41 : Mesures de fluorescence de type SAPD au niveau des feuilles des plantes d'*Hedysarum coronarium* inoculées avec les représentants des différents groupes *rec*A en les comparant avec des plantes témoins non inoculées. 131

Figure 42 : Photographies montrant l'effet de la souche STM9067 sur la croissance des parties aériennes et racinaires de *M. orbicularis*. 132

Figure 43 : Longueur des parties aériennes (à gauche) et racinaires (à droite) des plantes de *Medicago orbicularis* inoculées avec la souche STM9067 et comparées aux plantes témoins non inoculées. 132

Figure 44 : Biomasse aérienne et racinaire des plantes de *Medicago orbicularis* inoculées avec la souche STM9067 et comparées aux plantes témoins non inoculées. 133

Figure 45 : Biomasse des parties aériennes en g par plante (a) et racinaires (b) d'*Anthyllis vulneraria* sous-espèce *carpatica* cultivée sur trois types de substrats (Avinières, Fej El Hdoum et Col du Vent) alimentée en azote avec 3 mM de KNO_3 ou inoculée avec la bactérie symbiotique STM2683. 143

Figure 46 : Biomasse des parties aériennes en g par plante (a) et racinaires (b) d'*Hedysarum coronarium* cultivée sur trois types de substrats (Avinières, Fej El Hdoum et Col du Vent), alimentée en azote avec 3 mM de KNO_3 ou inoculée avec la bactérie symbiotique STM9069. 144

Figure 47 : Biomasse des parties aériennes en g par plante (a) et racinaires (b) de *Medicago orbicularis* cultivée sur trois types de substrats (Avinières, Fej El Hdoum et Col du Vent), alimentée en azote avec 3 mM de KNO_3 ou inoculée avec un inoculum associant trois souches. 145

Figure 48 : Biomasse de nodosités d'*A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* (a), d'*H. coronarium* (b) et de *M. orbicularis* (c) inoculées avec les bactéries symbiotiques dans les substrats des Avinières et de Fej El Hdoum. 146

Figure 49 : Mesures de fluorescence des feuilles d'*A.v.* sous-espèce *carpatica* (a), d'*H. coronarium* (b) et de *M. orbicularis* (c) cultivées sur trois types de substrats (Avinières, Fej El Hdoum et Col du Vent) soit en présence de 3 mM KNO_3 ou inoculée avec des souches symbiotiques.……..148

Liste des tableaux

Tableau 1 : Valeurs seuils en ETMs pour les sols (France et UE). 39

Tableau 2 : Nombre de récoltes annuelles nécessaires pour éliminer la moitié de la charge métallique de sols contaminés en cultivant *Noccaea caerulescens* produisant une biomasse de 5,2 t / ha et contenant 1,16% de matière sèche de zinc et 0,16% de cadmium. 48

Tableau 3 : Les rhizobium : famille, genre et nombre d'espèces décrites. 57

Tableau 4 : Caractéristiques physico-chimiques des sols étudiés. 74

Tableau 5 : Amorces utilisées pour l'amplification des gènes *recA*, *atpD*, de l'ARNr 16S, *nodA* et *nodC* chez les *Rhizobium.* 88

Tableau 6 : Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de sol prélevés du site de Fej El Hdoum, des Avinières et de Col du Vent. 93

Tableau 7 : Concentration en métaux totaux et après extraction à l'EDTA et le DTPA dans les échantillons du site de Fej El Hdoum, des Avinières et de Col du Vent. 93

Tableau 8 : Analyse de l'ANOVA des concentrations de zinc et des bactéries symbiotiques sur la biomasse aérienne et racinaire, la biomasse des nodosités, la fluorescence des feuilles (SPAD) et la teneur en zinc chez les quatre sous-espèces d'*Anthyllis vulneraria*..... 101

Tableau 9 : Caractéristiques physico-chimiques des échantillons du sol prélevés du site de Fej el Hdoum et de la parcelle agricole. 117

Tableau 10 : Concentrations en métaux totaux et en métaux mesurés après extraction à l'EDTA ou au DTPA dans les échantillons du site de Fej El Hdoum et de la parcelle agricole. 118

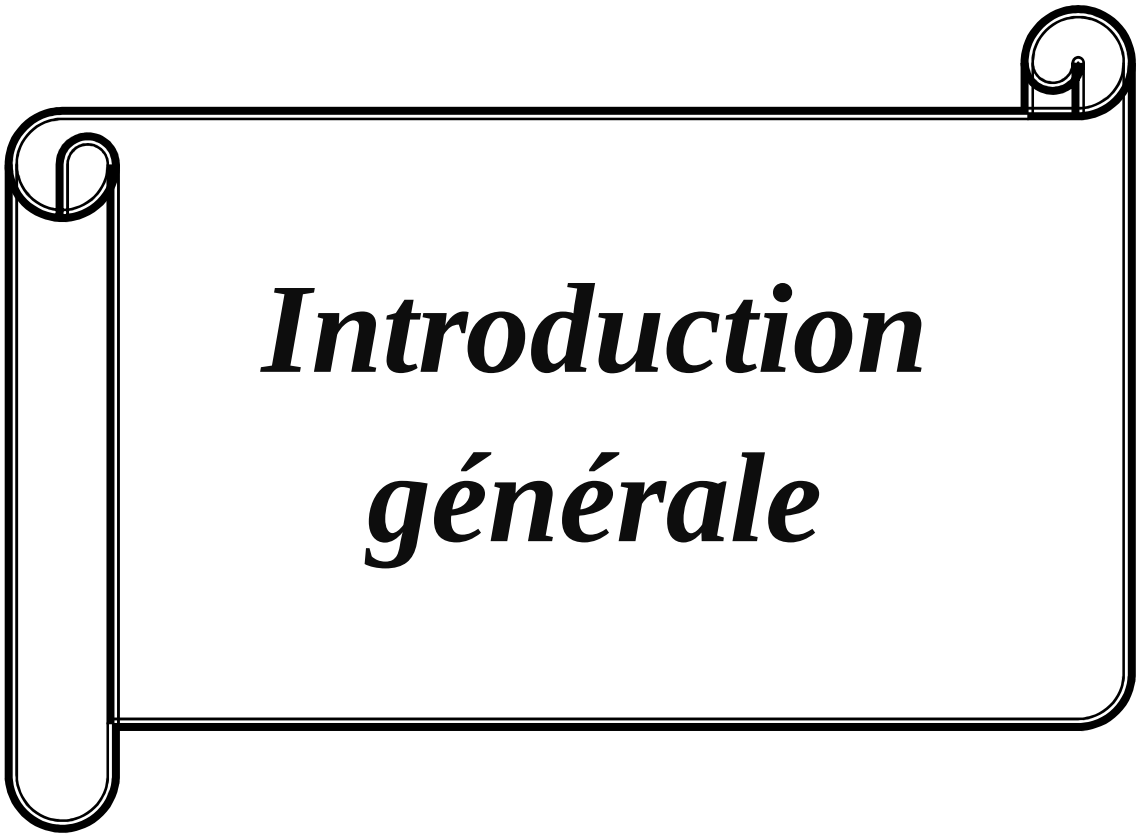
Tableau 11 : Liste des souches d'*Hedysarum coronarium* utilisées pour les études phylogénétiques et caractérisation moléculaire des souches basées sur les séquences partielles des gènes *rec*A , *atp*D, et de séquences d'ADNr 16S. 120

Tableau 12 : Pourcentage de similarité entre les séquences étudiées pour les gènes de l'ARNr 16S, *rec*A et *atp*D et celles de la souche de référence : *R. sullae* ($IS123^T$). 127

Tableau 13 : Pourcentage de similarité entre les séquences partielles des souches types de *R. gallicum, R. loessense* et *R. yanglingense* pour les gènes de l'ARNr 16S, *rec*A et *atp*D et *R. mongolense* (USDA1844^{T})..... 127

Tableau 14 : Résistance au Cd de différents isolats de *Rhizobium.* L'OD_{600nm} a été mesurée après deux semaines de croissance dans le milieu YEM (trois répétitions pour chaque souche de rhizobium testée). 134

Tableau 15 : Valeurs d'hybridation ADN-ADN entre deux souches isolées à partir de nodosités d'*Hedysarum coronarium*, et des souches types de *R. sullae* et *R mongolensis*.... 135



Introduction générale

Introduction générale

1. Contexte général et problématiques

L'exploitation du plomb et du cuivre à l'époque gréco-romaine avait déjà pollué l'atmosphère de l'hémisphère nord près de deux mille ans avant la révolution industrielle. La présence de métaux a en effet été mise en évidence dans les glaces du Groenland et leur étude a révélé que la pollution atmosphérique liée à ces métaux et à l'utilisation de techniques très polluantes était 10 fois supérieure à celle connue après la révolution industrielle (Hong *et al.*, 1996). Cette dernière a certes permis une diminution de la pollution atmosphérique mais l'intensification de l'exploitation des gisements, grâce à l'amélioration des techniques d'extraction et de traitement, a entraîné une forte accumulation de déblais miniers et de stériles extrêmement toxiques. De plus, beaucoup de sites miniers sont situés dans des lieux soumis à de fortes contraintes topographiques et climatiques, et l'érosion hydrique et éolienne de ces sites génère une forte dispersion des déchets et induit une pollution des eaux et des sols situés en aval. De ce fait, en l'absence d'une gestion rigoureuse des anciens sites miniers, ces derniers sont une source de nuisance importante, conduisant à de graves dégâts écologiques en raison des effets toxiques des métaux. Leur accumulation tout au long de la chaîne alimentaire génère des problèmes importants pour la végétation, la santé animale et humaine (Dary *et al.*, 2010; do Nascimento et Xing, 2006).

Les fortes teneurs en éléments traces métalliques (ETMs) présents dans les déblais miniers sont potentiellement toxiques et provoquent généralement une très forte réduction de la diversité végétale et microbienne. Cependant, certaines espèces végétales, selon les caractéristiques physico-chimiques des sols, la nature des métaux, leur concentration et leur spéciation ont développé des mécanismes particuliers et se sont adaptées à la présence des ETMs. Certaines plantes nommées « excluantes » parviennent à éviter l'absorption excessive et la translocation vers les parties aériennes des ETMs présents dans le sol (Rascio et Navari-

Izzo, 2011; Ross et Kaye, 1994, Shen *et al.*, 1997; Verbruggen *et al.*, 2009). D'autres plantes appelées «accumulatrices» ont acquis la capacité d'absorber et d'accumuler des quantités élevées d'ETMs dans leurs tissus (Ross et Kaye, 1994). Un niveau extrême d'accumulation chez certaines espèces végétales a conduit à définir le terme de plantes « hyperaccumulatrices ». Ces plantes peuvent accumuler dans les parties aériennes une concentration qui dépasse 100 $mg.kg^{-1}$ Cd, 1000 $mg.kg^{-1}$ Ni, Pb et Cu, ou 10 000 mg Zn $mg.kg^{-1}$ de masse sèche sans montrer des symptômes de phytotoxicité (Dahmani-Muller *et al.*, 2000; Rascio et Navari-Izzo, 2011; Van der Ent *et al.*, 2013; Verbruggen *et al.*, 2009).

Ainsi, dans la famille des Brassicacées, *Noccaea caerulescens* (anciennement *Thlaspi caerulescens*), *Arabidopsis halleri* et *Alyssum bertolonii* ont la capacité d'hyperaccumuler plusieurs métaux lourds (Zn, Cd, Ni…) et elles sont devenues des modèles d'études (Assunçao *et al.*, 2003; Bert *et al.*, 2002; Escarré *et al.*, 2000; Frérot *et al.*, 2010; Galardi *et al.*, 2007; Milner et Kochian, 2008) en raison de leur intérêt pour des recherches à caractère fondamental et leur utilisation potentielle dans la phytoremédiation (Bert *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2000).

A partir des deux types d'adaptation développés par les plantes à de fortes concentrations en ETMs dans les sols ou dans les déblais miniers, deux stratégies ont été développées pour remédier les sols et contrôler les flux d'ETMs dans l'environnement : la phytoextraction et la phytostabilisation.

La phytoextraction utilise principalement des plantes hyperaccumulatrices pour extraire du sol les ETMs et les exporter avec les parties aériennes. L'intérêt de la phytoextraction reste cependant assez limité car les plantes hyperaccumulatrices ont souvent une croissance lente et développent une faible production de biomasse (Ensley, 2000 ; McGrath et Zhao, 2003; Robinson *et al.*, 1998). De plus, les contaminations en ETMs sont souvent polymétalliques et une plante hyperaccumulatrice de zinc et cadmium ne permettra pas d'éliminer le plomb.

La phytostablisation repose sur l'installation d'une couverture végétale homogène et pérenne et présente l'avantage de limiter la dispersion des ETMs dans les différents compartiments de l'environnement en protégeant les sols de l'érosion éolienne et hydrique (Escarré *et al.*, 2010; Salt *et al.*, 1995; Vara Prasad et Freitas, 2003). Les plantes utilisées participent à l'activation biologique du sol et impliquent notamment des microorganismes rhizosphériques dont les symbioses mycorhiziennes et fixatrices d'azote. Le complexe plante-microorganismes a également la capacité d'immobiliser les ETMs en libérant au niveau des systèmes racinaires des molécules organiques aux propriétés complexantes. Toutefois, pour mettre en œuvre une opération de phytostabilisation, il est nécessaire de tenir compte des

faibles niveaux de matière organique et de la carence en azote des déblais miniers (Kidd *et al.*, 2009). Dans ce contexte, les plantes de la famille des Fabacées présentent un réel intérêt. Les Fabacées sont capables de s'associer avec des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote du sol (rhizobia), elles peuvent croître sur des substrats pauvres en matière organique et en azote minéral et leur présence sur des sols fortement pollués est de nature à faciliter l'installation ultérieure et la croissance d'autres espèces végétales (Frérot *et al.*, 2006; Vitousek et Field, 1999). Actuellement, encore peu de légumineuses capables de se développer en présence de fortes teneurs en métaux dans le sol ont été identifiées (Frérot *et al.*, 2006; Mahieu *et al.*, 2011; Rother *et al.*, 1982). Frérot *et al.* (2006) ont notamment démontré qu'*Anthyllis vulneraria*, une Fabacée présente spontanément sur l'ancien site minier des Avinières (Saint Laurent le minier, France), grâce à sa tolérance aux métaux et à sa capacité à fixer l'azote peut constituer une première séquence de végétation en favorisant l'installation d'autres espèces de plantes sur des déblais miniers à fortes teneurs en zinc et en plomb. Pour se développer dans des déblais miniers à forte teneur en ETMs, *A. vulneraria*, doit être associée à un partenaire symbiotique, la bactérie *Mesorhizobium metallidurans*, qui est lui-même très adapté à de fortes teneurs en zinc et cadmium (Vidal *et al.*, 2009). Les mécanismes d'adaptation de cette plante aux ETMs n'ont pas encore été étudiés et on ne sait pas si elle est «excluante», «indicatrice», «accumulatrice» ou «hyperaccumulatrice» de métaux. Son comportement vis-à-vis du zinc ainsi que l'influence de l'association symbiotique entre *A. vulneraria* et *M. metallidurans* sur les modalités d'accumulation de ce métal dans la plante restent à préciser.

Une ligne directrice générale pour la restauration écologique est d'utiliser des espèces locales (McKay *et al.*, 2005), car elles sont supposées être adaptées aux conditions locales (Bischoff *et al.*, 2008; Leimu et Fischer, 2008). Toutefois, seules quelques espèces tolérantes sont capables de coloniser ces sites (Antonovics *et al.*, 1971). La présence d'une communauté très variée de légumineuses sur un site fortement pollué reste très rare et il est donc important de rechercher des espèces végétales appartenant à la famille des Fabacées sur des sites miniers variés.

2. Objectifs de thèse

Les trois objectifs majeurs de cette thèse sont :

(i) L'étude de l'absorption et de l'accumulation du zinc chez *Anthyllis vulneraria*.

Anthyllis vulneraria présente la particularité de s'associer à une bactérie symbiotique, appartenant au genre *Mesorhizobium,* qui est capable de transformer l'azote atmosphérique en ammonium assimilable par le partenaire végétal. Afin de comprendre ce qui caractérise l'adaptation de la légumineuse aux métaux, nous analyserons l'absorption et l'accumulation du zinc chez deux sous-espèces métallicoles d'*Anthyllis* et deux autres sous-espèces non métallicoles. L'effet du mode de nutrition azotée, sera abordé en cultivant la plante soit seule en présence d'azote minéral (assimilation d'azote minéral), soit en présence d'une souche de *Mesorhizobium* sans apport d'azote minéral et on induira la nodulation des plantes en les inoculant avec une souche de *Mesorhizobium* tolérante ou bien une souche non tolérante au zinc.

(ii) L'analyse de la diversité des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote associées aux légumineuses présentes dans l'ancienne mine de Fej El Hdoum (nord de la Tunisie).

Afin de mettre en place une démarche de phytostabilisation sur des anciens sites miniers tunisiens contenant des teneurs élevées en Zn-Pb-Cd, il est nécessaire d'identifier des légumineuses métallicoles capables de s'y développer. Les bactéries symbiotiques des légumineuses identifiées seront isolées et caractérisées afin d'en avoir la maîtrise et pouvoir bénéficier d'une entrée biologique d'azote qui stimulera l'installation d'une couverture végétale sur des milieux contenant du Zn-Pb-Cd en Afrique du Nord.

(iii) L'étude de l'adaptation locale réciproque d'*Anthyllis vulneraria* et d'*Hedysarum coronarium* à la contamination métallique du sol et l'influence de leurs bactéries symbiotiques.

Sur l'ancien site minier des Avinières, *A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* pousse naturellement et on la retrouve en association avec sa bactérie symbiotique *M. metallidurans* sans montrer de symptômes de toxicité. Au nord de la Tunisie, deux légumineuses, *H. coronarium (Sulla coronaria) et Medicago orbicularis* poussant sur l'ancienne mine de Fej El Hdoum, ont pu être identifiées. Une « transplantation réciproque » de ces légumineuses a été réalisée afin d'évaluer le niveau d'adaptation de chacune des plantes sur les substrats miniers.

3. Plan de la thèse

Afin d'atteindre ces objectifs, le manuscrit de la thèse est organisé de la manière suivante :

- **Un premier chapitre** est consacré à une synthèse bibliographique présentant un état de l'art concernant les caractéristiques des pollutions par les ETMs, les réactions des plantes et des microorganismes à la présence des ETMs, la résistance des bactéries aux ETMs, une présentation des connaissances générales de la symbiose entre les *Fabaceae* et les bactéries fixatrices d'azote, la résistance des bactéries aux métaux et l'influence de l'association rhizobium-légumineuse sur l'absorption des métaux par la plante hôte.

- Dans **un deuxième chapitre** « Matériel et Méthodes », les matériels biologiques, les caractéristiques des sites d'études ainsi que les différentes techniques et méthodes utilisées sont décrites.

- **Un troisième chapitre** est consacré à la présentation de l'ensemble des résultats et à une discussion relative à l'étude des mécanismes d'absorption et d'accumulation du zinc chez *Anthyllis vulneraria*.

- Dans **un quatrième chapitre** les résultats et une discussion de l'étude de la diversité phénotypique et génotypique des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote, associées à des légumineuses métallicoles présentes en Tunisie, sont décrites.

- Le **cinquième chapitre** comprend une approche de transplantation réciproque de l'adaptation d'*Anthyllis vulneraria*, d'*Hedysarum coronarium* et *de Medicago orbicularis* à la contamination métallique du sol et à l'influence des bactéries symbiotiques.

- Le **sixième chapitre** correspond à une discussion générale de l'ensemble de résultats obtenus dans mon travail de thèse et aux perspectives qui en découlent.

Chapitre I

Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

1. Caractéristiques des pollutions par les métaux

Le sol est une composante clé des écosystèmes terrestres. C'est l'habitat de nombreux organismes (Alloway, 1995) et il est indispensable en particulier à la croissance des végétaux et à la production agricole. Le sol a été et est exhaustivement utilisé par l'Homme pour les activités agricoles, le logement, les loisirs, le transport et les activités industrielles. En l'absence d'une politique de protection des sols, ce milieu se dégrade (Winding *et al.*, 2005). Cette dégradation est une problématique globale et complexe (Bai *et al.*, 2008; Gisladottir et Stocking, 2005; Salvati et Zitti, 2009) qui est devenue, aujourd'hui, très préoccupante pour tous les pays du monde (Banwart, 2011).

La dégradation des sols prend plusieurs formes dont l'épuisement des nutriments, la salinisation, l'érosion, la phytodégradation générée par le surpâturage et le déboisement pour ouvrir de nouveaux sols à l'agriculture. Toutes ces dégradations entraînent une chute de la capacité productive des sols ainsi qu'une réduction de la biodiversité (Fan *et al.*, 2012; Lahmar et Ruellan, 2007; Scherr et Yadav, 1997; Wang *et al.*, 2012b). La contamination par les produits chimiques est un autre facteur de dégradation des sols. Le rejet et l'élimination des métaux provenant des activités anthropiques sont responsables de l'augmentation des concentrations de ces contaminants dans l'environnement du sol (Fonseca *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2010). Par conséquent, l'élaboration de stratégies efficaces pour gérer la pollution par les métaux est d'une grande importance (Adhikari et Singh, 2003; Fonseca *et al.*, 2011) et nécessite une connaissance approfondie des comportements de fixation et de transport des métaux lourds également dénommés Eléments-Traces Métalliques (ETMs).

1.1. Les Eléments-Traces Métalliques

On appelle ETMs, les éléments naturellement présents dans l'environnement à l'état de traces, métaux ou certains métalloïdes, caractérisés par une masse volumique supérieure à 5 g/cm^3 (Adriano, 2001).

Les ETMs sont placés dans la catégorie des polluants de l'environnement en raison de leurs effets toxiques chez les plantes et l'homme. Ils sont classés en deux grands groupes selon leur importance sur la santé.

Les métaux essentiels : ce sont les micronutriments (Reeves et Baker, 2000) comme le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le fer (Fe), le cobalt (Co), le chrome (Cr) et le manganèse (Mn). Ces métaux sont tous potentiellement toxiques à forte concentration (Figure 1) (Raikwar *et al.*, 2008).

Les métaux non essentiels : Ils ne sont pas impliqués dans des fonctions vitales et sont potentiellement toxiques. Le cadmium (Cd), le mercure (Hg), l'aluminium (Al) et le plomb (Pb) (Baize, 2009) sont généralement présents à l'état de trace dans la biosphère, ce qui limite leur interaction avec les organismes vivants (Figure 1). Leur toxicité provient de leur capacité à circuler dans les organismes et la chaîne alimentaire en mimant le comportement de métaux essentiels (Fe, Zn…).

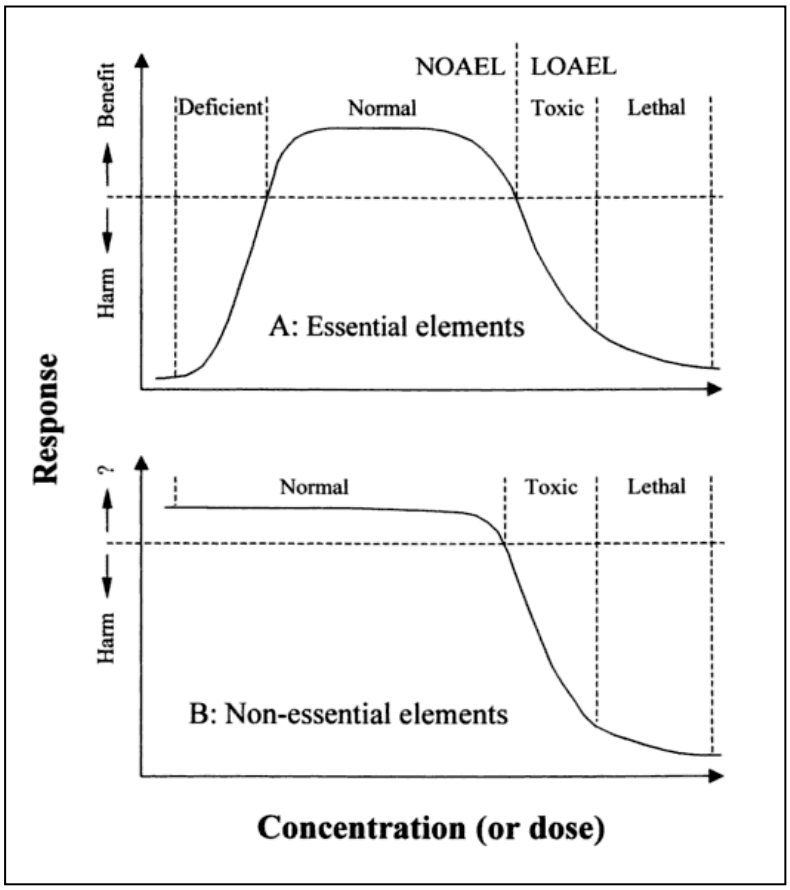


Figure 1 : Relations dose-réponse entre les éléments essentiels (A) et non essentiels (B) chez les plantes et les mammifères y compris l'Homme. Certains éléments non essentiels peuvent stimuler la croissance des plantes à de faibles concentrations dans le substrat (d'après Adriano, 2001).

NOAEL : No Observable adverse effect level
LOAEL : Low observable adverse effect level

1.2. Toxicité des métaux

La toxicité des métaux et de leurs dérivés est connue depuis très longtemps. À une concentration plus élevée que la normale, les ETMs peuvent entraîner des nuisances graves pour l'être humain, la faune, la flore et les micro-organismes.

On distingue deux types de toxicité: la toxicité **aiguë** et la toxicité **chronique** (An, 2004). La première concerne les effets nocifs provoqués par une seule exposition à une forte dose de métal lourd de caractère plutôt accidentel (de courte durée). La seconde désigne les effets nocifs dus à une exposition répétée. Dans ce dernier cas, c'est l'accumulation de petites doses dans le corps qui provoque à long terme des effets indésirables (Ross et Kaye, 1994).

1.2.1. Effet de la toxicité des métaux sur la santé humaine

En général, les humains sont exposés aux ETMs par l'ingestion (boisson ou nourriture), par inhalation (voie respiratoire) ou par voie cutanée (Martin et Griswold, 2009; Qu *et al.*, 2012). Une exposition permanente à de petites doses de métaux peut déclencher de nombreuses réactions chez l'être humain.

Plus généralement, les métaux vont s'insérer à différents niveaux de l'organisme et créer des perturbations dans le bon déroulement des processus physiologiques. Etant donné la complexité du vivant et la multiplicité des cofacteurs associés, les conséquences seront très variables d'un individu ou d'une espèce à l'autre.

Mon travail s'inscrivant dans le cadre des activités humaines liées à la métallurgie du zinc et du plomb, j'insisterai plus particulièrement sur les problèmes générés par leur extraction et leur mise en valeur. Le cadmium étant un métal très souvent présent dans les gisements de zinc et de plomb, il sera également pris en considération.

- **Le plomb**

Le plomb est une substance cancérigène pour l'homme. Il peut affecter tous les organes et systèmes du corps. L'exposition à long terme des adultes peut se traduire par une baisse des performances du fonctionnement du système nerveux, une faiblesse dans les doigts, les poignets ou chevilles, de légères augmentations de la pression artérielle, et l'anémie. A des niveaux élevés de plomb, de graves dommages peuvent avoir lieu dans le cerveau et les reins qui finalement, entraînent la mort. Les enfants en bas âge (0-6 ans) et les femmes enceintes sont les plus touchés. Chez les femmes enceintes, des niveaux élevés d'exposition au plomb peuvent provoquer une fausse couche (Martin et Griswold, 2009).

- **Le cadmium**

Le cadmium est cancérigène. Ses effets sont principalement localisés au niveau des reins, des os et du foie où il endommage les mécanismes de filtration. Cela entraîne l'excrétion de protéines essentielles et de sucres hors de l'organisme et provoquent d'autres dommages aux reins. Il a également un effet sur le squelette, les poumons et sur la régulation hormonale. En général, les fumeurs sont exposés à un niveau significativement plus élevé de cadmium que les non-fumeurs. Chez les femmes enceintes, une contamination au cadmium peut conduire à un avortement (Martin et Griswold, 2009 ; http://www.lenntech.fr/data-perio/cd.htm).

- **Le zinc**

L'accumulation de quantités très élevées de zinc dans le corps humain peut provoquer des problèmes de santé importants, comme des crampes d'estomac; des irritations de la peau, des vomissements, des nausées, de l'anémie. De très hauts niveaux de zinc peuvent endommager le pancréas et perturber le métabolisme des protéines et provoquer de l'artériosclérose. Une exposition au chlorure de zinc peut provoquer des désordres respiratoires (http://www.lenntech.fr/francais/data-perio/zn.htm).

1.2.2. Effet de la toxicité des métaux sur les végétaux

Chez les plantes, la phytotoxicité des métaux peut s'exprimer par des altérations de nombreux processus physiologiques au niveau cellulaire et/ou moléculaire. La dénaturation et l'inactivation des enzymes, le blocage des groupes fonctionnels de molécules métaboliquement importantes, le déplacement ou le remplacement d'éléments essentiels perturbent l'intégrité des membranes et des cellules. (Ross et Kaye, 1994 ; Rascio et Navari-Izzo, 2011). Chez les plantes supérieures, les cellules racinaires sont les premières à être exposées aux ETMs.

- **Zinc**

Une concentration excessive en zinc provoque des symptômes de toxicité chez les plantes non tolérantes. Ceci se traduit par une inhibition de l'élongation des racines et la chlorose des jeunes feuilles. Le Zn inhibe également la photosynthèse à diverses étapes, et à travers différents mécanismes (Marschner, 2008).

- **Cadmium**

En ce qui concerne la toxicité du cadmium, de nombreux symptômes se manifestent chez les plantes sensibles, telles que la réduction de la croissance des parties aériennes et plus particulièrement celle des racines, des troubles de la nutrition minérale et du métabolisme des glucides. La réduction de la biomasse par la toxicité du Cd pourrait être la conséquence directe de l'inhibition de la synthèse de la chlorophylle (Dong *et al.*, 2005).

- **Plomb**

Le plomb pénètre à l'intérieur des cellules, même en petites quantités et il produit un large éventail d'effets indésirables sur les processus physiologiques. La phytotoxicité du Pb conduit à une inhibition des activités enzymatiques, des troubles au niveau de la nutrition minérale et hydrique, un changement du statut hormonal et une altération de la perméabilité membranaire.

Le Pb peut également inhiber la germination des graines et retarder la croissance des jeunes plantes. À des concentrations très élevées, le Pb peut éventuellement provoquer la mort cellulaire (Sharma et Dubey, 2005).

1.3. Contamination des sols par les métaux

L'origine des métaux peut être très variée. Les **contaminations naturelles** résultent des éruptions volcaniques et des affleurements de roche-mère, dont l'altération entraîne la libération des éléments métalliques dans le sol (Friedland, 1990). La concentration naturelle de ces métaux varie alors selon la nature de la roche, sa localisation et son âge (Zhang *et al.*, 2009). Par exemple, dans les sols serpentiniques, dérivant de roches-mères ultramafiques, le Ni, le Cr et le Co atteignent des concentrations inhabituellement élevées et les roches calaminaires sont chargées en Pb et en Zn.

Cependant, la source majeure de contamination à une **origine anthropique**. Les principaux types de pollutions anthropiques responsables de l'augmentation des flux de métaux, sont la pollution atmosphérique (rejets urbains et industriels), la pollution liée aux activités agricoles et aux activités industrielles et minières. On distingue classiquement les contaminations diffuses (sources difficilement identifiables ou lorsque que la dissémination des polluants se fait sur de longues distances : ce type de contamination entraîne une augmentation plus faible de leur teneur comme dans le cas de sols agricoles) et les contaminations ponctuelles (concentrées sur une surface réduite et à des teneurs souvent élevées comme dans le cas d'exploitations minières).

1.3.1. Contamination des sols agricoles

La contamination des sols agricoles a diverses origines mais elle reste généralement liée aux activités humaines avec l'utilisation d'engrais comme les nitrates, les phosphates (Cd contenu dans les engrais phosphatés…) (Chaudhary *et al.*, 2011a), l'épandage d'effluents d'élevages (lisiers de porc) (Wang *et al.*, 2012c) ou agroalimentaires ou de boues de station d'épuration ainsi que de produits phytosanitaires (Cu utilisé dans la bouillie bordelaise comme antifongique… (Komarek *et al.*, 2009). Ces pratiques ont pour but d'obtenir une production quantitativement et qualitativement optimale et ils jouent un rôle majeur dans la contamination des sols (Tableau 1) mais aussi celle des eaux superficielles et souterraines (Peris *et al.*, 2007; Tu *et al.*, 2011).

L'épandage des boues d'épuration est une pratique assez répandue. Généralement, elle permet l'apport d'éléments minéraux ou de matière organique au sol (Roldan *et al.*, 1996). Elle offre la possibilité de recycler les éléments nutritifs et d'augmenter la concentration des macronutriments (tels que N, P, Ca, Mg et S) ainsi que des micronutriments pouvant avoir un effet bénéfique sur la fertilité des sols et la nutrition des plantes (Gasco et Lobo, 2007; McBride et Cherney, 2004; Wu *et al.*, 2012). Cependant, les boues peuvent contenir des quantités importantes des ETMs sous forme de sels solubles qui peuvent être toxiques pour le sol et les plantes (McBride et Cherney, 2004). Le zinc, le cadmium et le plomb sont les trois principaux métaux qui peuvent y être présents parfois à de fortes concentrations, bien que d'importantes quantités de chrome, de cuivre et de mercure puissent également être mesurées (Ross, 1994). En effet, les concentrations en métaux dans les boues d'épuration varient largement en fonction de facteurs tels que l'origine des boues (par exemple, les déchets industriels contiennent généralement des niveaux plus élevés des ETMs que les déchets ménagers) (Sánchez-Martín *et al.*, 2007). Il a été montré une accumulation de polluants dans les sols sur le long terme suite à l'épandage de boues, avec un risque concomitant de phytotoxicité ou d'accumulation dans les plantes (Wu *et al.*, 2012). Par conséquent, si les boues des stations d'épuration sont appliquées en trop grandes quantités, des matières dangereuses pourraient affecter la production végétale ainsi que les communautés microbiennes du sol et les processus essentiels au maintien de la fonction des écosystèmes (Macdonald *et al.*, 2011; Singh et Agrawal, 2007; Wu *et al.*, 2012).

En ce qui concerne les apports d'engrais, le Cd est l'un des éléments qui pose le plus de problèmes. Les engrais phosphatés sont considérés comme une source importante de contamination des terres agricoles en Cd. Les fertilisants fabriqués à partir du phosphate magmatique ont tendance à avoir des concentrations négligeables de Cd, tandis que ceux issus de phosphate sédimentaire ont tendance à présenter des niveaux élevés. Les engrais phosphatés contiennent aussi des quantités variables de Zn et autres oligo-éléments tels que le Cr et le Pb qui proviennent de la roche phosphatée (Adriano, 2001 ; Ross, 1994 ; Wuana et Okieimen, 2011).

Les pesticides, y compris les fongicides, les herbicides et les insecticides, sont largement utilisés dans les agroécosystèmes pour protéger les cultures. Depuis les années 1950, les méthodes d'agriculture intensive ont augmenté la portée et les effets de ces produits agrochimiques (Floch *et al.*, 2011), ce qui conduit à envisager la possibilité d'effets défavorables susceptibles de déprimer les rendements. Par exemple, certains pesticides

libèrent en solution des éléments, comme le Hg, le Ni et le Cu, qui ont potentiellement un effet toxique sur le sol (Jiries *et al.*, 2002), ce qui engendre une modification de leur fertilité.

L'utilisation massive des boues de stations d'épuration, d'engrais et de pesticides provoque donc un enrichissement des sols en métaux. Leur accumulation excessive dans les sols agricoles peut, non seulement entraîner la contamination de l'environnement, mais aussi augmenter l'absorption des ETMs par les cultures ce qui présente un grand risque pour la santé publique avec leur entrée dans la chaîne alimentaire (Peris *et al.*, 2007; Tu *et al.*, 2011).

Tableau 1 : Valeurs seuils en ETMs pour les sols (France et UE) (ADEME et APCA, 2005).

ETM	Valeurs seuils ($mg.kg^{-1}$)					
	Directive 86/278/EEC	Arrêté du 8 janvier 1998	Directive européenne (2000)			Normes boues NFU44041
			5<pH<6	6<pH<7	pH>7	
Cd	1 à 3	2	0,5	1	1,5	2
Cr	-	150	30	60	100	150
Cu	50 à 140	100	20	50	100	100
Hg	1 à 1,5	1	0,1	0,5	1	1
Ni	30 à 75	50	15	50	70	50
Pb	50 à 300	100	70	70	100	100
Zn	150 à 300	300	60	150	200	300

1.3.2. Les sites pollués suite aux activités minières

L'extraction de minéraux et de métaux représente une activité importante dans tous les pays industrialisés. Au cours du siècle passé, l'exploitation minière s'est essentiellement concentrée sur l'extraction des métaux comme Au, Ag, Fe, Cu, Pb, Zn, Cr, Hg,… nécessaires au développement économique et industriel des sociétés. D'autres métaux ou métalloïdes, comme l'As, le Cd et le Se sont souvent présents à d'assez fortes concentrations dans les gisements minéraux principaux et sont récupérés comme sous-produits (Rashed, 2010).

L'élimination des résidus et le transport des minerais concentrés génèrent des déchets, sources de nuisance pour l'environnement. La plupart des résidus sont laissés à l'abandon ou mal gérés, ce qui entraîne une migration des ETMs dans l'environnement avec la contamination des sols, la destruction de leur texture, la pollution des eaux souterraines et une diminution de la diversité biologique (Adriano, 2001 ; Dary *et al.*, 2010; Rashed, 2010). De ce fait, les anciens sites miniers peuvent être considérés comme étant des « **environnements extrêmes».** Les microorganismes sont parfois les seuls organismes capables de se développer dans ces milieux extrêmes, révélant l'existence de processus métaboliques exceptionnels, qui constituent d'ailleurs l'enjeu de procédés industriels (Pallen, 1999). En outre, des animaux et végétaux peuvent aussi être qualifiés d'**extrêmophiles** (Arrivault *et al.*, 2006; Waterman, 1999). Les mécanismes écologiques et physiologiques leur permettant de survivre et de se reproduire dans les milieux fortement chargés en métaux sont très spécifiques. Les **espèces métallophytes,** végétaux vivant sur les sites métallifères (comme par exemple, *Noccaea caerulescens*), constituent des modèles biologiques depuis des décennies (Antonovics *et al.*, 1971 ; Gremion *et al.*, 2004). La **tolérance** aux ETMs est un phénomène spécifique affectant certaines populations et donnant ainsi lieu à des écotypes métallicoles ou à des espèces endémiques des sites métallifères. La tolérance est un **caractère adaptatif** rare et limitant pour l'installation des espèces, si bien que les écosystèmes métallifères récents présentent une faible diversité spécifique due à une dynamique de colonisation lente (Antonovics *et al.*, 1971). Ainsi, les écosystèmes miniers présentent un intérêt majeur pour l'étude des phénomènes liés aux stratégies d'adaptation des espèces aux milieux extrêmes tant du point de vue génétique, populationnel que physiologique permettant ainsi de mettre en évidence leur fonctionnement métabolique particulier (Lefèbvre et Vernet, 1990).

2. Les plantes, les microorganismes et leurs adaptations à la présence de métaux

2.1. Adaptation des plantes aux milieux extrêmes

Les sites miniers sont des lieux potentiellement très délétères provoquant une forte réduction de la diversité végétale et microbienne. La majorité des espèces végétales, capables de tolérer des concentrations élevées en ETMs sont des plantes qui se sont adaptées à ces milieux. Les stratégies d'adaptation sont néanmoins conditionnées par la biodisponibilité du

métal, par sa concentration ainsi que par la durée de l'exposition. L'adaptation des plantes se traduit par un caractère anatomique, un processus physiologique ou un trait comportemental ayant évolué sous l'effet de la sélection naturelle parce qu'il améliorait la survie et le succès reproductif à long terme d'un organisme (Gode *et al.*, 2012). Toutefois, la sensibilité ou la tolérance des plantes envers les métaux reste variable et dépend de l'espèce végétale et du génotype. En général, les plantes peuvent être regroupées en trois catégories: excluantes, indicatrices et accumulatrices (Adriano, 2001 ; Van der Ent *et al.*, 2013) (Figure 2).

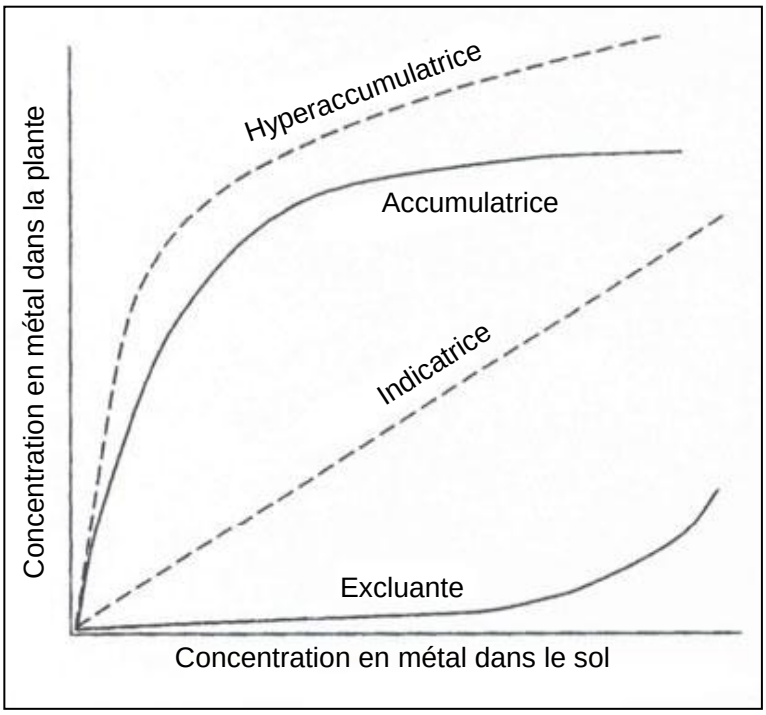


Figure 2 : Les différentes stratégies adoptées par les plantes en réponse à une contrainte métallique présente dans le sol (d'après Adriano, 2001).

Les plantes **excluantes** sont des plantes qui limitent l'absorption et la translocation des métaux vers les parties aériennes. Ces plantes ont des propriétés leur permettant de mettre en place une sorte de barrière qui limite l'absorption mais lorsque les concentrations en métaux deviennent trop élevées, cette barrière perd sa fonction probablement en raison de l'action toxique du métal et la concentration de ce dernier augmente dans la plante (Ross et Kaye, 1994 ; Prasad, 2004). Les membres de la famille des Poacées (comme *Festuca rubra*) appartiennent à ce groupe (Adriano, 2001 ; Wenzel *et al.*, 2003).

Les plantes **indicatrices** sont des plantes dont l'absorption et le transport des métaux dépendent de leur concentration dans le milieu (Ross et Kaye, 1994). Elles répondent à de fortes concentrations en métaux dans les sols par un faible contrôle de l'assimilation des métaux et des processus de transport. Ainsi, l'accumulation des métaux dans ces plantes est proportionnelle à la quantité de métaux présente dans le milieu (Figure 2). Les légumineuses à graines (le soja) et les céréales (le maïs, le blé, l'avoine) appartiennent à ce groupe (Adriano, 2001).

Les plantes **accumulatrices** ont développé d'autres stratégies de tolérance et elles peuvent activement concentrer les métaux dans leurs tissus (Ross et Kaye, 1994). Le tabac, la moutarde, la laitue et l'épinard appartiennent à cette catégorie. La famille des *Brassicaceae* est généralement considérée comme la plus performante en terme d'accumulation.

Le niveau extrême de la tolérance aux métaux dans les plantes vasculaires est dû à l'**hyperaccumulation** où l'absorption et la distribution des ETMs font intervenir des mécanismes complexes qui n'ont pas été complètement élucidés. Cette catégorie de plantes peut accumuler, dans les parties aériennes, une concentration qui dépasse 100 $mg.kg^{-1}$ de matière sèche pour le Cd, 1 000 $mg.kg^{-1}$ pour le Ni, le Pb et le Cu, ou 10 000 $mg.kg^{-1}$ dans le cas du Zn sans montrer des symptômes de phytotoxicité (Dahmani-Muller *et al.*, 2000). Le ratio parties aériennes/racines de la concentration en métaux est généralement supérieur à 1 (Reeves et Baker, 2000). Parmi les plantes hyperaccumulatrices de zinc figurent la famille des *Brassicaceae* avec les genres *Noccaea* (anciennement nommé *Thlaspi* ; 11 espèces) et *Arabidopsis* (une espèce) (Baker et Brooks, 1989). Ces deux genres ont montré également la capacité d'hyperaccumuler le cadmium (Cosio *et al.*, 2004). D'autres espèces sont également considérées comme hyperaccumulatrices en Zn telles que *Sedum alfredii Hance* (Yang *et al.*, 2006).

Noccaea caerulescens et *Arabidopsis halleri* sont devenus des plantes modèles pour l'étude de l'hyperaccumulation (Assunçao *et al.*, 2003; Frerot *et al.*, 2010) et les transporteurs de métaux. Parmi les éléments toxiques qui sont très étudiés dans le transport, l'accumulation et/ou l'hyperaccumulation, figure le zinc. Ce métal est un oligo-élément essentiel pour une vaste gamme d'enzymes et joue un rôle structurel dans de nombreuses protéines. La compréhension des mécanismes d'absorption, de transport et de stockage du Zn par les plantes est d'une grande importance pour la compréhension de certains mécanismes impliqués dans la nutrition minérale. La capacité des plantes à régler les niveaux excessifs ou déficients en Zn

dans le sol est généralement liée à leurs capacités adaptatives au milieu (Aucour *et al.*, 2011). Chez les plantes hyperaccumulatrices de Zn, la biodisponiblité du métal favorise son absorption par les racines et son chargement dans le xylème. Une fois dans les parties aériennes, l'excédent de métal peut être séquestré, par exemple, dans les vacuoles du mésophylle et de l'apoplasme (Ma *et al.*, 2005). L'hyperaccumulation et la tolérance au Zn est donc une propriété liée à plusieurs processus (Hassinen *et al.*, 2007).

2.2. Hyperaccumulation des ETMs : étude de l'absorption et du transport de Zn

Le degré d'hyperaccumulation du zinc et des autres éléments traces peut largement varier d'une espèce à une autre ou encore entre des populations et des écotypes de la même espèce végétale. Toutefois, l'hyperaccumulation a des caractéristiques bien précises qui permettent de distinguer les espèces hyperaccumulatrices des non-hyperaccumulatrices : une capacité très élevée à absorber le métal à partir du sol, une efficacité et une rapidité de translocation ainsi qu'une capacité très importante à détoxifier et à séquestrer de grandes quantités des ETMs dans les feuilles (Rascio et Navari-Izzo, 2011).

Durant la dernière décennie, d'importants progrès ont été réalisés afin de mieux comprendre les mécanismes liés à l'hyperaccumulation des métaux (Rascio et Navari-Izzo, 2011). Dans le cas du Zn, plusieurs gènes sont impliqués dans la capacité d'accumulation de cet élément et les gènes les mieux étudiés sont les transporteurs transmembranaires chez les plantes hyperaccumulatrices (Assuncao *et al.*, 2006; Hassinen *et al.*, 2007).

Des études comparatives ont révélé que l'absorption accrue du Zn au niveau des racines chez les espèces hyperaccumulatrices *N. caerulescens* et *A. halleri*, en comparaison avec les espèces non hyperaccumulatrices, peut être attribuée à la surexpression constitutive de certains gènes appartenant à la famille ZIP (**Z**inc-regulated transporter **I**ron-regulated transporter **P**roteins) et IRT-like Proteins (Iron-Responsive Transporter Proteins). Le gène ZNT1, faisant partie de cette famille, code pour des transporteurs de microéléments au niveau de la membrane plasmique (Assunção *et al.*, 2001). Chez *N. caerulescens*, le gène ZNT1 joue un rôle de médiateur pour la forte affinité dans l'absorption de Zn au niveau des racines (Pence *et al.*, 2000). Par contre, chez l'espèce non hyperaccumulatrice *N. arvense*, l'expression de ce gène est beaucoup plus faible et est stimulée lors d'une carence en Zn (Lasat *et al.*, 2000). L'accumulation de Zn dans les parties aériennes chez les plantes hyperaccumulatrices est influencée par un efflux plus important du métal des vacuoles

racinaires et une augmentation de la charge en Zn transportée dans le xylème au niveau des racines (Figure 3) ainsi qu'une stimulation de l'influx au niveau de la membrane plasmique des cellules foliaires et une séquestration dans les vacuoles des parties aériennes (Figure 3) (Milner et Kochian, 2008). Chez les plantes non accumulatrices, le zinc est séquestré dans les vacuoles des racines (Lasat *et al.*, 2000).

Les études des mécanismes de tolérance se focalisent sur le rôle de la liaison entre le métal et les polypeptides. Les complexes polypeptides-métal réduisent la concentration des ions libres cytotoxiques en métal par chélation dans le cytoplasme (Cosio *et al.*, 2004 ; Robinson, 1990).

Quelques métallophytes peuvent faire face à des fortes concentrations en zinc dans le sol. Il a été montré par (Tolrà *et al.*, 1996) que seulement une partie du Zn absorbé dans *Noccaea* a été impliquée dans des processus métaboliques et que la majeure partie du Zn était accumulée dans les vacuoles ou détoxifiée sous forme chélatée (Figure 3).

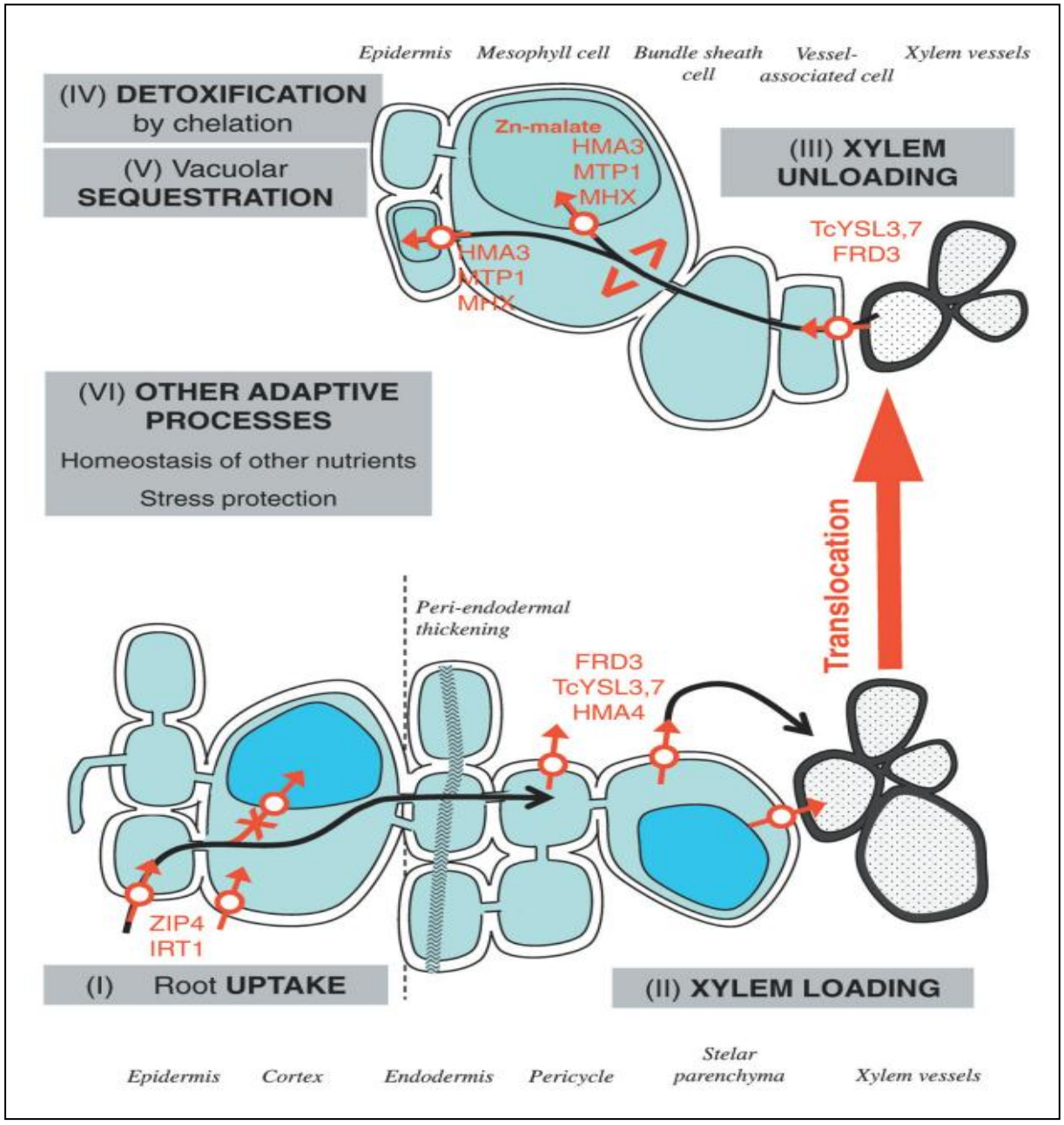


Figure 3 : Schéma représentant le transport du Zn dans les racines de *Noccaea caerulescens* (d'après Verbruggen *et al.*, 2009).

(I) Au niveau des racines, l'absorption intracellulaire de Zn est modulée par ZIP4 (Zinc-regulated transporter Iron-regulated transporter Proteins) et dans une certaine mesure, par IRT1 (ZIP family of metal transporters). (II) Chargement actif au niveau du xylème. Ceci est en relation avec une séquestration dans les vacuoles racinaires faible et une activité accrue de la HMA4 (Heavy Metal ATPase) dans la stèle (parenchyme) de la FRD3 (ferric reductase defective 3) et des protéines YSL (yellow-stripe 1-like) conduisant à un efflux efficace de Zn via le symplasme avec un chargement du métal dans le xylème. (III) Dans les feuilles, le Zn est déchargé dans les cellules des vaisseaux par l'intermédiaire des protéines YSL, et éventuellement par FRD3 dans *Arabidopsis halleri*. (IV) Désintoxication par chélation de métaux, l'histidine et la nicotianamine sont des ligands possibles de Zn dans le cytoplasme. (V) La séquestration vacuolaire dans les feuilles est la principale voie de la désintoxication des métaux. Le Zn est principalement stocké dans les vacuoles de mésophylle (*A. halleri*) et/ou dans les cellules de l'épiderme (*Nocceae caerulescens*), grâce à l'activité de MTP1 (Cation diffusion facilitator), et peut-être de HMA3 (P-type metal ATPase) et MHX (Mg^{2+} and Zn^{2+}/H^{+} exchanger). Dans les vacuoles, le malate favorise la formation des complexes Zn-malate. (VI) Autres processus adaptatifs comprennent l'homéostasie d'autres éléments nutritifs, en particulier le Fe et le P.

La résistance au métal est liée aux gènes de résistance qui sont présents dans tous les génotypes. Chez les plantes des sols métallicoles, ces gènes sont constitutivement en activité, alors que chez les plantes qui poussent sur les sols non métallicoles, les gènes de résistance au métal sont activés en présence d'une très forte concentration en métal (Linderberg et Greger, 2002).

Une bonne connaissance des bases physiologiques de la tolérance et de l'hyperaccumulation, suivie de l'identification des gènes responsables de l'homéostasie des métaux chez les plantes tolérantes et hyperaccumulatrices est nécessaire pour passer à d'éventuelles **applications biotechnologiques** dans le domaine de la bioremédiation.

2.3. Réhabilitation des écosystèmes métallifères par phytoremédiation

Ces dernières années, plusieurs études ont été réalisées afin de diminuer la pollution des sols par les ETMs.

Les méthodes physico-chimiques utilisées *in situ* et *ex situ* pour dépolluer des sites chargés en métaux présentent l'inconvénient d'être coûteuses et lourdes à mettre en œuvre (Raskin *et al.*, 1994; Salt *et al.*, 1995). De plus, elles perturbent fortement l'activité biologique des sols et altèrent leur structure physique. Dans ce contexte, la bioremédiation a émergé comme une technologie alternative et économiquement compétitive en utilisant des organismes vivants pour le confinement des matériaux contaminés et la préservation des caractéristiques du sol (Forgacs *et al.*, 2004). La capacité de certaines plantes à tolérer ou à accumuler des métaux a permis d'ouvrir de nouvelles voies de recherche pour le traitement des sols. Le terme **phytoremédiation** («phyto» signifie « plantes », et le suffixe latin "remedium" signifie « pour nettoyer ou restaurer ») désigne en fait un ensemble varié de technologies qui utilisent soit des plantes d'origine naturelle ou bien génétiquement modifiées pour nettoyer les environnements contaminés (Vara Prasad et Freitas, 2003). La principale justification pour développer des technologies de phytoremédiation (phytotechnologies) est leur potentiel de restauration à faible coût (Ensley, 2000). Les phytotechnologies s'appuient sur des traits propres aux espèces métallophytes et plusieurs stratégies peuvent être envisagées. La **rhizofiltration** implique l'utilisation de plantes accumulant les métaux dans les racines pour dépolluer des milieux aquatiques divers (Verma *et al.*, 2006) ; la **phytovolatilisation**, se base sur l'utilisation de plantes pour extraire certains métaux du sol, les transformer en éléments volatiles, puis les relâcher dans l'atmosphère par volatilisation. Cette dernière méthode n'est

pas toujours satisfaisante car en décontaminant le sol, des substances toxiques sont libérées dans l'atmosphère (Vara Prasad et Freitas, 2003). Les deux branches les plus couramment envisagées sont la phytoextraction et la phytostabilisation.

La **phytoextraction** est une méthode qui consiste à extraire les métaux du sol. Elle se base sur l'utilisation de plantes qui absorbent par les racines les ETMs dans les sols, puis les transfèrent et les accumulent dans leurs parties aériennes (Figure 4) (Ensley, 2000).

En ce qui concerne cette méthode, plusieurs études ont été réalisées pour évaluer son efficacité en mettant l'accent sur des espèces végétales accumulatrices ou hyperaccumulatrices capables de produire une biomasse élevée (Ensley, 2000). Malheureusement, la majorité des plantes hyperaccumulatrices (comme *N. caerulescens*) ont le défaut majeur de produire très peu de biomasse aérienne, de croître lentement et leur efficacité potentielle pour éliminer les ETMs d'un sol ou d'un substrat est très limitée. Les durées de dépollution s'expriment au minimum en décennies et même en siècles (Tableau 2) (Robinson *et al.*, 1998).

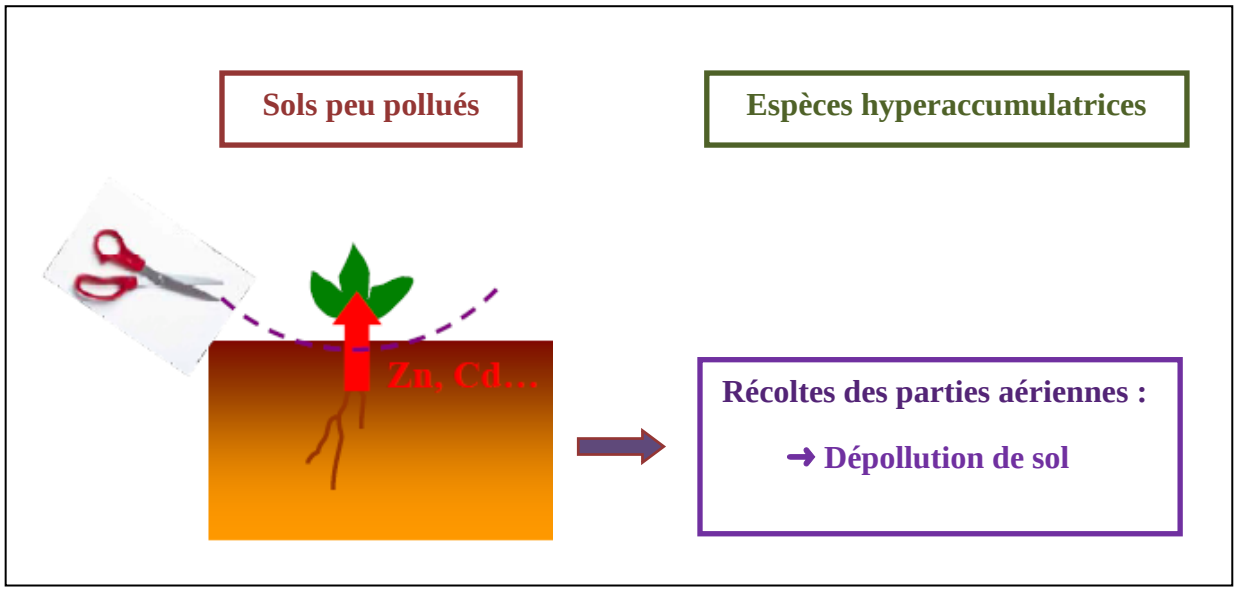


Figure 4 : Utilisation des plantes hyperaccumulatrices pour la phytoextraction (Frérot, 2004).

Tableau 2 : Nombre de récoltes annuelles nécessaires pour éliminer la moitié de la charge métallique de sols contaminés en cultivant *Noccaea caerulescens* produisant une biomasse de 5,2 t / ha et contenant 1,16% de matière sèche de zinc et 0,16% de cadmium. Le sol est supposé avoir une densité apparente de 1,3 et les racines pénétrer dans le sol sur une profondeur de 15 cm (Robinson *et al.*, 1998).

Teneur initiale de métal (µg/g)	**Quantité du métal (kg) (densité du sol : 1,3 ; enracinement : 15 cm)**	**Zinc** **Nombre de récoltes annuelles**	**Cadmium** **Nombre de récoltes annuelles**
100,000 (10%)	150,000	1625	11606
20,000 (2%)	30,000	325	2320
10,000 (1%)	15,000	163	1160
2000 (0,2%)	3000	33	231
1500 (0,15%)	2250	24	174
1000 (0,1%)	1500	16	116
500 (0,05%)	750	8,1	59
200 (0,02%)	300	3,3	23
100 (0,01%)	150	1,6	12
20 (0,002%)	30	0,33	2,3
10 (0,001%)	15	0,17	1,2
2 (0,0002%)	3	0,04	0,23

La phytoextraction reste donc une méthode potentiellement efficace pour décontaminer des sites contenant une concentration pas trop élevée en métaux mais cela reste très théorique car sur les sols peu pollués, les espèces hyperaccumulatrices sont concurrencées par toute une flore rendant la gestion de leur culture et leur récolte très coûteuse et délicate. Dans le cas des sols peu contaminés, l'utilisation de plantes simplement accumulatrices mais capables de produire des biomasses importantes est actuellement privilégiée.

Une application intéressante de la phytoextraction est l'exploitation des sols ultramafiques qui ne sont la plupart du temps pas assez concentrés en ETMs pour être exploités dans le cadre d'une exploitation minière traditionnelle mais qui peuvent l'être dans un contexte de phytomine, c'est-à-dire de récupération des métaux hyperaccumulés dans les parties récoltables des plantes (Echevarria *et al.*, 2012). Des résultats probants du point de vue

technique et économique ont été obtenus avec *Allysum murale*, plante hyperaccumulatrice de nickel qui a été exploitée dans un contexte intensif (Chaney *et al.*, 2007) ou extensif (Bani *et al.*, 2007 ; Tang *et al.*, 2012).

La **phytostabilisation** consiste à revégétaliser et stabiliser les sols pollués au moyen de plantes tolérantes aux ETMs (Hooda, 2007). Le couvert végétal ainsi formé pourrait limiter la dissémination de la pollution par érosion éolienne, ruissellement ou lessivage (Figure 6) et avoir une fonction de barrière pour limiter les échanges entre le sol et l'atmosphère ou l'eau (Figure 5). La phytostabilisation n'élimine pas les contaminants du sol, mais réduit les risques pour la santé humaine et l'environnement. Les plantes auraient en effet une action mécanique (parties aériennes et racinaires), et chimique (complexation des métaux grâce à des substances provenant des racines) (Berti et Cunningham, 2000). Dans ce contexte, l'installation d'une strate herbacée est particulièrement intéressante car elle permet d'avoir un couvert végétal continu avec un système racinaire dense qui permet un très bon ancrage des plantes et protège ainsi très bien le sol contre l'érosion hydrique et éolienne (Figure 6). La présence d'une strate arborescente est également intéressante car le lessivage et la migration verticale des ETMs sont mieux contrôlés (régulation de l'infiltration des eaux). (Hooda, 2007; Robinson *et al.*, 2009).

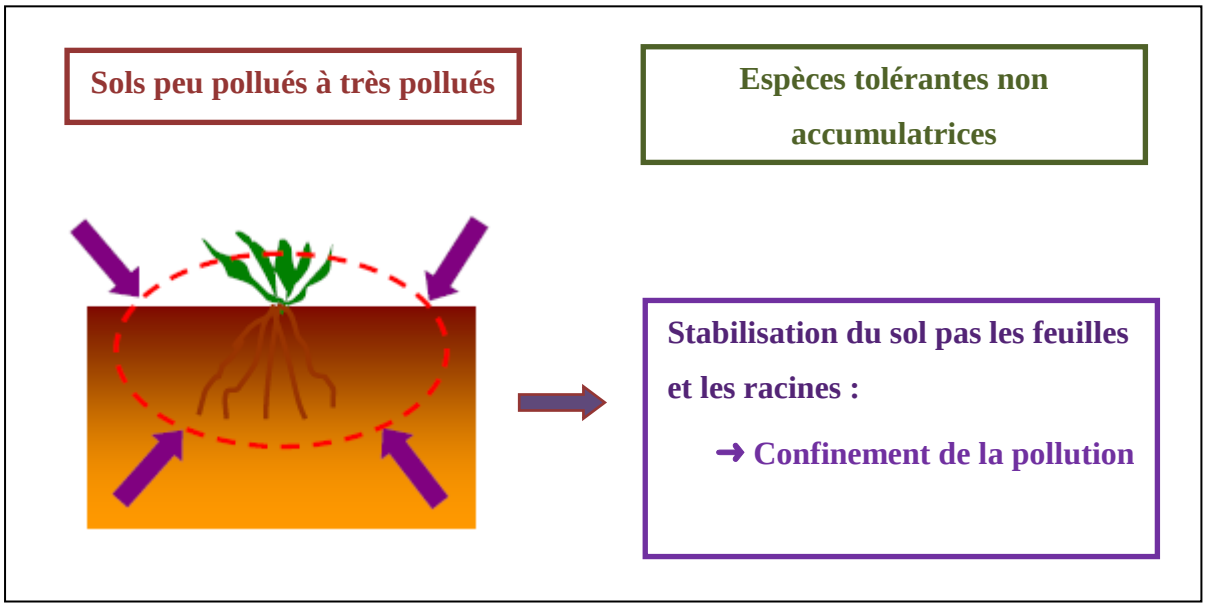


Figure 5 : Réhabilitation des sols pollués par phytostabilisation (Frérot, 2004).

Figure 6 : Exemple de phytostabilisation avec un couvert végétal de *Festuca arvernensis* métallicole (Les Avinières : ancienne mine de Zn). La présence de la plante a immobilisé les stériles miniers : Une épaisseur de 10-15 cm a été entraînée en dix ans sous l'action de l'eau et du vent en absence de couvert végétal.

Contrairement aux plantes à privilégier pour la phytoextraction, les espèces hyperaccumulatrices ne sont pas éligibles en phytostabilisation en raison de l'accumulation des ETMs dans les parties aériennes. Leur absorption potentielle par les animaux herbivores génère un risque élevé d'entrée des métaux dans la chaîne alimentaire (Dudka *et al.*, 1996).

Les sols miniers sont généralement très pauvres en matière organique et en éléments nutritifs essentiels pour la croissance des plantes. L'insertion des espèces métallophytes appartenant à la famille des *Fabaceae* dans le couvert végétal améliore naturellement la teneur en azote dans le sol grâce à leurs propriétés de fixation de l'azote de l'air par l'intermédiaire des bactéries symbiotiques de type rhizobium. Les *Fabaceae* métallophytes sont donc capables d'enrichir les sols contaminés en azote et de faciliter l'installation d'autres espèces végétales (Frérot *et al.*, 2006).

3. Association rhizobium-légumineuse

3.1. La symbiose rhizobium-légumineuse

L'azote est l'élément nutritif dont les plantes ont besoin en grande quantité. La disponibilité de cet élément est fortement limitant aussi bien dans les écosystèmes naturels que cultivés et il a une grande influence à la fois sur le rendement et la qualité du produit. Les plantes acquièrent l'azote par l'assimilation de l'azote minéral (nitrate, ammonium) et pour certaines d'entre elles en mobilisant l'azote atmosphérique par le biais de leur association avec des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote. Les plantes capables d'utiliser l'azote atmosphérique sont des *Fabaceae* qui s'associent à des bactéries classiquement et collectivement dénommées rhizobium ou des plantes à actinorhizes qui s'associent avec des bactéries appartenant au genre Frankia. La nutrition azotée des légumineuses et des plantes à actinorhizes est donc assurée par deux voies : la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique et l'absorption de l'azote minéral du sol (Stougaard, 2000).

Les légumineuses sont responsables à elles seules de près de 30% de la fixation d'azote annuelle qui comprend la fixation industrielle de N_2 par le procédé de Haber-Bosh, la fixation atmosphérique de N_2 par conversion photochimique et la fixation biologique de N_2 par les procaryotes (Cheng, 2008; Ertl, 2012; Galloway *et al.*, 2003). Le mutualisme entre les Fabacées et les rhizobium ou les plantes à actinorhizes et les Frankia, aboutit à la formation d'un organe particulier sur les racines ou les tiges, appelée nodosité. Ces nodosités représentent de véritables organes d'échanges métaboliques entre les bactéries et la plante. A l'intérieur de cet organe, les microsymbiotes transforment l'azote atmosphérique en ammonium, une forme biologique qu'elles échangent avec la plante contre des photosynthétats (substrats carbonés) (Wang *et al.*, 2012a). Ce processus biologique joue un rôle essentiel dans l'agriculture durable, car il réduit l'apport en engrais azoté exogène tout en fournissant un moyen efficace de produire des aliments riches en protéines (Hirsch *et al.*, 2001).

Les interactions légumineuses-rhizobiums se produisent dans la rhizosphère suite à la libération de molécules carbonées (sucres, acides organiques, hormones, vitamines et substances phénoliques) par exsudation, sécrétion, ou autolyse des vieilles cellules de la racine (Seneviratne et Jayasinghearachchi, 2003). Beaucoup des substances organiques libérées par les racines ont un faible poids moléculaire et sont donc facilement décomposables par les micro-organismes. Cela conduit à l'existence d'une grande communauté microbienne

autour de la racine. D'autres composés trouvés dans les exsudats racinaires exercent des pressions sélectives sur la communauté microbienne. Les (iso) flavonoïdes, les stachydrines et les acides aldoniques sont les plus importants du point de vue symbiotique et ils peuvent diffuser passivement à travers la membrane bactérienne (Begum *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2012a) pour constituer les premiers signaux de l'hôte qui déclenchent chez la bactérie l'expression du gène de régulation de la nodulation (Figure 7) (Peters et Verma, 1990). Plus de 4000 **flavonoïdes** ont été identifiés chez les plantes vasculaires et un sous-ensemble particulier est impliqué dans la médiation de la spécificité de l'hôte dans les légumineuses (Perret *et al.*, 2000). Les flavonoïdes attirent les rhizobium par chimiotactisme et induisent chez les bactéries l'expression des gènes *nod* qui permettent à leur tour la production de Facteurs Nod (FNs). Les *Bradyrhizobium* photosynthétiques associés à *Aeschynomene* constituent cependant une exception car ces bactéries ne possèdent pas de gènes de nodulation (Masson-Boivin *et al.*, 2009).

Quand les FNs sont produits, ils induisent chez la plante des modifications morphologiques, physiologiques et moléculaires complexes qui permettent la pénétration de la bactérie au sein de la plante hôte (Figure 7) (Oldroyd *et al.*, 2011).

L'infection par la bactérie symbiotique et le développement des nodosités suivent un programme morphologique bien défini (Figure 8). Les deux partenaires entrent tout d'abord en contact au niveau de la surface du poil racinaire. Ensuite, le poil racinaire se transforme en « crosse de berger » formant ainsi une micro-niche favorable à la prolifération des bactéries. Une croissance apicale inverse se met alors en place, formant un passage long et étroit appelé le cordon d'infection, dans lequel les bactéries se divisent. Parallèlement à la progression de l'infection, l'organogenèse nodulaire se met en place. Les cellules végétales du cortex et du péricycle entrent en division et forme un primordium nodulaire, lieu de libération des bactéries, et qui se différencie ensuite en nodosité mature. A l'intérieur de la nodosité, la bactérie se différencie en bactéroïdes, forme sous laquelle elle est capable de réduire l'azote atmosphérique (N2) en ammonium (NH_4^+) (Wang *et al.*, 2012a). Arrivée à maturité, la nodosité peut être de type soit déterminé, soit indéterminé.

- Lors de la formation des nodosités de type déterminé, l'activité mitotique du cortex externe est éphémère ce qui donne au nodule sa forme sphérique (cas du haricot, soja, lotier, anthyllide). La zone centrale est globalement constituée d'une zone de fixation d'azote c'est-à-dire de cellules au même stade de différenciation, plus ou moins infectées et d'une zone de sénescence (Figure 8) (Ferguson *et al.*, 2010).

- Les nodosités de type indéterminé sont formées à partir du cortex interne, généralement par les plantes utilisant la voie formant des cordons d'infection intracellulaires. Leur activité mitotique est persistante ce qui se traduit par des nodosités de forme allongée (cas de la luzerne, trèfle, pois, sulla). Elles possèdent une structure plus complexe que les nodosités de type déterminé (Schumpp et Deakin, 2010).

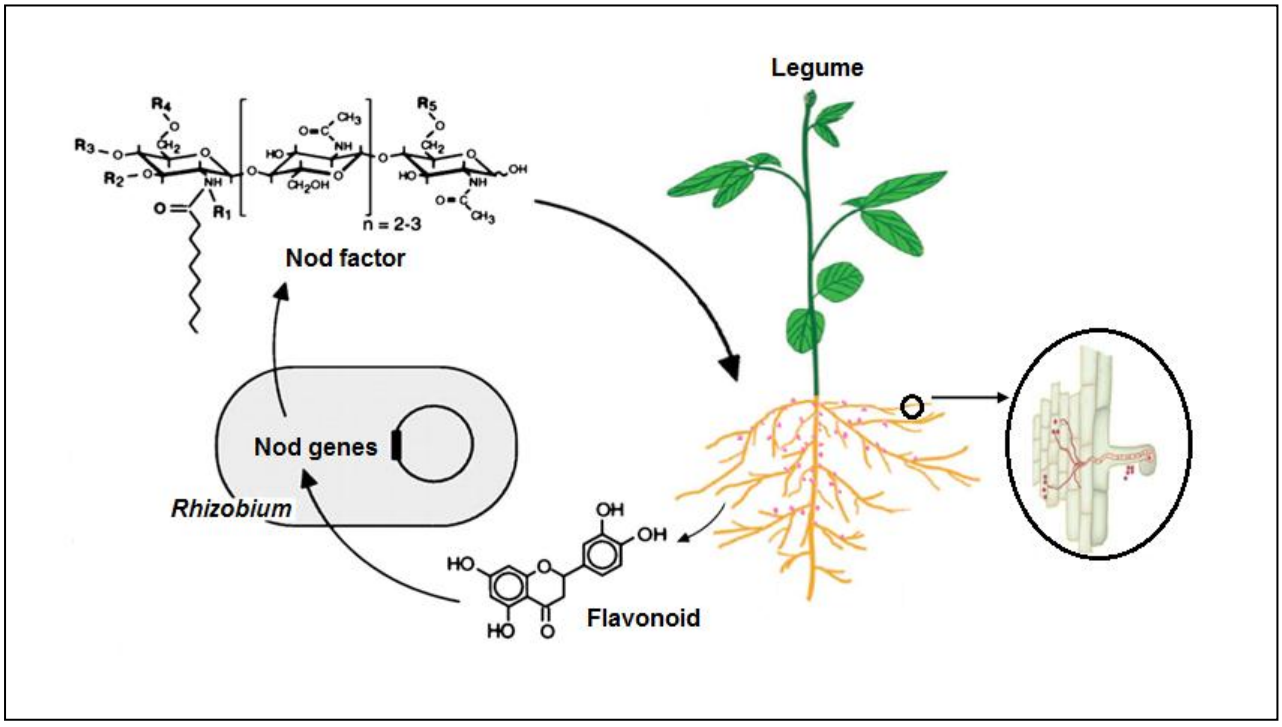


Figure 7 : Echanges de signaux lors de la mise en place de la symbiose rhizobium/légumineuse Nod-dépendant (d'après Lindstrom *et al.*, 2010).

Les flavonoïdes produits par la plante hôte induisent l'expression des gènes *nod* de rhizobium. Cela conduit à la production des facteurs Nod qui vont eux-mêmes en retour induire la réponse de la plante et l'initiation de la colonisation par la bactérie. Le zoom montre un cordon d'infection passant le cortex racinaire vers un groupe de cellules en division, qui deviendra le primordium nodulaire.

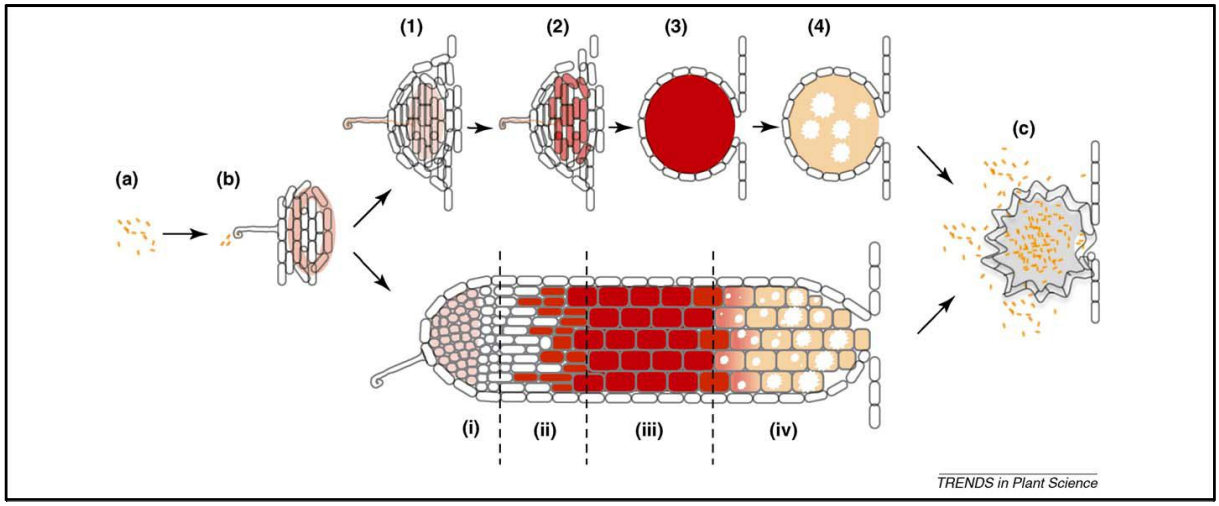


Figure 8 : Différents stades de développement des nodosités de type indéterminé (en haut du schéma) et déterminé (en bas) (Schumpp et Deakin, 2010).

(a) Rhizobium existant en tant que saprophytes. Chez les plantes qui forment des nodules « déterminés », comme *Glycine max* (soja), *Phaseolus vulgaris* (haricot), *Vigna unguiculata* (niébé) ou *Lotus* spp. les étapes du développement des nodules sont numérotées de 1 à 4. Les autres légumineuses telles que *Medicago sativa* (luzerne) ou *Pisum sativum* (pois) forment des nodosités de type «indéterminé» où tous les stades de développement des nodosités restent visibles comme des zones organisées le long de l'axe des nodosités (les stades de développement sont numérotés de i à iv). (b) Rapprochement du rhizobium et déformation du poil racinaire pour permettre aux bactéries de pénétrer dans les plantes à l'intérieur des boucles et provoquer la différenciation des cellules corticales dans la zone méristématique. (Stades 1 et i) Les membranes plasmiques du poil racinaire s'invaginent et forment le cordon d'infection. (L'étape de l'infection, 2 et ii) Le cordon d'infection se ramifie et les bactéries sont enveloppées dans une membrane d'origine végétale (symbiosome) et sont libérées dans le cytosol des cellules végétales. (Stades 3 et iii) Le rhizobium se différencie en bactéroïdes qui fixent l'azote atmosphérique. Les cellules végétales infectées subissent plusieurs cycles d'endo-duplication entraînant ainsi de grandes cellules polyploïdes hébergées dans des milliers de symbiosomes. (Stades 4 et iv) Sénescence des nodosités après une période active de fixation de l'azote dont la durée dépend du stade de développement de la plante et des conditions environnementales. (c) Les nodosités libèrent les bactéries et les bactéroïdes qui peuvent se dédifférencier en rhizobium dans le cas des nodosités déterminées pour revenir à un mode de vie saprophyte dans la rhizosphère.

Les rhizobium survivent pendant de longues périodes dans le sol et peuvent se développer rapidement s'ils infectent une légumineuse compatible. La présence d'une seule bactérie peut conduire à la formation d'une nodosité fixatrice d'azote contenant plus de 10^8 cellules bactériennes sur les racines des légumineuses (Chen *et al.*, 2008). Toutefois, des facteurs du milieu peuvent limiter la nodulation d'espèces de légumineuses (Zahran, 1999). C'est le cas de fortes concentrations de Zn et Cd (Chaudhary *et al.*, 2004) qui affectent la nodulation ou bien inactivent la fixation biologique de l'azote symbiotique en formant des nodosités racinaires inefficaces avec le rhizobium (Mcgrath *et al.*, 1988). Par conséquent, les exemples montrant les associations symbiotiques capables de conserver leur capacité à fixer N sur les

sols fortement contaminés, sont rares (Giller *et al.*, 2009). Ces dernières années, l'identification et la sélection des bactéries symbiotiques résistantes aux métaux (Abd-Alla *et al.*, 2012; Ruiz-Diez *et al.*, 2012; Vidal *et al.*, 2009) ont connu un grand développement pour promouvoir la croissance des légumineuses par l'intermédiaire d'une meilleure fixation biologique.

3.2. Les légumineuses

La famille des *Fabaceae* compte plus de 18000 (Lewis *et al.*, 2005) espèces regroupées en 714 genres et elle est la troisième plus grande famille d'Angiospermes (ou plantes à fleurs) après les *Orchidaceae* et les *Asteraceae*. En fait actuellement, seul un petit nombre d'espèces de légumineuses a été examiné pour sa capacité à noduler (9 260 espèces (http://www.ars-grin.gov/~sbmljw/cgi-bin/nodulation.pl (15 February 2013); Doyle et Luckow, 2003). On estime que 80 % d'entre elles forment des symbioses et à l'échelle mondiale, elles se répartissent sur tous les continents et sous toutes les conditions climatiques. Les *Fabaceae* sont divisées en trois sous-familles : les *Caesalpinioideae*, les *Mimosoideae* et les *Papilionoideae*.

Les *Caesalpinioideae* comprennent environ 2 300 espèces réparties en 171 genres et 4 tribus (Lewis *et al.*, 2005). Cette sous-famille rassemble principalement des arbres ou arbustes retrouvés en régions tropicales et subtropicales. Parmi les espèces de *Caesalpinioideae*, seulement 23% ont été décrites comme étant capables d'être nodulées. Elles sont essentiellement retrouvées parmi les *Caesalpinieae* et des *Cassieae* (De Faria *et al.*, 1989).
La sous-famille des *Mimosoideae* comprend environ 3 300 espèces regroupées en 77 genres et sont nodulées à plus de 90%. Ce sont surtout des arbres et des arbustes des régions tropicales et subtropicales.
Les *Papilionoideae* constituent la plus grande sous-famille des *Fabaceae* avec 28 tribus, 478 genres et environ 13 800 espèces dont 97% parmi les espèces testées sont nodulées (De Faria *et al.*, 1989). Les membres de cette sous-famille sont principalement des herbacées.

L'analyse des relations phylogénétiques des légumineuses est essentielle pour comprendre l'origine et la diversification de cette importante famille des angiospermes d'un point de vue écologique et économique. Les analyses phylogénétiques approfondies des légumineuses ont été réalisées sur les gènes chloroplastiques (comme le gène *rbc*L et le gène *mat*K), montrant ainsi que les légumineuses ont une origine monophylétique (Wojciechowski *et al.*, 2004).

3.3. Les rhizobium

Le second partenaire de l'association symbiotique fixatrice d'azote est une bactérie communément appelée « rhizobium » (du grec rhiza : racine et bios : vie). Ce terme générique dérive du premier genre bactérien, *Rhizobium* décrit au XIXème siècle comme des bactéries qui vivent dans le sol avec le potentiel de noduler des légumineuses (Frank, 1889). Les rhizobia étaient initialement caractérisés par leur vitesse de croissance: on distinguait ainsi le genre *Rhizobium* contenant des souches à croissance rapide, et qui devait plus tard se subdiviser en plusieurs genres (*Rhizobium, Ensifer/Sinorhizobium, Allorhizobium, Mesorhizobium*), et le genre *Bradyrhizobium* contenant des souches à croissance lente (Jordan, 1982). Actuellement, le groupe fonctionnel des rhizobiums comprend plus de 100 espèces reparties au sein de 9 familles et 15 genres d'alpha (ou α-) protéobactéries et betaprotéobactéries (Figure 9 ; Tableau 3). Ce nombre augmente régulièrement depuis une quinzaine d'années, notamment grâce à l'apparition de nouveaux outils de taxonomie moléculaire et une exploration plus large de la diversité dans des zones à forte biodiversité.

La plupart des bactéries nodulant les légumineuses appartiennent à la classe des α-protéobactéries et se répartissent au sein de 12 genres bactériens (Figure 9, Tableau 3). Les β-protéobactéries, contiennent 2 genres bactériens qui nodulent les légumineuses. Il s'agit des genres *Burkholderia* et *Cupriavidus* (Gyaneshwar *et al.*, 2011).

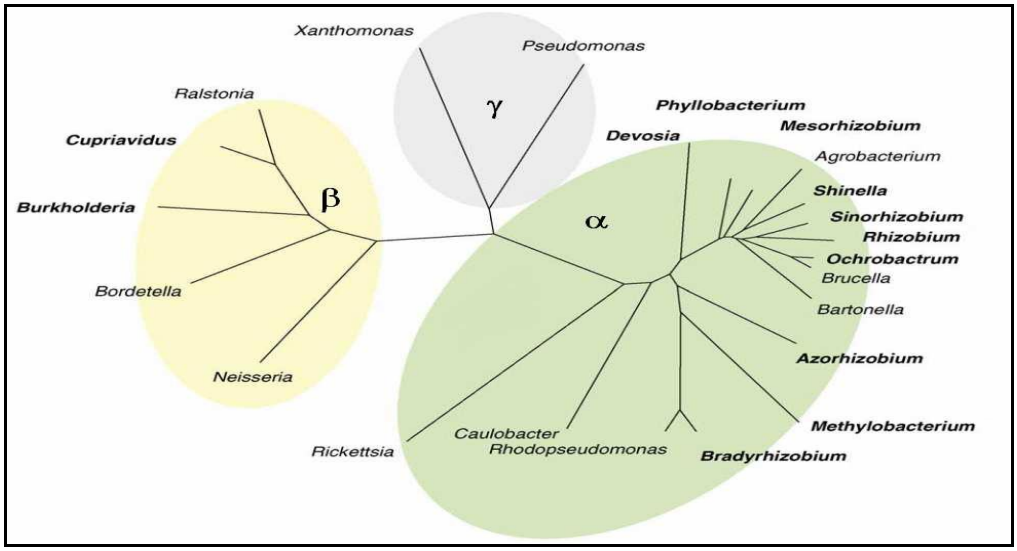


Figure 9 : Arbre phylogénétique de l'ADNr 16S α-, β et γ-protéobacteries. Les genres en gras contiennent les rhizobium nodulant les légumineuses (Masson-Boivin *et al.*, 2009).

Tableau 3 : Les rhizobium : famille, genre et nombre d'espèces décrites (http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia (10 avril 2012); http://www.bacterio.cict.fr/index.html).

Famille Genre : espèces	**Nombre d'espèces de rhizobium**
α –protéobactéries	
Bradyrhizobiaceae	
Bradyrhizobium : japonicum, elkanii, liaoningense, canariense, cytisi, daqingense, iriomotense, jicamae, denitrificans, huanghuaihaiense, lablabi, pachyrhizi, yuanmingense	**13**
Brucellaceae	
Ochrobactrum : lupini, cytisi	**2**
Hyphomicrobiaceae	
Devosia : neptuniae	**1**
Methylobacteriaceae	
Methylobacterium: nodulans	**1**
Microvirga: lotononidis, lupini, zambiensis.	**3**
PhyllobacteriaceaeMesorhizobium: loti, huakuii, ciceri, tianshanense, mediterraneum, plurifarium, septentrionale, amorphae, robiniae, australicum, opportunistum, albiziae, alhagi, gobiense, chacoense, metallidurans, caraganae, temperatum, tarimense, shangrilense, camelthorni, silamurunense, shonense, hawassense, abyssinicae, muleiense, quingshengii, tamadayense.	**28**
Phyllobacterium: trifolii	**1**
Aminobacter : anthyllidis	**1**

Rhizobiaceae	
Ensifer **(anciennement** ***Sinorhizobium*** **ou** ***Sinorhizobium non formellement renommé*****) :** ***abri, arboris, adhaerens, meliloti, medicae, fredii, terangae, saheli, sojae, kummeroviae, numidiscus, garamanticus, indiaense, kostiensis, mexicanus, Sinorhizobium americanum,*** **et «** ***S. morelense*** **» (peut être synomyne d'** ***E. adhaerans*** **ou peut-être une espèce distincte)**	**16 ou 17**
Rhizobium **(est inclus dans ce groupe anciennement** ***Allorhizobium*****):** ***alamii, alkalisoli, cellulosilyticum, daejeonense, endophyticum, elti, galegae, gallicum, giardinii, hainanense, fabae, sullae, leucaenae, leguminosarum, loessense, herbae, huautlense, tropici, mongolense, lupini, lusitanum, leucaenae, loessense, taibaishanense, undicola, mesosinicum, miluonense, multihospitium, oryzae, phaseoli, pisi, tibeticum, tubonense, indigoferae, sphaerophysae, grahamii, mesoamericum, cauense, subbaraonis, vallis, vignae, yanglingense***	**42**
Shinella: kummerowiae	**1**
Xanthobacteraceae	
Azorhizobium: caulinodans, doebereinerae	**2**
β –protéobactéries	
Burkholderiaceae	
Burkholderia: carabensis, sabiae, mimosarum, nodosa, phymatum, tuberum, diazotrophica, symbiotica	**8**
Cupriavidus: taiwanensis, necator	**2**

Le développement de la taxonomie polyphasique (tests phénotypiques, génotypiques et phylogénétiques) et de l'utilisation de l'ADNr 16S comme marqueur taxonomique a entraîné un bon nombre de remaniements dans la taxonomie des rhizobia (Vandamme *et al.*, 1996; Zakhia et de Lajudie, 2006). Cependant, afin d'étudier la phylogénie des rhizobia, une utilisation récente d'autres gènes a été préconisée (Gupta, 1998). Parmi ces molécules, on trouve le gène de glutamines synthétases (Turner et Young, 2000), ou des gènes impliqués dans le système de réparation de l'ADN (*recA*) ou la production d'ATP (*atpD*). Les résultats obtenus avec ces gènes sont concordants avec la phylogénie basée sur l'ADNr 16S (Gaunt *et al.*, 2001; Young, 1996). D'autres gènes, impliqués dans la nodulation (*nodA* et *nodC*) sont également utilisés pour la définition taxonomique des rhizobium.

3.3.1. L'ADN ribosomal 16S

L'ADN ribosomal 16S est un gène qui permet la synthèse de l'ARN entrant dans la constitution de la petite sous unité du ribosome. Depuis le début des années 1990, l'analyse de l'ADNr 16S est devenue la technique la plus utilisée pour l'identification, la classification et la phylogénie des bactéries et des autres organismes vivants (Olsen et Woese, 1993; Olsen *et al.*, 1994). Les gènes ribosomaux ont été considérés comme une horloge moléculaire qui accumule les changements aléatoires en nucléotides permettant ainsi d'estimer le temps écoulé depuis l'ancêtre commun entre deux gènes ou deux organismes (Li *et al.*, 1987). Ainsi, l'utilisation de l'ADNr 16S permet de reconstruire l'histoire évolutive des bactéries.

L'ADNr 16S est présent chez toutes les bactéries. Il possède une longueur d'environ 1500 paires de base. Son utilisation comme marqueur taxonomique suppose que les génomes bactériens ne contiennent qu'une seule copie ou plusieurs copies identiques de ce gène et que son évolution s'apparente à celle du génome entier. En effet, les gènes ribosomaux ont l'avantage de contenir des séquences de différents niveaux de conservation entre organismes, allant de séquences très conservées à des séquences très variables (Zakhia et de Lajudie, 2006).

3.3.2. Les gènes de ménage

En dehors de l'ADNr 16S, l'utilisation d'autres marqueurs phylogénétiques est nécessaire pour parfois analyser plus finement le degré de parenté entre des groupes de bactéries et définir de nouvelles espèces bactériennes. Les gènes de ménage, qui sont des gènes assurant

les fonctions indispensables à la vie de tous types de cellules, sont ainsi de bons candidats comme marqueurs alternatifs à l'ADNr 16S (Gaunt *et al.*, 2001).

Le gène *recA* code pour la protéine RecA qui entre en jeu dans le processus de réparation de l'ADN par recombinaison homologue (Gaunt *et al.*, 2001). Les phylogénies de ce gène sont généralement congruentes avec celle de la séquence ADNr 16S pour l'ensemble des groupes de bactéries (Eisen, 1995) et notamment des alpha-protéobactéries (Gaunt *et al.*, 2001).

Les gènes *atp* sont inclus dans la catégorie des gènes de ménage et leur présence dans le génome bactérien est considérée comme essentielle pour la production de l'énergie et la survie des micro-organismes (Christensen *et al.*, 2004; Ventura *et al.*, 2004). Le gène *atpD* code pour la sous-unité β de l'ATP synthase. En raison de sa distribution ubiquitaire, de sa constance fonctionnelle et de sa conservation, ce gène est considéré comme un marqueur moléculaire approprié pour les études de phylogénie bactérienne (Christensen *et al.*, 2004; Ventura *et al.*, 2004).

3.3.3. Les gènes de nodulation

Lors des étapes précoces de la symbiose, les substances émises par la légumineuse induisent chez les rhizobium, l'activation ou la répression de l'expression des gènes de nodulation. Plusieurs études ont permis d'identifier ces gènes chez les rhizobium. Les gènes de nodulation sont impliqués dans la biosynthèse de lipochitooligosaccharides (facteurs Nod), qui agissent comme molécules signal et induisent la formation des nodosités (Masson-Boivin *et al.*, 2009).

Les gènes *nod* peuvent être fonctionnellement divisés en trois classes : les gènes régulateurs, les gènes *nod* communs et les gènes spécifiques (Long, 2001; Wais *et al.*, 2002).

- Les gènes régulateurs de transcription *nodD* codent pour les protéines NodD (Long, 2001).

- Les gènes *nod* communs, *nodABC*, sont des gènes très conservés et présents chez les différentes espèces de rhizobia, à l'exception de certains *Bradyrhizobium* (Giraud *et al.*, 2007; Miche *et al.*, 2010) et sont responsables de la synthèse du squelette des FNs. Ces gènes sont requis pour les réponses de l'hôte et peuvent être échangés entre les rhizobium sans généralement affecter la gamme de légumineuses nodulées (Wais *et al.*, 2002). Ces trois gènes sont organisés en opéron chez la plupart des rhizobium sauf chez *R. etli* où le gène *nodA* est séparé des gènes *nodBC* (Vazquez *et al.*, 1991) et chez *M. loti* où le *nodB* est séparé

de *nodA* et *nodC* (Sullivan *et al.*, 2002). Ils sont indispensables à la symbiose puisque l'inactivation de l'un d'eux se traduit par une absence de nodulation.

- Les gènes *nod* spécifiques sont responsables des substitutions qui s'opèrent sur le squelette de base des FNs. Ces gènes accessoires ne se retrouvent pas chez tous les rhizobium et ils sont nécessaires pour la nodulation de certaines plantes. Chaque souche possédant son propre cortège de gènes *nod* spécifiques qui permettent la production d'un cocktail de FNs (Long, 1996; Wais *et al.*, 2002).

L'association rhizobium-légumineuse est un modèle d'étude présentant une très grande complexité pour la spécificité de l'interaction entre les deux partenaires symbiotiques. L'identification et la caractérisation de couples de partenaires efficaces pour la nodulation et la fixation de l'azote présente une grande importance pour leurs adaptations à des conditions écologiques ou agronomiques précises. Jusqu'à présent, le passage par des études expérimentales de tests de nodulation reste primordial afin de déterminer le spectre d'hôte d'une souche de rhizobium et l'efficacité de l'association.

4. Les bactéries et résistance aux métaux

Comme pour les plantes hypertolérantes, certaines bactéries arrivent à résister à de fortes concentrations en ETMs.

Pour avoir un effet toxique, les ions métalliques doivent d'abord entrer dans la cellule bactérienne. Certains ETMs sont nécessaires pour les fonctions enzymatiques et la croissance bactérienne ce qui explique la présence de mécanismes d'absorption qui permettent l'entrée des ions métalliques dans la cellule. La résistance aux métaux est le résultat du développement de mécanismes de tolérance permettant à la bactérie de détoxifier les métaux présents en trop grandes quantités dans le milieu (Spain, 2003). Les ions métalliques essentiels entrent dans la cellule grâce à des transporteurs non spécifiques et d'autres spécifiques. Parmi les deux types de systèmes d'absorption, le premier est exprimé de façon constitutive, rapide et généralement piloté par le gradient chimiosmotique à travers la membrane cytoplasmique des bactéries et donc ne nécessite pas de l'ATP. Ce système résulte d'un afflux d'une plus grande variété des ETMs, une situation qualifié de «porte ouverte» qui permet de comprendre pourquoi les ions métalliques sont toxiques (Choudhury et Srivastava,

2001). Le deuxième système est spécifique et il est relativement lent et est entraîné par l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP (Spain, 2003).

La résistance aux métaux et la survie sont le résultat d'une coopération entre les mécanismes de résistance et le métabolisme métallique cellulaire normal. Il existe plusieurs mécanismes de résistance aux métaux chez les bactéries. Ces mécanismes comprennent :

- la séquestration extracellulaire du métal
- l'exclusion du métal par une barrière de perméabilité
- l'exclusion par transport actif du métal en dehors de la cellule
- la séquestration intracellulaire physique de métal par des protéines de liaison ou d'autres ligands pour l'empêcher d'endommager les cibles métalliques cellulaires sensibles
- la réduction de la sensibilité aux métaux par transformation et/ou détoxification (Choudhury et Srivastava, 2001; Nies, 1999; Spain, 2003).

Ces stratégies sont généralement observées dans les phénotypes de résistance à un ou plusieurs métaux (Choudhury et Srivastava, 2001). Chez *Escherichia coli*, la concentration minimale inhibitrice (CMI) peut aller de 0,01 mM avec les métaux les plus toxiques (mercure) jusqu'à 20 mM avec les métaux les moins toxiques (manganèse) (Mergeay *et al.*, 1985).

4.1. Résistance au zinc

Le zinc, oligoélément essentiel, est un composant de plus de 200 enzymes isolées à partir de différentes espèces et il est indispensable à leur fonctionnement catalytique et à leur stabilité structurelle. Les multiples rôles du zinc sont rapportés dans les fonctions de bases cellulaires telles que la réplication de l'ADN, la transcription, la division cellulaire et l'activation des cellules (Choudhury et Srivastava, 2001).

Toutefois, des concentrations élevées en zinc dans le milieu affectent de nombreuses fonctions biologiques. Ce métal est connu pour être un inhibiteur puissant des systèmes de transport d'électrons chez les bactéries et les mitochondries. La toxicité du zinc reste ainsi assez faible par rapport à d'autres métaux comme Hg, Cd, Cu, Ni, Co et Pb (Choudhury et Srivastava, 2001).

Les mécanismes de résistance aux ions métalliques essentiels comme le zinc sont particulièrement intéressants à étudier. Ces travaux de recherche contribuent à la compréhension du contrôle homéostatique où la cellule exerce le contrôle de la quantité requise du métal et gère ainsi son excès. La résistance à des niveaux toxiques de zinc peut être due à l'accumulation et un stockage extracellulaire, la séquestration par les

métallothionéines (MT), une séquestration physique intracellulaire, ou au système d'efflux à travers la membrane cytoplasmique (Figure 10) (Blencowe et Morby, 2003; Choudhury et Srivastava, 2001).

Le système d'efflux est un mécanisme important impliqué dans la résistance au Zn. Il réalise le transport actif des ions métalliques via plusieurs protéines. Les protéines de transport qui sont responsables du transport du zinc à travers la paroi cellulaire chez les bactéries à Gram négatif sont les « Cation Diffusion Facilitator » (CDF), les « Resistance Nodulation celle Division » (RND) ainsi que les P-types ATPases. Bien que le transport de zinc par les P- types ATPases se fasse à travers la membrane cytoplasmique après hydrolyse de l'ATP, les systèmes RND sont capables de transporter le Zn à travers la paroi cellulaire complète des bactéries (cas de *Cupriavidus metallidurans* CH34) (Choudhury et Srivastava, 2001; Silver et Phung, 2005).

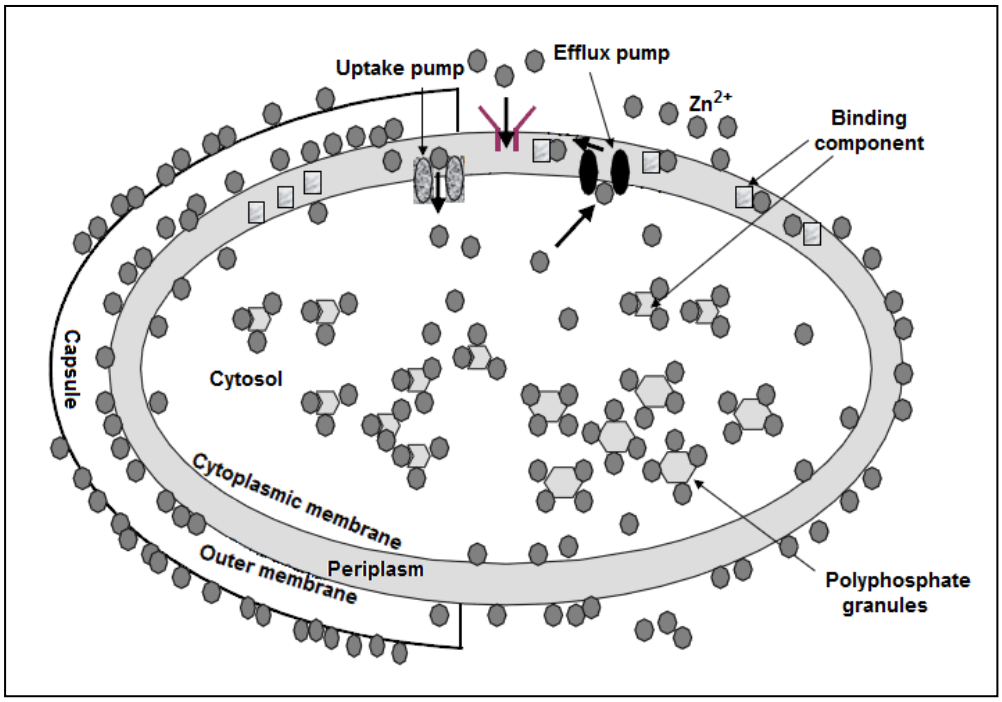


Figure 10 : Mécanismes de résistance au zinc chez les bactéries (Choudhury et Srivastava, 2001).

4.2. Résistance au cadmium

Dans l'environnement, le cadmium se trouve très souvent sous forme d'un cation divalent (Cd^{2+}) et est plus toxique que le zinc. De nombreux auteurs ont tenté de comprendre la toxicité du Cd vis-à-vis des microorganismes, mais aucun mécanisme précis n'a pu être mis en évidence. C'est un agent oxydant puissant qui inhibe la réplication de l'ADN et semble rendre l'ADN plus sensible aux attaques nucléolytiques résultant de cassures de l'ADN simple brin. Il peut entrer en interaction avec le métabolisme du zinc (Chovanová *et al.*, 2004).

La résistance au Cd est principalement basée sur des systèmes d'efflux (Silver and Phung le, 2005). Chez les bactéries à Gram négatif le Cd semble être détoxifié par des systèmes P-type ATPase comme l'ATPase CadA découverte chez *S. aureus* (Silver et Phung, 2005), ou bien par le complexe protéique *czc* découvert chez *C. metallidurans*, qui est principalement un transporteur de Zn, et le complexe ncc, un transporteur de Ni (Bruins *et al.*, 2000; Nies, 2003). Chez *S. cerivisae* le Cd peut se lier à du glutathion et le complexe résultant est ensuite transporté par un transporteur spécifique (de la famille des ABC transporteurs) vers la vacuole. Ces différents mécanismes sont présentés dans la figure 11. De plus, Roane *et al.* (2001) ont montré que deux bactéries résistantes au Cd présentaient un mécanisme de séquestration intracellulaire.

Bien que les mécanismes précis d'accumulation intracellulaire ne soient pas élucidés, il semblerait que la production de métallothionéines et la précipitation avec du phosphate soient deux explications probables.

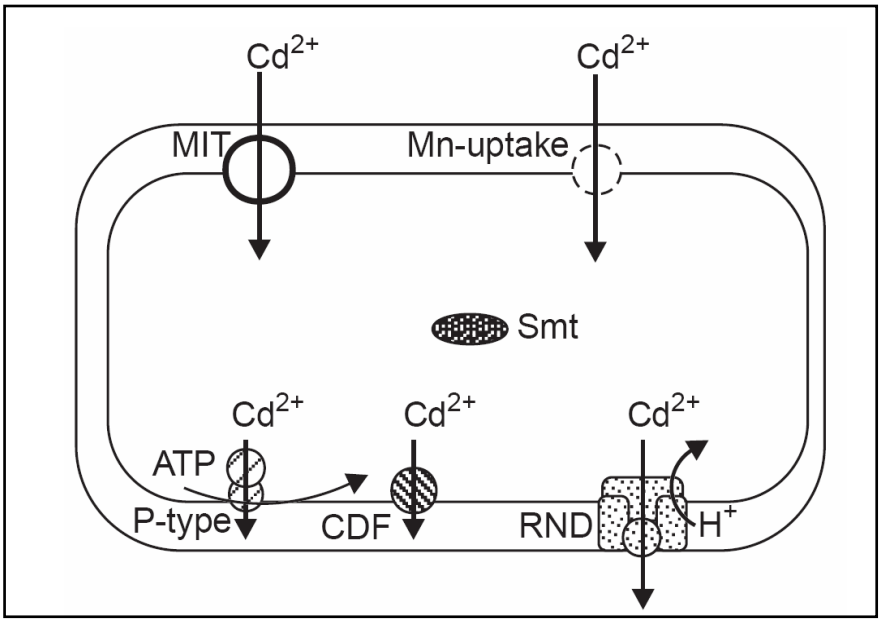


Figure 11 : Principales familles de protéines impliquées dans le métabolisme du cadmium chez les bactéries (Nies, 1999).

MIT : Metal inorganic transport ; smt : metallothionine locus ; CDF : Cation Diffusion Facilitator ; RND : Resistance Nodulation celle Division ; ATP : Adénosine triphosphate

4.3. Exemples de bactéries symbiotiques résistantes aux métaux

La recherche et l'isolement des bactéries symbiotiques résistantes aux métaux ont fait l'objet de plusieurs études. Leur tolérance ainsi que leur utilisation en symbiose avec la plante hôte peut être utile pour la restauration des sols contaminés (Carrasco *et al.*, 2005; Chaintreuil *et al.*, 2007; Fan *et al.*, 2011; Klonowska *et al.*, 2012; Nonnoi *et al.*, 2012; Vidal *et al.*, 2009).

M. metallidurans STM2683^T est une souche symbiotique qui a été isolée à partir de la légumineuse *Anthyllis vulneraria* sous-espèce *carpatica* naturellement présente sur les stériles de l'ancienne mine de Saint Laurent le Minier (Languedoc, France). *M. metallidurans*, bactérie Gram négatif, a la capacité de tolérer des taux élevés des ETMs : entre 16 et 32 mM de zinc et de 0,3 et 0,5 mM de cadmium sur milieu riche (Vidal *et al.*, 2009). Un séquençage du génome de cette souche type STM2683^T a été réalisé. Ainsi (Maynaud *et al.*, in preparation) ont montré que cette résistance est déterminée par un système d'efflux de type P-ATPase tel que CadA1.

Dans le cas de la résistance au nickel, Chaintreuil *et al.* (2007) ont étudié des souches de *Bradyrhizobium* isolées d'une légumineuse, *Serianthes calycina*, poussant sur les sols riches en nickel en Nouvelle Calédonie. Il a été démontré que ces souches sont capables de croître en présence de 15 mM de $NiCl_2$. Cette résistance a été déterminée par des systèmes d'efflux de

type HME-RND (Heavy Metal Efflux Resistance Nodulation and cell-Division). Les souches de *Cupriavidus taiwanensis* isolées à partir de *Mimosa pudica* poussant sur ces sols ont montré également un niveau de résistance important et plus élevé que la souche résistante modèle (*Cupriavidus metallidurans* CH34) (Klonowska *et al.*, 2012).

Ensifer meliloti, isolée à partir de nodosités de *Medicago lupulina* provenant des sites miniers de Zn-Pb présente une tolérance au cuivre qui atteint 1.5 mM (Fan *et al.*, 2011). Le génome de cette souche a été étudié par (Li *et al.*, 2012) qui ont identifié des gènes impliqués dans la résistance au Cu et d'autres qui codent pour des systèmes d'efflux de type P-ATPase ainsi que des Multicopper oxydases impliqués dans l'homéostasie du cuivre.

5. Influence de l'association rhizobium-légumineuse sur l'absorption des métaux

Les légumineuses, cultivées dans un milieu riche en métaux, après nodulation, sont capables d'absorber en quantité importante l'élément toxique par l'intermédiaire des racines. (Chen *et al.*, 2008) ont démontré que des plantes de *Mimosa pudica* inoculées avec *Cupriavidus taiwanensis* (TJ208) ont une plus grande capacité d'adsorption du Cd, Pb et Cu que les plantes non nodulées. L'inoculation avec la souche TJ208 a augmenté la capacité d'absorption des métaux par les racines de *Mimosa*, ce qui conduit à une augmentation de respectivement 86, 12, et 70% des teneurs en Pb, Cu, et Cd par rapport aux plantes non nodulées. Ceci peut s'expliquer : (i) par le fait que les plantes nodulées contiennent des phytochélatines qui contribuent d'une manière significative à l'incorporation des métaux dans les plantes ou (ii) à certains changements physiologiques au niveau des cellules de TJ208 au sein des nodosités, ce qui conduit à l'augmentation des sites de liaison des métaux, ou bien, (iii) à la libération de certains produits extracellulaires tels que les polysaccharides.

Récemment, une autre étude a été réalisée avec l'association entre deux souches de Rhizobium (VR-1 et VA-1) et deux espèces de haricot, *Vigna radiata* et *Vigna angularis* L., tolérantes aux cendres volantes (Chaudhary *et al.*, 2011b). En effet, l'inoculation des plantes cultivées dans un substrat contenant 100 % de cendres volantes avec les rhizobium a généré une augmentation marquée de la biomasse, du rapport longueur des racines-biomasse des parties aériennes, des pigments photosynthétiques, de la teneur en protéines et de l'intensité de nodulation. L'inoculation avec des souches de rhizobium tolérants aux cendres volantes a également augmenté la concentration en Fe, Zn Cd, Cu et Cr et favorisé la translocation de métaux vers les parties aériennes de la plante.

L'inoculation du pois avec une souche métallicole *Rhizobium* (RP5), présentant un niveau élevé de tolérance au nickel et au zinc, a permis de diminuer la concentration de ces deux métaux (Wani *et al.*, 2008) dans les plantes et ce résultat est en accord avec l'hypothèse de (Mamaril *et al.*, 1997) qui avaient suggéré que les rhizobium peuvent protéger les plantes contre les effets toxiques des métaux et notamment du zinc, par des mécanismes d'adsorption / désorption.

Mahieu *et al.* (2011) ont démontré que 80% de l'azote de la légumineuse *A. vulneraria* était issu de l'atmosphère grâce à la fixation biologique lorsque cette plante est en symbiose avec *M. metallidurans.* Cette mobilisation de l'azote atmosphérique contribue à l'enrichissement du sol en cet élément et favorise la croissance d'autres espèces végétales métallicoles comme *Festuca arvernensis* (Frérot *et al.*, 2006) (Figure 12).

A. arenaria | ***A. arenaria + A. vulnerarra*** | ***F. arvernensis*** | ***F. arvernensis + A.vulneraria***

Figure 12 : Végétation d'*Armeria arenaria* et de *Festuca arvernensis* cultivée en présence ou non d'*Anthyllis vulneraria* sous-espèce *carpatica* en première séquence de végétation. (photos J. Escarré).

6. Re-fonctionnalisation écologique des sols et des substrats miniers à fortes teneurs en ETMs en utilisant les propriétés des plantes et des microorganismes métallicoles : perspectives

L'ensemble des connaissances actuellement disponibles sur les contaminations par les ETMs et les adaptations des plantes et des microorganismes aux contraintes générées par leur présence offrent de nouvelles perspectives et des alternatives aux techniques classiques de remédiation par excavation et élimination des matériaux pollués. La phytostabilisation qui est une méthode de confinement *in situ* des matériaux fortement contaminés par des ETMs, autorise une exploitation ultérieure des métaux si les conditions économiques devenaient favorables. L'optimisation de la phytostabilisation passe par des recherches à caractère interdisciplinaire avec l'implication de travaux sur les végétaux et les microorganismes symbiotiques (bactéries fixatrices d'azote et champignons mycorhiziens) afin de faciliter l'installation du couvert végétal. La phytostabilisation n'étant pas une méthode de décontamination, sa mise en œuvre doit être raisonnée au cas par cas et tenir compte des contraintes topographiques du site, de la nature et des teneurs en ETMs des substrats miniers. Une attention particulière doit également être accordée au devenir des ETMs sous le couvert végétal en étudiant l'infiltration des eaux de précipitation et la mobilité potentielle des ETMs qui dépend de leur spéciation et de leur répartition dans les différentes phases porteuses du sol (formes mobiles dans la solution du sol ou formes liées par adsorption ou précipitation). Le projet **SyMetal** (Rhizostabilisation de déblais miniers à fortes teneurs en métaux par des plantes Métallicoles associées à leurs microorganismes Symbiotiques), projet dans lequel s'inscrit une partie du travail expérimental de ma thèse, développe une approche dans laquelle tous les points évoqués précédemment sont abordés.

Chapitre II

Matériel et Méthodes

Chapitre II : Matériel et Méthodes

1. Absorption et accumulation du zinc chez *Anthyllis vulneraria*, légumineuse retenue comme modèle d'étude

1.1. Le modèle d'étude : *Anthyllis vulneraria*

Le genre *Anthyllis* appartient à la famille des *Papilionaceae*, tribu des *Loteae*. Le nombre exact d'espèces d'*Anthyllis* est controversé et dépend de l'interprétation de leurs limites morphologiques et/ou géographiques. Ce genre comprendrait entre 25 à 60 espèces présentes en Europe, en Afrique et dans le Bassin Méditerranéen. Il existe des espèces annuelles, bisannuelles et pérennes (Nanni *et al.*, 2004) et bien que certaines espèces appartenant à ce genre soient bien définies et généralement acceptées, il y a beaucoup d'espèces non déterminées qui font l'objet d'interprétations différentes (Köster *et al.*, 2008). L'histoire de vie de chaque espèce est strictement corrélée à son habitat et à son système reproductif ; ainsi les espèces annuelles et bisannuelles sont principalement autogames, tandis que les espèces pérennes sont principalement allogames (Couderc, 1980 ; http://www.tela-botanica.org).

Anthyllis vulneraria, dont le nom français est anthyllide vulnéraire est une espèce bisannuelle. C'est une plante qui était utilisée autrefois en médecine (http://les-plantes-medicinales.net/2011/04/vulneraire-anthyllis-vulneraria/). Elle compte plus de 30 sous-espèces identifiées mais l'existence de formes intermédiaires rend l'identification difficile et beaucoup d'individus peuvent être déterminés uniquement par comparaison avec des plantes conservées dans un herbier (Nanni *et al.*, 2004).

1.1.1. Caractéristiques morphologiques

C'est une plante herbacée, ses tiges, nombreuses, prostrées ou redressées, portent des feuilles imparifoliées. La foliole terminale étant nettement plus grande.

Les fleurs, le plus souvent jaunes (Figure 13), sinon blanches, rouges ou violacées, sont groupées en petits capitules de 2 ou 3, accompagnés de bractées foliacées assez amples. Le fruit est une gousse monosperme et les graines sont ovoïdes et lisses (Boullard, 2001).

Figure 13 : *Anthyllis vulneraria* (Les Avinières à St Laurent le Minier).

1.1.2. Répartition des sous-espèces d'*Anthyllis vulneraria* utilisées dans notre étude

Dans le but d'étudier l'accumulation du zinc chez *Anthyllis vulneraria*, deux sous-espèces poussant sur deux sols contaminés et deux sous-espèces originaires de deux sols non contaminés ont été utilisées dans notre étude (Figure 14).

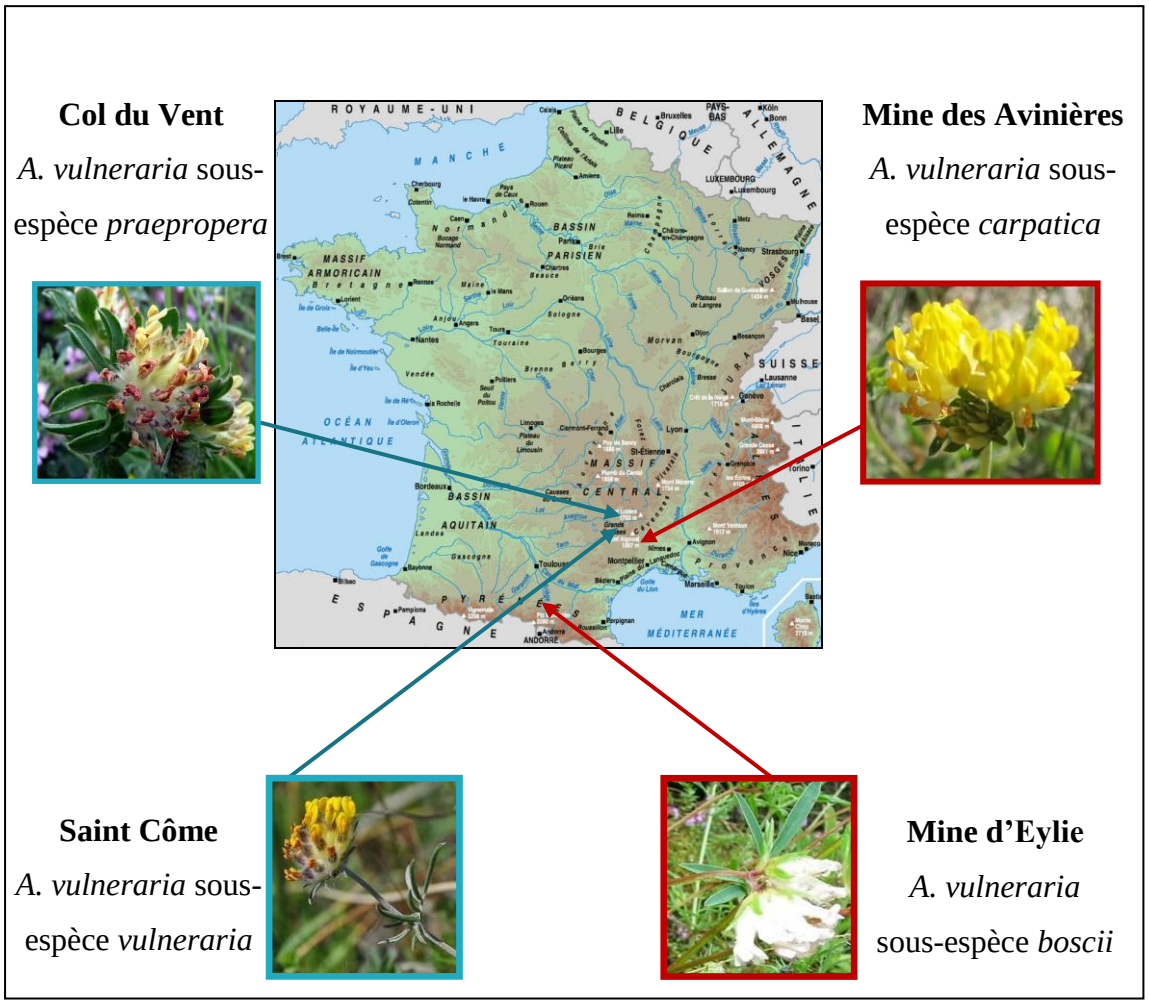


Figure 14 : Répartition des différentes sous-espèces d'*Anthyllis vulneraria* utilisées dans notre étude.

1.1.2.1. Sous-espèces originaires des sols pollués

- La première sous-espèce, *Anthyllis vulneraria* sous-espèce *carpatica*, est une légumineuse qui est spontanément présente sur l'ancien site minier des Avinières (les précipitations moyennes annuelles sont de 1504 mm).

La mine des Avinières est un ancien site de Zn et Pb et elle se situe à 1 km en aval de Saint Laurent le Minier et à 40 km de Montpellier. Elle n'est plus exploitée depuis une centaine d'années (Demange, 1973), mais l'activité d'extraction a donné lieu à une grande étendue de

résidus miniers après traitement des minerais (Figure 15). Le sol ainsi formé a une structure particulièrement homogène, dont la concentration totale en métaux est extrêmement importante (Tableau 4).

Figure 15 : Mine des Avinières (43°55'58.55" N et 3° 39'59.10" E) (photo Google Earth).

- La deuxième sous-espèce étudiée provient du site d'Eylie. Il s'agit de la sous-espèce *boscii*.

La mine d'Eylie est située près du village de Sentein dans les Pyrénées (130 km au sud de Toulouse. Les précipitations moyennes annuelles sont de 1027 mm. C'est une ancienne mine de Zn et Pb abandonnée depuis 1975 (Figure 16) Les concentrations en métaux sont présentées dans le tableau 4.

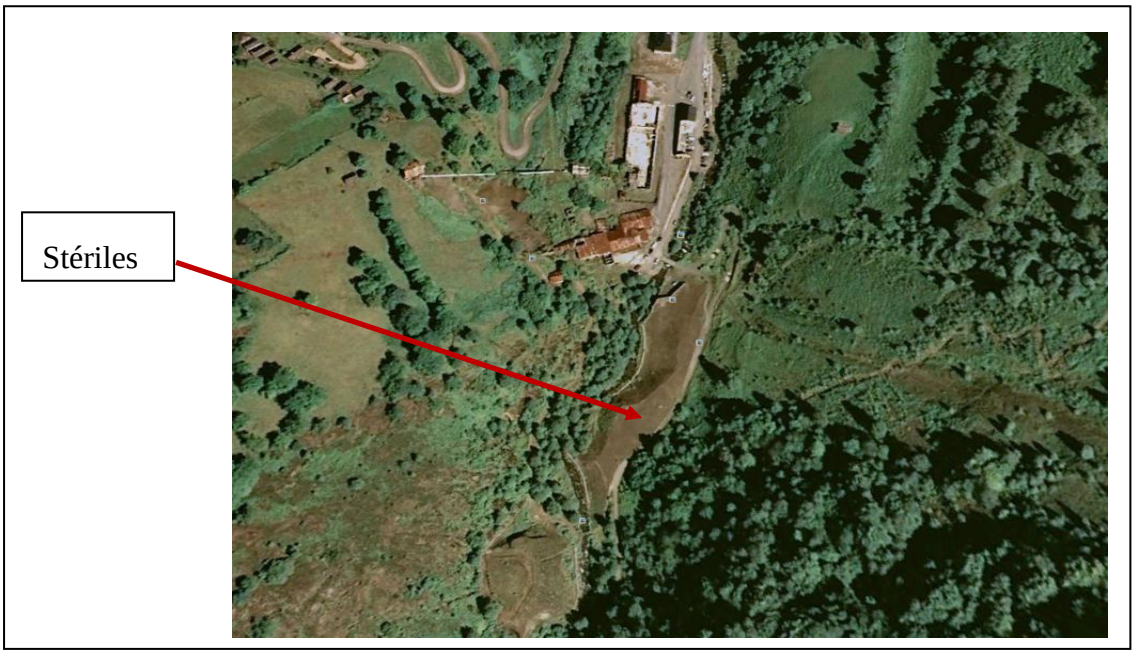


Figure 16 : Mine d'Eylie (42°49'58.19" N et 0° 56'13.84" E) (Google Earth).

1.1.2.2. Sous-espèces originaires des sols non pollués

- *Anthyllis vulneraria* sous-espèce *praepropera*, pousse sur les sols calcicoles du Causse du Larzac (un plateau de 1000 km^2, 560 à 920 m de haut, sur les marges méridionales du Massif Central, France). Son climat est caractérisé par les influences océaniques et méditerranéennes d'où son appellation "Col du Vent". Les précipitations annuelles varient entre 710 et 1730 mm. Les caractéristiques physico-chimiques sont présentées dans le tableau 4.

- La quatrième sous-espèce utilisée pour notre étude est *A. vulneraria* sous-espèce *vulneraria.* Cette sous-espèce pousse naturellement sur le site de Saint Côme (Causse Méjean, un plateau calcaire de 350 km^2 dans le sud de la France, de 800 à 1250 m au-dessus du niveau de la mer). Son climat est méditerranéen, aux influences océaniques et continentales, avec des hivers longs et froids et des étés chauds. Les précipitations annuelles moyennes sont de 920 mm. Les caractéristiques chimiques de ce sol sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Caractéristiques physico-chimiques des sols étudiés.

Sites géographiques		**Macronutriments échangeables ($g.kg^{-1}$)**		**Statut de la matière organique (MO) ($g.kg^{-1}$)**		**Concentrations totales de métaux ($mg.kg^{-1}$)**		
	pH_{eau}	**P_2O_5**	**K_2O**	**MO**	**N total**	**Cd**	**Pb**	**Zn**
Avinières	7,57	0,010	0,001	7,68	0,59	1210	34212	173263
Eylie	8,03	0,053	0,001	34,2	1,79	23	4256	14299
Col du Vent	8,4	0,065	0,121	53,3	2,7	1,71	59,61	233,54
Saint Côme	8,4	0,063	0,083	53,5	2,2	4,3	106,2	585,84

1.2. Pré-culture des plantes

Préparation des plantes :

Les graines des quatre sous-espèces d'*Anthyllis vulneraria* préalablement scarifiées et stérilisées ont été placées sur des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée (10% d'agar-agar). Après un passage de 48 heures dans une chambre froide à 5 ° C, elles ont été transférées à 22°C. Après une semaine, les jeunes plantes ont été transplantés et cultivés sans zinc pendant quatre mois dans des pots contenant de l'attapulgite calcinée (Oil Dri US Special, Damolin, Denmark; http://www.damolin.dk) dans une serre méditerranéenne (14 heures de jour et 10 heures de nuit; T ° jour : 22 ° C et T ° nuit : 15 ° C (Figure 17).

Les plantes ont été arrosées deux fois par semaine avec une solution nutritive contenant 2,38 mM $CaSO_4$; 1 mM $MgSO_4$; 0,61 mM K_2HPO_4 ; 0,39 mM KH_2PO_4 ; 0,15 µM $CoCl_2$; 0,041 mM H_3BO_3, 0,07 mM Fe-EDTA ; 6,1 µM $MnSO_4$; 0,59 µM Na_2MoO_4 ; 1,49 µM $ZnSO_4$; 0,33 µM $CuSO_4$.

Inoculation des plantes :

Les plantes d'*A.vulneraria* ont été réparties en deux lots : une partie des plantes d'*A. vulneraria* a été cultivée sans souche de *Mesorhizobium* et l'autre partie a été inoculée soit avec la souche métallicole *M. metallidurans* STM2683 (Vidal *et al.,* 2009), soit avec la souche non-métallicole de *Mesorhizobium* sp. STM2682 (Mahieu *et al.*, 2011). Une

suspension bactérienne issue d'une culture en phase exponentielle a été pulvérisée dans le substrat d'attapulgite calciné (0,5. 10^6 UFC g^{-1}) homogénéisé par agitation continue. La solution nutritive des plantes inoculées et non inoculées a été supplémentée avec 0,5 mM de KNO_3. Toute l'expérience a été effectuée en prenant toutes les précautions nécessaires pour éviter la contamination avec des bactéries symbiotiques et aucune nodosité n'a été observée sur les plants non inoculés après 4 mois de culture.

Figure 17 : Disposition de l'expérimentation lors de la culture des plants d'*Anthyllis* en serre.

1.3. Exposition des plantes au zinc en conditions d'hydroponie

Après quatre mois de culture des plantes en serre sur attapulgite, les plantes ont été transférées individuellement dans des pots en hydroponie dans une chambre de culture (16 heures lumière à 22 ° C et 8 heures obscurité à 18 ° ; 60 - 70% d'humidité relative).

Les racines des plantes d'*A. vulneraria* ont été soigneusement rincées avec de l'eau distillée pour éliminer l'attapulgite et les plantes ont été transférées sans ré-inoculation. Différentes concentrations de Zn ont été appliquées sous forme de $ZnSO_4$ à des concentrations de 0, 250 et 1000 µM. Chaque traitement a été répété quatre fois (Figure 18).

Les solutions nutritives ont été renouvelées deux fois par semaine et à chaque fois, le pH de la solution a été ajusté à 5,8 avec une solution de NaOH à 1 M ou de HCl à 1 M.

Les plantes non inoculées ont reçu la solution nutritive de base (telle que décrite précédemment pour la culture des plantes sur attapulgite) mais elle a été supplémentée avec 2,5 mM de KNO_3 (concentration finale de KNO_3 = 3 mM). Les plantes d'*A. vulneraria* inoculées avec les souches STM2683 et STM2682 ont également reçues la même solution nutritive de base avec seulement 0,5 mM de KNO_3.

Figure 18 : Disposition de l'expérimentation pour la culture des plantes d'*Anthyllis* dans la chambre de culture lors de l'exposition au zinc.

Après quatre semaines d'application de Zn, les racines de chaque plante ont été immergées dans une solution de $CaCl_2$ à 5 mM pendant 20 min pour éliminer les ions métalliques adhérant à la surface de la racine (Papoyan *et al.*, 2007). Les plantes récoltées ont été séparées en feuilles, racines et nodosités et par la suite séchées dans une étuve à 65 ° C pendant une semaine afin de déterminer les biomasses sèches des parties aériennes et racinaires.

Les autres paramètres mesurés sont :

- Le nombre et la biomasse des nodosités
- La fluorescence des feuilles : l'état de verdissement a été évalué une fois par semaine à l'aide du SPAD-502 chlorophyll Meter (Minolta Soil-Plant Analyses Development).
- La teneur en zinc dans les racines, les parties aériennes et les nodosités. Après la détermination de la matière sèche, chaque échantillon a été finement broyé. Une

aliquote de 10 mg de chaque broyat a été minéralisée dans 10 ml d'acide sulfurique (0,2 N) pendant 30 minutes dans un bain marie à 80°C. Après refroidissent, une aliquote filtrée du minéralisat a été utilisée pour déterminer la teneur en métal dans les feuilles, les racines et les nodosités au moyen d'un spectrophotomètre à absorption atomique (SpectrAA 220, Varian, Australie).

1.4. Analyses statistiques

Les données ont été analysées par ANOVA imbriquée, réalisée avec SAS après transformation logarithmique des données pour respecter l'hypothèse de normalité si nécessaire (SAS, 2004). Les facteurs analysés sont : la concentration de Zn en solution (3 concentrations), la souche de *Mesorhizobium* ou l'apport de nitrate (3 statuts de nutrition azotée), l'origine (sol contaminé ou sol non contaminé) et les sous-espèces végétales testées (4 sous-espèces) avec le facteur d'origine. Tous les facteurs ont été considérés comme étant fixés à l'exception du facteur sous-espèce qui était aléatoire. Les sommes des carrés de type III et l'approximation de Satterthwaite ont été utilisées. Les comparaisons des moyennes ont été réalisées avec des tests de moyens moindres carrés (SAS, 2004). Les chiffres sont toujours donnés avec des valeurs arithmétiques, même lorsque les valeurs ont été log-transformées avant l'analyse statistique.

2. Etude de la diversité phénotypique et génotypique des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote associées à des légumineuses métallicoles, présentes en Tunisie

Dans le but d'étudier la diversité des bactéries symbiotiques associées à des légumineuses métallicoles présentent au nord de la Tunisie, des prospections avec des prélèvements de sols ont été effectuées dans plusieurs anciennes mines.

2.1. Sites prospectés en Tunisie

Des échantillons de sols ont été prélevés sur trois anciens sites miniers (zinc et plomb) du nord-ouest de la Tunisie. Le premier site est celui de Fej El Hdoum du Gouvernorat de Séliana, le deuxième est l'ancienne mine de Fed Hassane du Gouvernorat de Jandouba et le troisième est l'ancienne mine de Bou Aouane du Gouvernorat de Jandouba. Cette zone se

caractérise par un climat méditerranéen avec d'abondantes précipitations à l'automne et une sécheresse estivale marquée (Figure 19).

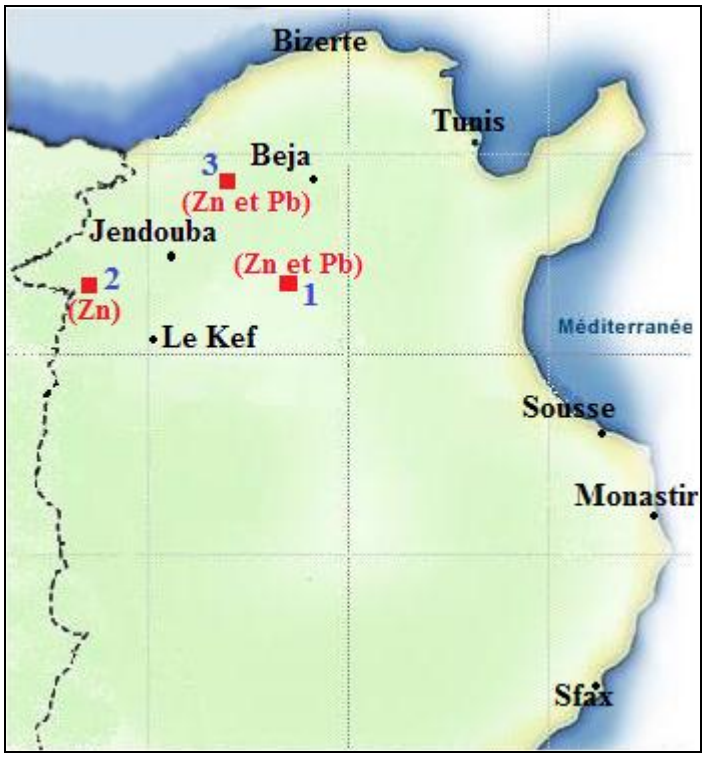


Figure 19 : Localisation des trois anciens sites miniers prospectés au nord de la Tunisie.

2.1.1. Aperçu général sur les sites miniers étudiés

2.1.1.1. Mine de Fej El Hdoum

Fej El Hdoum est l'un des principaux gisements de Pb-Zn tunisien. Cette mine est considérée comme un « glacier de sel » sous-marin et a été exploitée de 1892 jusqu'à 2004. Le site de Fej El Hdoum s'aligne sur le flanc occidental d'un petit massif, dans la région montagneuse située entre la plaine de la Mejerda et la plaine d'El Krib, à l'ouest de Téboursouk. Il est situé à 120 km au sud-ouest de Tunis. Le relief est assez accentué (montagne relativement élevée à 954 m). La pluviométrie annuelle moyenne est de l'ordre de 600 mm. Il y a de nombreuses sources dans cette région et la laverie de la mine a été alimentée par les sources avoisinantes (Babbou-Abdelmalek *et al.*, 2011) (Figure 20).

Cette ancienne mine sera le principal site retenu pour notre étude en Tunisie.

Figure 20 : Photo de la mine de Fej El Hdoum (9° 06' 12.70" E 36° 22' 44.56" N) (Google Earth).

2.1.1.2. Mine de Fed Hassène

Le district minier de Fedj Hassène a été exploité jusqu'en 1992. Le site est localisé à la confluence de l'Oued Medjerda et l'Oued El Melah, près de la frontière algéro-tunisienne à 10 km au Sud de la ville de Ghardimaou (36°25'54.09"N 8°25'46.01"E). Il fait partie des gisements polymétalliques à Pb-Zn-Cu-Hg de la zone des nappes de la Tunisie septentrionale (Bejaoui *et al.*, 2011).

2.1.1.3. Mine de Bou Aouane

La mine de Bou Aouane, abandonnée depuis 1986, est située au nord de la Tunisie (36°42'N 9°0'5"E) dans la partie amont du bassin versant de la Mejerda. Cette mine, qui fût exploitée essentiellement pour le Pb et le Zn, représente un complexe de minéralisation formé par deux gisements distants de 1 km l'un de l'autre. Elle est localisée dans la partie méridionale de la zone des nappes occupant une position intermédiaire entre la zone des écailles d'Aîn El Bey et l'aire d'affleurement des terrains de l'unité de Kassab.

Dans cette région, le relief est très peu accentué avec une altitude moyenne de l'ordre de 300 m. Le réseau hydrographique est très dense, représenté par de nombreux petits oueds se trouvant à sec en dehors des saisons pluvieuses et dont un grand nombre se déverse dans l'oued Kassab. Cet oued représente le principal oued pérenne de la région de Mejerda (Mezned *et al.*, 2008).

2.1.2. Observations sur le terrain et prélèvements de sol et de matériel végétal

2.1.2.1. Ancienne mine de Fej El Hdoum

Une première prospection a permis d'identifier une espèce de légumineuse, *Hedysarum coronarium* (Figure 21).

Figure 21 : *Hedysarum coronarium* observée sur le site minier de Fej El Hdoum.

- **Description d'*Hedysarum coronarium***

Hedysarum coronarium dénommée le sulla du nord ou sainfoin d'Espagne appartient à la famille des Fabacées. L'aire de distribution du genre *Hedysarum* s'étend sur l'Europe tempérée, les régions méditerranéennes de l'Afrique du nord, l'Asie mineure, la Sibérie et l'Amérique du nord, à partir de l'Arizona jusqu'au Canada et les régions arctiques. Quant à l'espèce *coronarium*, elle est rencontrée en Afrique du nord. En Tunisie, sa présence a été signalée dans toute la zone nord de la dorsale à partir de 300 mm de pluie par an. *H. coronarium* est cultivée pour la production de fourrage. A l'état spontané, elle pousse sur les marnes et les terres argilo-calcaires (Ben Jeddi, 2005).

Caractéristiques morphologiques d'*H. coronarium*

Au stade plantule, les cotylédons du sulla sont ovales, arrondis (10 x 7,8 mm), presque sessiles et glabres. Les feuilles sont formées de 3 à 5 paires de folioles ovales, assez grandes. Les fleurs sont longues de 14 à 20 mm en grappes allongées, denses et longuement pédonculées. Les gousses sont droites, larges de 4 à 5 mm, à articles couverts d'aiguillons (Figure 22) (Ben Jeddi, 2005).

Figure 22 : *Hedysarum coronarium* en fleur et avec des gousses en formation.

Lors de la première prospection (29/09/2009), des échantillons d'*Hedysarum* ont été prélevés avec leur propre sol (14 plantes d'*Hedysarum coronarium* prélevées dans 3 endroits différents de la mine).

Dans une parcelle agricole (ville d'El Krib, 36°22'34.67"N 9°10'20.71"E), située en dehors mais proche du site minier (environ 15 km), 14 plantes d'*Hedysarum coronarium* ont également été prélevées.

Toutes les plantes ont ensuite été placées dans des pots et cultivées jusqu'au 15 janvier 2010 dans une serre à l'Institut Supérieur Agronomique de Chott-Meriam (Université de Sousse). Ensuite, les plantes ont été transportées en février 2010 au Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes à Montpellier.

Sur le même site minier, des gousses de *Medicago orbicularis* et des plants de *Medicago* sp. ont également été observés. 7 plants de *Medicago* sp. ont été prélevés et cultivés en suivant la même procédure que pour d'*Hedysaum coronarium*.

- **Analyse des sols**

Des prélèvements de sol ont été effectués en surface (les 15 premiers centimètres) sur le site de Fej El Hdoum et sur la parcelle agricole à El Krib. Les échantillons ont été homogénéisés puis passés à travers un tamis (maille de 2 mm) pour des analyses granulométriques et physico-chimiques (Laboratoire d'Analyses des Sols d'Arras et Laboratoire d'analyses Celesta-Lab, Montpellier).

2.1.2.2. Prélèvements de sols et substrats miniers sur trois anciennes mines tunisiennes

Les prélèvements ont été effectués en mars 2010, sur les trois anciennes mines de Zn et de Pb (Figure 19) dans le but de rechercher des plants d'*Hedysarum coronarium* et de prélever des échantillons de sol.

Deux transects de 50 m ont été réalisés sur chacun des trois sites miniers. Le premier transect a été réalisé à l'extérieur du site minier proprement dit (**flèche a**, Figure 23) et le deuxième sur le site minier lui-même (**flèche b**, Figure 23). Des prélèvements de sol (un prélèvement tous les mètres) ont été effectués dans le but de réaliser le piégeage des bactéries symbiotiques en utilisant *Hedysarum coronarium* comme plante hôte.

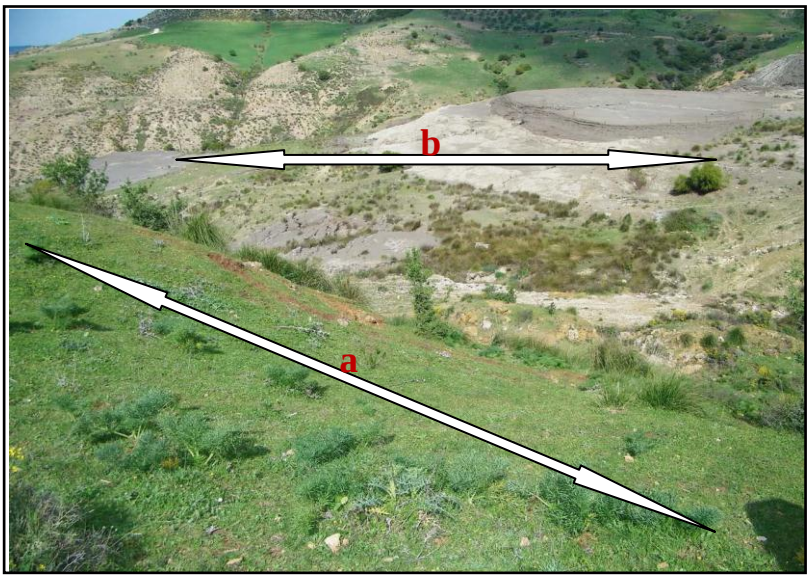


Figure 23 : Exemple de transect réalisé sur chaque ancien site minier pour le prélèvement des échantillons de sols.

2.1.2.3. Piégeage des bactéries symbiotiques présentes dans les échantillons de sol en utilisant *Hedysarum coronarium*

Le piégeage des bactéries symbiotiques d'*Hedysarum coronarium* potentiellement présentes dans les échantillons prélevés à l'extérieur et à l'intérieur des sites miniers tunisiens a été réalisé en conditions stériles en chambre de culture.

Les graines d'*Hedysarum coronarium* ont été stérilisées en surface avec de l'hypochlorite de calcium (3%) pendant 5 min, rincées à l'eau distillée (5 fois) et scarifiées. Les semences stériles ont été transférées sur des boîtes de Pétri stériles contenant de l'eau gélosée (10% d'agar-agar). Après 48 heures à 4 ° C puis 48 heures à 21 ° C, les plantules ont été transférées dans des tubes contenant deux centimètres de sol échantillonné placés au-dessus des granules d'attapulgite (Oil Dri US Special, Damolin, Denmark; http://www.damolin.dk). Les plantes ont été arrosées avec 20 ml de solution minérale nutritive sans azote (Bertrand *et al.*, 2001). Après 7 semaines d'incubation à 21 ° C, les plantes ont été récoltées et les racines ont été observées.

2.1.2.4. Multiplication des graines

Les plantes d'*Hedysarum coronarium* et de *Medicago* ont été rempotées dans des pots de 3 litres contenant du sol du terrain expérimental du CEFE (Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, CNRS, Montpellier) et placées sous l'ombrière (CIRAD de Baillarguet, Montpellier, France). Les gousses ont été récoltées après maturation et des semences ont été réutilisées pour multiplier ces génotypes d'*Hedysarum*, de *Medicago orbicularis* et *Medicago* sp. (Figure 24).

Figure 24 : Disposition des plantes sous ombrière au moment de la floraison.

2.1.2.5. Isolement des bactéries symbiotiques

Une dizaine de nodosités multilobées ont été prélevées sur chaque pied d'*Hedysarum coronarium* (Figure 25).

Les nodosités ont été désinfectées en surface dans une solution d'hypochlorite de calcium (3%) pendant 3 min. Après 7 rinçages de 1 min chacun dans de l'eau distillée stérile, chaque nodosité a été broyée stérilement à l'aide d'un pilon dans un tube Eppendorf de 1,5 ml contenant 50 µl d'eau distillée stérile. Une boite de Pétri de milieu YEM agar (Annexe 4) (Vincent, 1970) a été ensemencée avec chaque broyat de nodosité avec le pilon utilisé pour le broyage. Les boîtes de Pétri ensemencées ont été placées à 28°C. Après apparition des colonies sur boite (48 h), chaque colonie bactérienne représentant un phénotype particulier a été repiquée en partant à chaque fois d'une colonie isolée. Afin d'obtenir une culture pure, chaque isolat a subi au moins 2 cycles de purification sur boite de Pétri avant d'être cultivé en milieu liquide (15 ml d'YEM). Apres 1 jour de croissance à 28°C, la culture liquide a été utilisée pour la mise en collection à -80 °C et pour l'extraction d'ADN.

Figure 25 : Nodosités présentes sur les racines d'*Hedysarum coronarium* prélevée sur le site de Fej El Hdoum.

Le même protocole a été utilisé pour isoler les bactéries à partir des nodosités formées sur les racines de *Medicago* sp.. Les isolats ont été mis en collection et conservés à -80°C (Figure 26).

Figure 26 : Nodosités observées sur les racines de plants de *Medicago* sp. prélevés sur le site de Fej El Hdoum (Tunisie).

2.2. Etude phylogénétique des souches isolées à partir de nodosités d'*Hedysarum coronarium*

Afin de définir la position phylogénétique des souches isolées, 35 isolats issus de nodosités prélevées sur *H. coronarium* naturellement présente sur le site de Fej el Hdoum et 30 isolats issus de plants d'*H. coronarium* prélevés sur le site non contaminé ont été analysés. *Rhizobiun sullae*, STM2681^T (IS123^T), a été intégrée dans l'étude.

- **Extraction d'ADN**

Le protocole d'extraction de l'ADN est celui proposé par Chen et Kuo (1993). Cette méthode est adaptée aux bactéries Gram négatif, notamment celles qui produisent des exopolysaccharides. Une culture en milieu YEM liquide âgée d'un jour (15 ml) est

centrifugée pendant 10 min à 12 000 rotations par min (rpm) à température ambiante. Le culot cellulaire est transféré dans un tube Eppendorf après avoir été repris dans 1 ml d'eau milliQ stérile. Une deuxième centrifugation (10 min à 14 000 rpm) permet de récupérer le culot bactérien.

Ensuite, 400 µl de tampon de lyse (40 mM Tris Acetate pH 8, 20 mM Acetate de Sodium, 1 mM EDTA, 10 % SDS) est ajouté au culot et le tout est homogénéisé par aspiration et refoulement pendant 3 min dans le même tube Eppendorf. 133 µl de NaCl 5M sont ajoutés afin de précipiter les protéines et le tout est vortexé. Après incubation de 15 min dans de la glace, le tube est centrifugé 10 min à 14 000 rpm à 4°C. Le surnageant (environ 250 µl) est transféré dans un tube Eppendorf de 2 ml puis sous une hotte chimique, un volume équivalent (250 µl) de chloroforme est ajouté. Le tube est retourné une cinquantaine de fois jusqu'à apparition d'une solution "laiteuse". Le tube est ensuite centrifugé 5 min à 14 000 rpm à température ambiante. Toujours sous hotte chimique, le surnageant est transféré dans un nouveau tube Eppendorf de 1,5 ml, sans toucher la phase laiteuse intermédiaire.

L'ADN est ensuite précipité par l'ajout d'un volume d'isopropanol (c'est-à-dire environ 200 µl) et le tube est centrifugé 30 min à 14 000 rpm à température ambiante. Le culot d'ADN est ensuite lavé avec de l'éthanol à 70 % (100 µl) puis le tube est de nouveau centrifugé 5 min à 14 000 rpm à température ambiante. Le culot est ensuite séché 10 min au Speedvac (UniVAPO 100H, UniEquip, Martinsried, Germany) et est repris dans 100 µl de Tris EDTA+RNase (1X, 5 $\mu g.ml^{-1}$) (SGMA, EC 3.1.27.5). Le tube est ensuite laissé pendant une nuit à 4°C et le lendemain, l'ADN est dosé par spectrophotométrie (NanoDropR ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc.) puis conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

- **Amplification de l'ADN et séquençage**

Après extraction et dosage de l'ADN, si nécessaire une dilution a été réalisée pour obtenir une concentration de 50 $ng.ml^{-1}$ pour les amplifications d'ADN.

Amplification des gènes *rec*A et *atp*D

Les souches de *Rhizobium* ont été amplifiées pour les gènes *rec*A et *atp*D à l'aide d'un couple d'amorces spécifiques adapté d'après Gaunt *et al.* (2001) et Martens *et al.* (2008) respectivement (Tableau 5). Ces amorces ont été utilisées à la fois pour la PCR et les réactions de séquençage.

Le mélange réactionnel de 25 µl, contenait 2,5 mM de chacun des désoxyribonucléotides (dNTPs), 10 µM de chacune des deux amorces, 0,5 U de *Taq* ADN polymerase (Promega, M830B), le tampon à 5X green (Promega, M791A) fourni avec l'enzyme et 50 ng d'ADN génomique matrice.

Les réactions d'amplification (Polymerase Chain Reaction, PCR) ont été réalisées dans un thermocycleur « Thermo Electron's Px2 » avec le protocole suivant : dénaturation initiale de 5 min à 96 °C, suivie de 35 cycles de dénaturation (30 s à 96 °C), d'hybridation (30 s à 57 °C) et d'extension (à 72°C pendant 30 s pour le gène *rec*A et 2 min pour le gène *atp*D), puis une extension finale (7 min à 72°C). L'amplification des fragments a été vérifiée par migration sur gel d'électrophorèse d'agarose 1% contenant 1 $\mu g.ml^{-1}$ de bromure d'éthidium dans du tampon TAE 1X (40 mM de Tris-acétate, 1 mM EDTA, pH 8). La taille de la séquence d'ADN amplifiée a été évaluée sur gel grâce à un marqueur de poids moléculaire connu (Smart Ladder, Eurogentec, MW170002).

Après visualisation du gel, les séquences ont été purifiées à l'aide du kit GFX ™ PCR DNA and Gel Band Purification puis séquencées, par la société Genoscreen (Lille, France).

Amplification du gène de l'ARNr 16S

Après analyse des séquences partielles des gènes *rec*A et *atp*D**,** un représentant de chaque groupe été analysé par amplification du gène de l'ARN ribosomal 16S et séquençage. Les amorces utilisées (Wawrik *et al.*, 2005) sont présentées dans le tableau 5.

Le mélange réactionnel a été préparé de la même façon que celui qui a été utilisé pour les gènes *rec*A et *atp*D.

Les réactions d'amplification ont été réalisées dans un thermocycleur avec un cycle classique et identique à celui appliqué pour l'amplification du gène *atp*D. Les fragments amplifiés ont été purifiés à l'aide de kit « GFX TM PCR DNA and Gel Band Purification »puis séquencés par Genoscreen (Lille, France).

Amplification des gènes *nodA* et *nodC*

Quelques souches (n=8) ont été utilisées pour tester leurs amplifications avec les gènes de la nodulation. Plusieurs amorces du gène *nodA* et du *nodC* ont été testées pour essayer d'amplifier les souches isolées à partir d'*H. coronarium* (Tableau 5).

Les réactions d'amplification ont été réalisées dans un thermocycleur avec deux types de cycle :

- Classique : dénaturation initiale de 5 min à 95 °C, suivie de 35 cycles de dénaturation (1 min à 94 °C (*nod*C) et 30 s à 94°C (*nod*A)), d'hybridation (30 s à 55 °C pour le gène n*od*C et 30 s à 59°C pour le gène *nod*A) et d'extension (à 72°C pendant 1 min pour le gène *nod*C et 1 min à 72°C pour le gène *nod*A), puis une extension finale (3 min à 72°C).

- Touch-Down : dénaturation initiale de 5 min à 94 °C, suivie de 20 cycles de dénaturation (30 s à 94 °C), d'hybridation (30 s à une température initiale égale à 60°C qui décroit de 0,5°C chaque cycle) et d'extension (à 72°C pendant 42 s), puis 22 cycles de dénaturation (30 s à 94 °C), d'hybridation (30 s à 50 °C) et d'extension (à 72°C pendant 42 s), puis une extension finale (7 min à 72°C).

Tableau 5 : Amorces utilisées pour l'amplification des gènes *recA*, *atpD*, de l'ARNr 16S, *nodA* et *nodC* chez les *Rhizobium.*

Gène	**Nom de l'amorce**	**Séquence de l'amorce**	**Longueur de la séquence amplifiée (bp)**
***rec*A**	recA(63)f	ATCGAGCGGTCGTTCGGCAAGGG	≈ 600
	recA(504)r	TTGCGCAGCGCCTGGCTCAT	
***atp*D**	atpD352F	GGCCGCATCATSAACGTCATC	≈ 600
	atpD871R	AGAGCCGACACTTCMGARCC	
ARNr 16S	27f	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	≈ 1400
	1525r	AAGGAGGTGATCCAGCC	
***nod*A**	NodboxSme	ATCGCAGATGATCGTTATCC	≈ 800
	NodB1r.Sme.Sfr.Rg	GGRCCGTCRTCRAACGTCAGGTA	
	Nodboxuniv2	ATCNAAACAAWNRATTTTAC	
	NodAint5.r	CCGACCGAGTGAGCGATGCC	
	NodAint3.f	AGCCACATGGGCGTGTTGCG	
	NodAfbrad	GTYCAGTGGAGSSTKCGCTGGG	
	NodArbrad	TCACARCTCKGGCCCGTTCCG	

	nodCrhizo1F	AYGTHGTYGAYGACGGTTC	
	nodCrhizo1r	CGYGACAGCCANTCKCTATTG	
	NodCFu	AYGTHGTYGAYGACGGITC	
	NodCF2	AYGTHGTYGAYGACGGCTC	
	NodCF4	AYGTHGTYGAYGACGGATC	
***nod*C**	NodCF5	AYGTHGTYGAYGACGGGTC	≈ 800
	nodCIr	CGYGACAGCCANTCKCTATTG	
	NodCfa	GGCAGGCTTTCGAACTGAGTA	
	NodCfb	GGCAGGCTTTCGAACTGAATA	
	NodCia	CGTGACAACCAGTCGCTATTG	
	NodCib	CGTGACAACCAGTCGCTATTC	

- **Analyse des séquences nucléotidiques**

Correction et alignement des séquences

Les séquences nucléotidiques ont été vérifiées et corrigées manuellement à l'aide de Finch TV (v.1.4), puis alignées à l'aide du logiciel ClustalX (v.1.81) (Thompson *et al.*, 1997), les alignements étant recorrigés manuellement à l'aide de GeneDoc (v.2.7) (Nicholas et Nicholas, 1997).

Détermination des groupes

Dans le but de grouper ensemble les souches identiques, les séquences corrigées et alignées ont été comparées à l'aide du logiciel Mothur v.1.4.0 (Schloss *et al.*, 2009). A l'issue de ce travail, une souche représentante par groupe de séquences identiques a été retenue pour construire l'arbre phylogénétique.

Arbres phylogénétiques

Les arbres phylogénétiques ont été réalisés avec les séquences des différentes souches représentantes. Nous avons inclus lors des alignements des séquences de référence obtenues à partir de la banque de données GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Ces

références correspondent aux séquences disponibles pour les espèces génomiques décrites chez les rhizobium.

Les phylogénies ont été construites à l'aide du logiciel Mega 5 (Tamura *et al.*, 2011) avec les méthodes suivantes :

- Pour les gènes *recA* et *atpD* : méthode du maximum de vraisemblance avec le modèle d'évolution GTR qui évalue le meilleur arbre en terme de probabilité, en tenant compte d'un modèle d'évolution moléculaire sous-jacent à nos données. La fiabilité des nœuds a été testée sur 1000 répliques (bootstrap).
- Pour l'ADN ribosomal 16S : méthode de Neighbour-Joining selon le modèle Kimura à deux paramètres. La solidité des arbres a été testée en utilisant un bootstrap égal à 1000.

2.3. Caractérisation de la tolérance bactérienne aux métaux

Les représentants des groupes bactériens définis par analyse des séquences du gène *recA* ont été testés pour la tolérance en métaux sur milieu YEM liquide, en microplaque de 96 puits, en présence de zinc (apporté sous forme de $ZnSO_4$) à des concentrations croissantes de 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8 ; 10 ; 12 ; 16 ; 20 et 24 mM ou bien en présence de cadmium (sous la forme $CdCl_2$) aux concentrations de 0,02 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,3 ; 0,5 ; 0,8 ; 1 ; 2 ; 3 ; 5 et 7 mM. Les isolats testés ont été comparés avec un témoin résistant aux métaux, *Mesorhizobium metallidurans* STM2683, et un témoin sensible, *Mesorhizobium* sp. STM2682.

Les différentes souches ont été pré-cultivées dans un milieu YEM liquide pendant 24 heures sous agitation. Avant inoculation, chaque culture a été ajustée à une densité optique (OD_{600nm}) égale à 0,5. 150 µl de milieu YEM contenant la concentration de Zn/Cd correspondante ont été répartis dans les puits de la microplaque avant d'ajouter 10 µl d'inoculum pour chaque souche bactérienne. Les cultures bactériennes ont été par la suite placées à 28° C avec agitation orbitale (150 rpm) et la croissance a été suivie par des relevés de DO_{600nm} (trois répétitions pour chaque souche) en utilisant le spectrofluorimètre (TECAN INFINI M200) pendant deux semaines. La plus faible concentration qui a inhibé la croissance bactérienne a été retenue comme la concentration minimale inhibitrice (CMI) (Andrews, 2001).

2.4. Hybridation ADN-ADN

Les Hybridations ADN-ADN ont été effectuées par le service DSMZ. Les cellules sont éclatées en utilisant le système TS 0,75 KW (IUL Instruments, Allemagne) et l'ADN dans le lysat brut a été purifié par chromatographie sur hydroxyapatite (Cashion *et al.*, 1977).

L'hybridation ADN-ADN est effectuée selon le protocole de De Ley *et al.* (1970) en tenant compte des modifications de Huss *et al.* (1983) et en utilisant un spectrophotomètre « Cary 100 Bio UV / VIS ».

Deux souches, STM9086 et STM9082, éloignées phylogénétiquement de la souche type de *R. sullae* IS123^T sur la base des séquences *recA* et *atpD* ont été testées. Une autre souche, *R. mongolensis* (STM246), a été utilisée comme référence.

2.5. Tests de nodulation et de fixation

Des isolats bactériens représentatifs des différents génotypes *rec*A et la souche type de *R. sullae* ont été testés pour la nodulation et la fixation de l'azote avec la plante-hôte *H. coronarium*. Les graines préalablement scarifiées et stérilisées ont été placées sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose à 10%, puis elles ont été conservées en chambre froide à 5 ° C pendant 48 heures, avant d'être transférées dans une chambre de culture. Une semaine après le semis, les plants ont été transplantés dans des tubes de verre contenant de l'attapulgite calcinée stérile (Oil Dri US Special, Damolin, Denmark; http://www.damolin.dk) et 40 ml de solution nutritive minérale sans azote (Bertrand *et al.*, 2001). Chaque tube a été inoculé avec une suspension bactérienne obtenue à partir d'une culture en fin de phase exponentielle de croissance. Dix réplicas ont été réalisés pour chaque traitement. Après 7 semaines de culture en chambre de culture (16 heures lumière à 22 ° C et 8 heures obscurité à 18 ° ; 60 - 70% d'humidité relative), la fixation d'azote a été estimée par pesée des matières végétales sèches et en mesurant la fluorescence des feuilles à l'aide du SPAD-502 chlorophyll Meter (Minolta Soil-Plant Analyses Development). Les plantes non inoculées et les plantes fertilisées avec 3 mM de KNO_3 ont été retenues comme témoins. Des analyses de variance ont été effectuées en utilisant XLSTAT 2011.

3. Adaptation d'*Anthyllis vulneraria*, d'*Hedysarum coronarium* et de *Medicago orbicularis* à la contamination métallique et influence des bactéries symbiotiques

Dans le but d'évaluer l'adaptation d'*Anthyllis vulneraria,* d'*Hedysarum coronarium* et de *Medicago orbicularis* sur des sols contaminés, nous avons effectué une expérience d'implantations réciproques avec ces trois espèces végétales.

3.1. Sols

Trois types de substrats ont été utilisés pour l'expérimentation :

(1) Substrat issu de l'ancienne mine de Zn et Pb de Fej El Hdoum,

(2) Substrat issu de l'ancienne mine de Zn de Saint Laurent le Minier « mine des Avinières »,

(3) Substrat issu du site du Col du Vent (Causse du Larzac, France).

Les caractéristiques physico-chimiques pour chaque site sont présentées dans le tableau 6.

Les substrats provenant des sites de Fej El Hdoum et de Saint Laurent le Minier présentent de fortes teneurs en zinc, plomb et cadmium tandis que le sol prélevé au Col du Vent n'est pas contaminé par des métaux (Tableau 7).

Tableau 6 : Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de sol prélevés du site de Fej El Hdoum, des Avinières et de Col du Vent.

Site	pH	Calcaire total ($g.kg^{-1}$)	Argiles (< 2µm) p.1000	P_2O_5 ($g.kg^{-1}$)	K_2O ($g.kg^{-1}$)	MO ($g.kg^{-1}$)	Rapport C/N	Azote total ($g.kg^{-1}$)	CEC ($C_{mol}.kg^{-1}$)
Fej El Hdoum	7,9	434	225	0,068	0,099	20,6	36,4	0,33	7,4
Avinières	8,5	690	101	0,02	0,042	27,9	14,7	1,1	2,5
Col du Vent	7,2	174	79	1,145	<0,01	18,4	53,5	0,2	1,1

Tableau 7 : Concentration en métaux totaux et après extraction à l'EDTA et le DTPA dans les échantillons du site de Fej El Hdoum, des Avinières et de Col du Vent. Les résultats sont exprimés en mg/kg, sauf pour le Fer total où les résultats sont exprimés en g/100g.

Site	Zn Total	Zn EDTA	Zn DTPA	Pb Total	Pb EDTA	Pb DTPA	Cd Total	Cd EDTA	Cd DTPA	Fe Total	Sr Total	Ca Total	Ar Total
Fej El Hdoum	10200	3290	731	3350	639	42,5	23,7	7,99	2,17	2,95	6520	17,1	39,5
Avinières	137000	9280	678	38900	5270	68,5	927	83.3	10,4	4,94	882	6.27	1270
Col du Vent	233,54	15	-	59,61	40	-	1,71	-	-	-	-	-	-

3.2. Matériel biologique

La première espèce utilisée est *Anthyllis vulneraria* sous-espèce *carpatica* qui pousse naturellement sur le site des Avinières.

Les deux autres espèces utilisées pour cette expérimentation sont les légumineuses *Hedysarum coronarium* et *Medicago orbicularis* présentes spontanément sur l'ancienne mine de Fej El Hdoum. Les graines utilisées pour l'expérimentation sont issues de la multiplication de ces espèces (**voir 2.1.2.4.**).

3.3. Conduite de l'expérimentation

Les plantes d'*Anthyllis vulneraria* sous-espèce *carpatica*, d'*Hedysarum coronarium* et de *Medicago orbicularis* ont été cultivées soit en étant alimentées avec une solution nutritive (Bertrand *et al.*, 2001) supplémentée avec 3 mM KNO_3, soit inoculées avec la souche bactérienne correspondante (10^9 UFC. ml^{-1} par plante) et alimentées avec la même solution nutritive de base mais contenant seulement 0,5 mM de KNO_3.

L'expérience a été réalisée dans des tubes en verre de 70 ml contenant un mélange de 50% du stérile minier ou de sol non contaminé + 50% d'attapulgite calcinée (Oil Dri US Special, Damolin, Denmark; http://www.damolin.dk) afin de disposer d'un support de culture présentant une porosité et une aération compatible avec le développement des plantes. Tous les tubes ont été stérilisés deux fois à 120° C pendant 20 min à 24 heures d'intervalle.

Les graines préalablement scarifiées et stérilisées ont été disposées sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose (10% d'agar-agar) et ont été maintenues dans une chambre froide à 5 ° C pendant 48 heures, avant d'être transférées à 22°C. Toutes ces étapes ont été faites en conditions stériles afin d'éviter toute contamination fongique ou bactérienne.

Une semaine après le semis, les plants ont été transférés dans les tubes contenant les différents substrats et mis dans une chambre de culture (16 heures lumière à 22°C et 8 heures obscurité à 18°C ; 60–70% d'humidité relative) pendant deux mois.

3.4. Inoculum

Dans le but de déterminer l'influence des bactéries symbiotiques sur la tolérance et la croissance des deux légumineuses, chaque espèce a été inoculée avec des bactéries symbiotiques (10^9 CFU.ml^{-1}).

Anthyllis vulneraria sous-espèce *carpatica* a été inoculée avec la souche métallicole *Mesorhizobium metallidurans* (STM2683) et *Hedysarum coronarium* a été inoculée avec la souche STM9069 isolée à partir d'un pied d'*H. coronarium* prélevé sur le site de Fej El Hdoum. *M. orbicularis* a été inoculée avec une association de trois souches isolées à partir de nodosités prélevées sur des plants de *Medicago* prélevés sur le site minier de Fej El Hdoum.

A la récolte, les racines des plantes ont été soigneusement rincées avec de l'eau distillée pour se débarrasser du sol et de l'attapulgite puis un passage avec une solution de $CaCl_2$ à 5 mM pendant 20 min a été réalisé pour éliminer les ions métalliques adhérant à la surface de la racine (Papoyan *et al.*, 2007). Dix plantes ont été récoltées et ont été séparées en feuilles, racines et nodosités et mises par la suite dans une étuve à 60°C pendant une semaine.

Les paramètres mesurés sont les suivants :

- Poids sec des parties aériennes et racinaires

- Nombre de nodosités

- Fluorescence au niveau des feuilles : le jour de la récolte, la teneur en chlorophylle a été estimée par une mesure de la fluorescence avec le SPAD-502 chlorophyll Meter (Minolta Soil-Plant Analyses Development).

3.5. Les analyses statistiques

Les analyses statistiques des résultats ont été effectuées avec le logiciel XLSTAT. Les tests ANOVA ont été réalisés avec un risque alpha général à 5%.

Chapitre III

Absorption et accumulation du zinc chez Anthyllis vulneraria, légumineuse retenue comme modèle d'étude

Chapitre III : Absorption et accumulation du zinc chez Anthyllis vulneraria, légumineuse retenue comme modèle d'étude

1. Introduction

La phytostabilisation des anciens sites miniers est une stratégie de bioremédiation qui vise à diminuer les transferts d'ETMs depuis les sites très contaminés vers le milieu environnant. Frérot *et al.* (2006) ont montré qu'*Anthyllis vulneraria* sous-espèce *carpatica*, une Fabacée présente spontanément sur l'ancien site minier des Avinières à 40 km au nord de Montpellier, lorsqu'elle est présente en première séquence de végétation favorise l'installation d'autres espèces végétales sur des déblais miniers à fortes teneurs en zinc et en plomb. Pour se développer en présence de fortes teneurs en ETMs, *A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* doit être associée à un partenaire symbiotique, *Mesorhizobium metallidurans*, qui est lui-même très adapté à de fortes teneurs en zinc et cadmium (Vidal *et al.*, 2009). Une autre sous-espèce, *A. vulneraria* sous-espèce *boscii* a également été observée sur l'ancien site minier d'Eylie dans les Pyrénées ariégeoises où a été exploité le zinc. Bien qu'elle soit tolérante aux métaux, il a été montré que sa réponse aux ETMs est différente de celle de la sous-espèce *carpatica*. Deux autres populations d'*A. vulneraria* ont été observées sur des sols non contaminés. *A. vulneraria* sous-espèce *praepropera*, sur les sols calcaires du Causse du Larzac et *A. vulneraria* sous-espèce *vulneraria* qui a été trouvée sur le site de Saint Côme (Causse Méjean). Ces sous-espèces ont été testées vis-à-vis de leurs adaptations aux sols fortement contaminés par des métaux (Mahieu *et al.*, 2012). Cependant, aucune donnée n'est disponible sur l'accumulation des métaux et en particulier du zinc chez les quatre sous espèces

d'*Anthyllis vulneraria* cultivées en présence d'azote minéral ou lorsqu'elles sont associées à des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote.

Le travail présenté dans ce chapitre vise à étudier l'accumulation de Zn de quatre sous-espèces d'*A. vulneraria*, exposées à des concentrations croissantes en Zn et à analyser comment la présence de la bactérie symbiotique peut influencer l'absorption et l'accumulation de Zn dans les parties aériennes, les racines et les nodosités.

2. Résultats

Le matériel et les méthodes utilisées pour cette partie sont présentées dans le **chapitre II**, **partie 1**.

2.1. Biomasse aérienne et racinaire

Lorsque les plantes non inoculées ont été alimentées en azote avec 3 mM de KNO_3 et ont été exposés à 250 µM de Zn pendant quatre semaines dans des conditions hydroponiques, aucun effet significatif n'a été observé sur la biomasse aérienne et racinaire chez les quatre sous-espèces d'*Anthyllis vulneraria* (Figure 27a, 27b). Des résultats contrastés ont été obtenus sur les plantes appartenant aux différentes sous-espèces exposées à 1000 µM de Zn (Figure 27a). La production de la matière sèche chez *A. vulneraria* sous-espèce *boscii*, *praepropera* et *vulneraria* a été significativement réduite (24-28%) alors qu'aucune réduction significative n'a été observée sur la biomasse aérienne et racinaire chez la sous-espèce *carpatica*.

L'analyse des résultats a montré qu'il y avait une interaction entre la concentration en Zn, la présence d'azote minéral ou de l'inoculation et les sous-espèces d'*Anthyllis* (Tableau 8) : l'exposition de la sous-espèce *carpatica* inoculée avec les souches STM2683 ou STM2682 à 250 µM ou à 1000 µM de Zn ne réduit pas la production de la biomasse aérienne et racinaire, contrairement aux trois autres sous-espèces d'*A. vulneraria* à 1000 µM de Zn (la sous-espèce *boscii* inoculée avec la souche STM2682 et les sous-espèces *vulneraria* et *praepropera* inoculées avec la souche STM2683) qui ont une réduction de leur biomasse (Figure 28a, 28b). De plus, avec la sous-espèce *carpatica* une augmentation significative de la biomasse aérienne a été observée avec la souche STM2683 lorsqu'elle est exposée à 1000 µM de Zn ou avec la souche STM2682 lorsqu'elle est exposée à 250 µM de Zn (Figure 28a, 28b).

Lorsque les sous-espèces *boscii*, *praepropera* et *vulneraria* inoculées avec la souche STM2683 sont exposées à 1000 µM de Zn, la production de biomasse racinaire a été réduite. La même tendance a été observée avec les sous-espèces *boscii* et *vulneraria* inoculées avec la souche STM2682 alors qu'aucun effet n'a été observé avec la sous-espèce *praepropera* (Figure 28b).

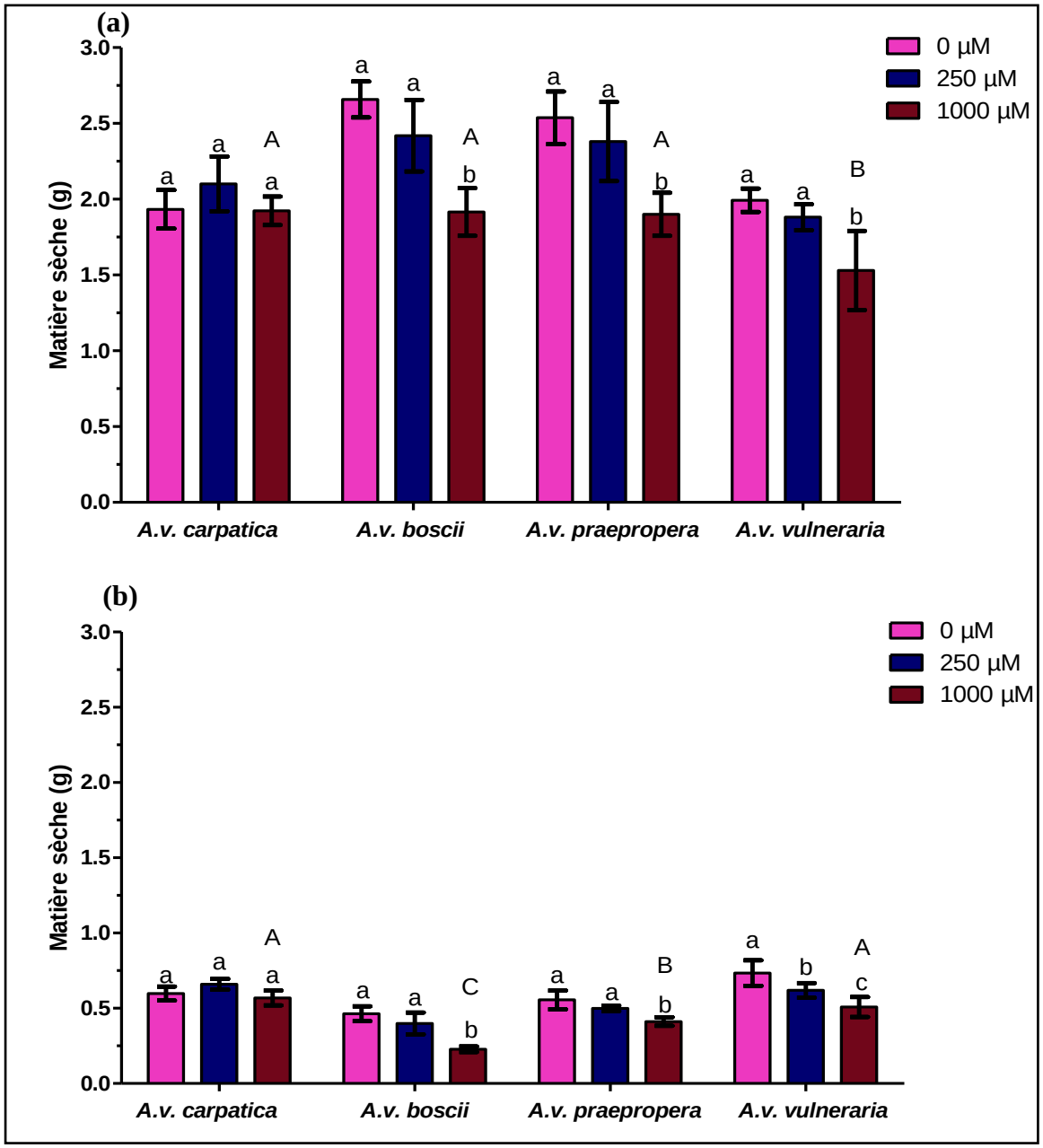


Figure 27 : Biomasse aérienne (en gramme par plante (a) et biomasse racinaire (b) des quatre sous-espèces d'*A. vulneraria* (*A. vulneraria* sous-espèce *carpatica*, *boscii*, *praepropera* et *vulneraria*) alimentées en azote avec3 mM KNO_3 dans la solution nutritive hydroponique et exposées à trois concentrations de zinc (0, 250 et 1000 µM).

Les différences significatives au seuil de 5% pour chacun des différents traitements sont notées avec des lettres différentes. Les lettres en minuscules se réfèrent à des comparaisons de la biomasse aérienne et racinaire au sein de la même sous-espèce pour différentes concentrations de Zn ajoutées à la solution nutritive. Les lettres en majuscules sont utilisées pour comparer la biomasse entre les différentes sous-espèces en présence de 1000 µM de Zn.

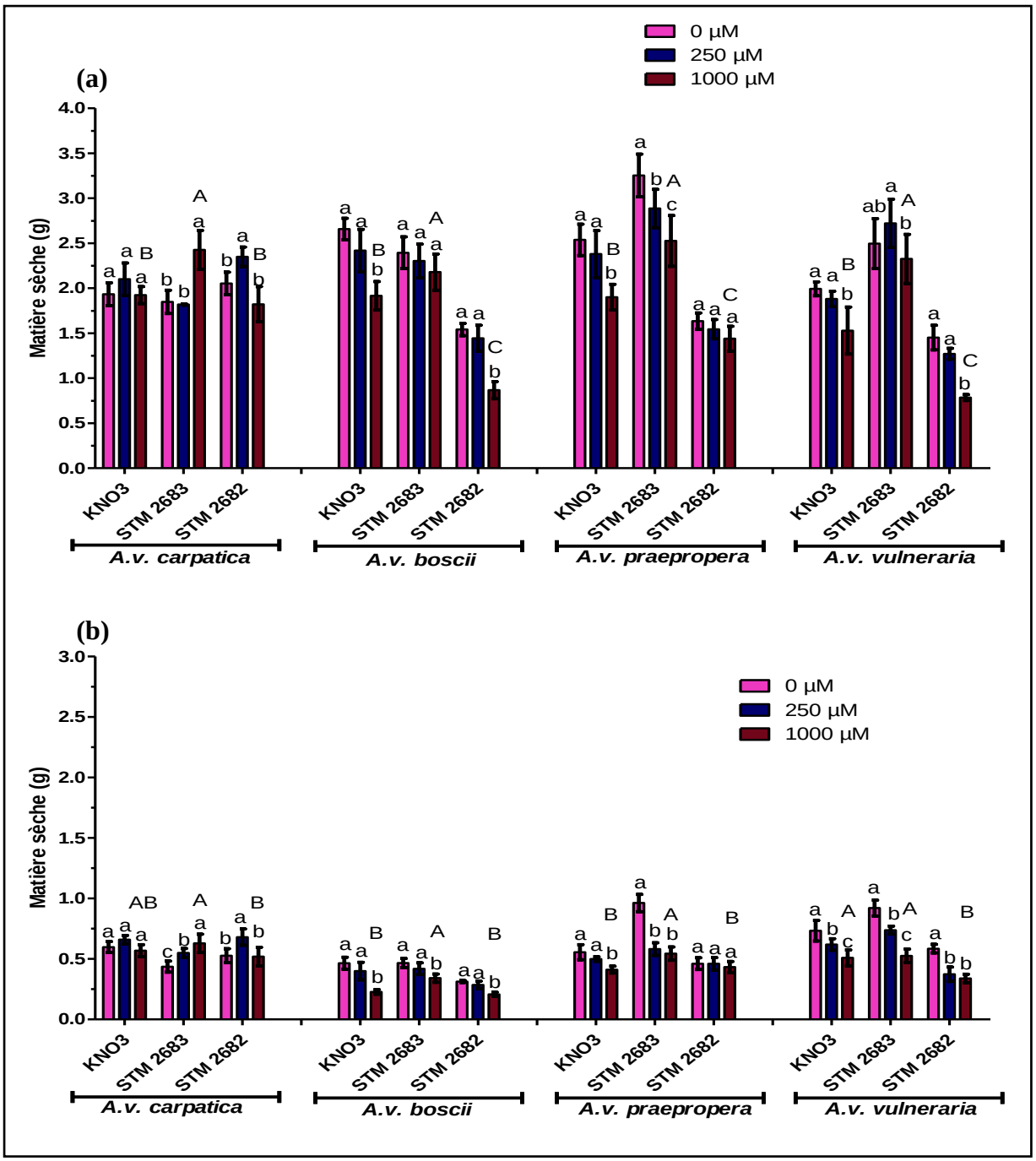


Figure 28 : Biomasse aérienne (a) et racinaire (b) des quatre sous-espèces d'*A. vulneraria* (*A. vulneraria* sous-espèces *carpatica*, *boscii*, *praepropera* et *vulneraria*) inoculées avec les bactéries symbiotiques STM2683 et STM2682 dans une solution nutritive hydroponique avec les trois concentrations de zinc (0, 250 et 1000 µM).

Les différences significatives au seuil de 5% pour chacun des différents traitements sont notées avec des lettres différentes. Les lettres en minuscules font référence aux comparaisons des biomasses aérienne et racinaire au sein de chaque sous-espèce et pour les différentes concentrations de Zn ajoutées à la solution nutritive. Les lettres en majuscules font référence à la comparaison des biomasses obtenues pour les trois traitements : KNO_3, souches STM2683 et STM2682 en présence de 1000 µM de Zn et pour chaque sous-espèce.

Tableau 8 : Analyse de l'ANOVA des concentrations de zinc et des bactéries symbiotiques sur la biomasse aérienne et racinaire, la biomasse des nodosités, la fluorescence des feuilles (SPAD) et la teneur en zinc chez les quatre sous-espèces d'*Anthyllis vulneraria*.

Facteur d'interaction	DF	[Zn] dans les parties aériennes	[Zn] dans les racines	Biomasse aérienne	Biomasse racinaire	Valeurs (SPAD)	DF	Biomasse des nodosités	[Zn] dans les nodosités
Concentration	**2**	**112,98 *****	**744,34 *****	**4,73 n.s**	**3,92 n.s**	**1031,54 *****	**2**	**0,99 n.s**	**105,54 *****
Concentration*Origine	**2**	**2,54 n.s.**	**8,39 ****	**0,39 n.s**	**0,91 n.s**	**35,49 *****	**2**	**0,01 n.s**	**0,41 n.s**
Origine	**1**	**7,30 n.s.**	**0,14 n.s.**	**0,01 n.s**	**0,71 n.s**	**6,31 *****	**1**	**0,05 n.s**	**2,74 n.s**
Sous-espèces(Origine)	**2**	**0,62 n.s.**	**0,64 n.s.**	**0,96 n.s**	**5,38 ***	**328,43 *****	**2**	**2,63 n.s**	**0,63 n.s**
Inoculation	**2**	**1,82 n.s.**	**7,77 ***	**7,25 ***	**4,94 n.s**	**444,19 *****	**1**	**21,45 ***	**0,86 n.s**
Inoculation*Origine	**2**	**2,69 n.s.**	**0,49 n.s.**	**1,24 n.s.**	**1,08 n.s**	**53,05 *****	**1**	**1,37 n.s**	**0,14 n.s**
Concentration*Inoculation	**4**	**1,68 n.s.**	**4,90 ****	**3,75 n.s.**	**0,57 n.s**	**32,53 *****	**2**	**0,64 n.s**	**4,88 n.s**
Concentration*Inoculation*Origine	**4**	**1,41 n.s.**	**0,60 n.s.**	**0,96 n.s.**	**2,50 n.s**	**18,79 *****	**2**	**0,12 n.s**	**0,45 n.s**
Concentration*Sous-espèces(Origine)	**4**	**4,99 ****	**0,76 n.s.**	**3,54 n.s.**	**5,68 ****	**73,18 *****	**4**	**1,05 n.s**	**15,46 ****
Inoculation*Sous-espèces(Origine)	**4**	**1,04 n.s.**	**1,29 n.s.**	**12,07 ****	**5,22 ****	**48,59 *****	**2**	**3,15 n.s**	**6,11 n.s**
Concentration*Inoculation*Sous-espèces (Origine)	**8**	**37,19 *****	**94,96 *****	**5,05 *****	**4,86 *****	**11,05 *****	**4**	**2,25 n.s**	**12,03 *****

n.s. pas de différence significative; * indique une différence significative à P <0,05, ** indiquent une différence significative à P <0,01 et *** indiquent une différence significative à P <0,0001

2.2. Biomasse des nodosités

Les sous-espèces d'*Anthyllis vulneraria boscii*, *praepropera* et *vulneraria* présentaient une biomasse de nodosités plus élevée avec la souche avec STM2683. Avec la sous-espèce *carpatica*, il n'a pas été observé de différence de nodulation entre les deux souches, sauf lorsque les plantes ont été exposées à 1000 µM Zn avec une biomasse de nodosités plus élevée avec la souche STM2683 (Figure 29). L'analyse (ANOVA) de la biomasse des nodosités ne révèle cependant aucune interaction entre la concentration en Zn, le type de souche et les sous-espèces végétales (Tableau 8).

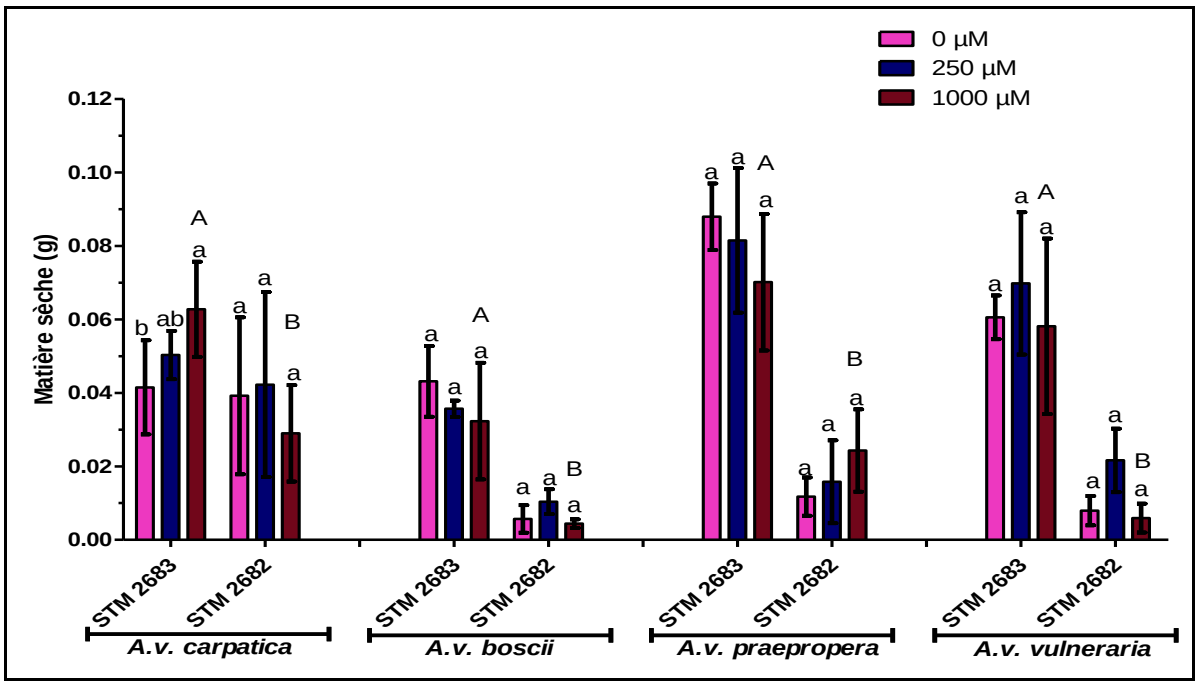


Figure 29 : Biomasse des nodosités des quatre sous-espèces d'*A. vulneraria* (*A.v.* sous-espèce *carpatica*, *A.v.* sous-espèce *boscii*, *A.v.* sous-espèce *praepropera* et *A.v.* sous-espèce *vulneraria*) inoculées avec les bactéries symbiotiques STM2683 ou STM2682.

Les différences significatives au seuil de 5% pour chacun des différents traitements sont notées avec des lettres différentes. Les lettres en minuscules concernent les comparaisons de biomasses des nodosités pour une même sous-espèce et une même souche pour différentes concentrations en Zn ajoutées à la solution nutritive. Les lettres en majuscules sont relatives à la comparaison des biomasses de nodosités pour les différents traitements de chaque sous-espèce d'*Anthyllis* (KNO_3, souche STM2683, souche STM2682) exposée à 1000 µM de Zn.

2.3. Mesures de fluorescence des feuilles

Les valeurs SPAD ont montré des différences significatives entre les concentrations de Zn, les sous-espèces et l'inoculation. Ainsi, une interaction complexe a été observée (Tableau 8).

Une diminution significative a été observée à 250 et 1000 µM de Zn chez les quatre sous-espèces d'*A. vulneraria* alimentées en azote avec 3mM KNO_3 mais la baisse des valeurs SPAD était beaucoup plus importante chez les sous-espèces *boscii, praepropera* et *vulneraria* en particulier lorsque 1000 µM de Zn a été appliquée (Figure 30). En outre, à 1000 µM de Zn, la fluorescence des feuilles la plus élevée a été enregistrée chez les plantes de la sous-espèce *carpatica* alimentées avec 3 mM de KNO_3. Ces résultats sont en accord avec l'aspect vert et le bon état physiologique des plantes à la récolte (Figure 31).

Pour la sous-espèce *carpatica*, aucune différence dans la fluorescence (valeurs SPAD) n'a été observée lorsqu'elle est exposée à 250 ou 1000 µM de Zn (Figure 30), alors que pour les autres sous-espèces, une exposition à 1000 µM de Zn a induit une baisse significative des valeurs SPAD et a généré des symptômes de phytotoxicité visibles sur les feuilles (Figure 31).

Lorsque les plantes ont été inoculées avec la souche STM2683, l'ajout de 250 µM de Zn dans la solution nutritive n'a pas induit de diminution des valeurs de la fluorescence des feuilles chez la sous-espèce *carpatica*, *boscii* et *praepropera*. En présence de 1000 µM de Zn, la fluorescence des feuilles a diminué de façon très importante chez les sous-espèces *boscii, praepropera* et *vulneraria* quelle que soit la souche inoculée alors qu'un niveau de fluorescence élevé a été maintenu chez la sous-espèce *carpatica***.**

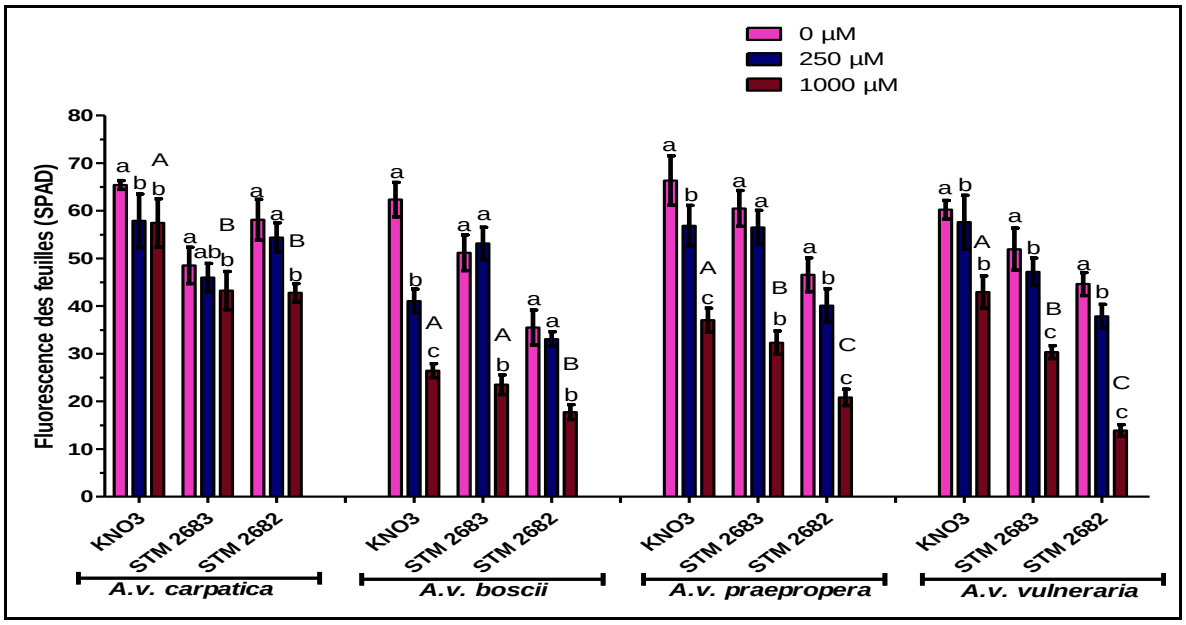


Figure 30 : Mesures de fluorescence des feuilles chez les quatre sous-espèces (*A. vulneraria carpatica*, *boscii*, *praepropera* et *vulneraria*) alimentées avec 3 mM de KNO_3 ou inoculées avec des bactéries symbiotiques et exposées à trois concentrations de zinc (0, 250 et 1000 µM).

Les différences significatives au seuil de 5% pour chacun des différents traitements sont notées avec des lettres différentes. Les lettres minuscules se réfèrent à la comparaison des teneurs en chlorophylle chez la même sous-espèce pour les différentes concentrations en Zn. Les lettres majuscules font référence à la comparaison, pour une même espèce d'*Anthyllis*, de la teneur en chlorophylle pour les trois traitements: KNO_3, souche STM2683 et souche STM2682 en présence de 1000 µM de Zn.

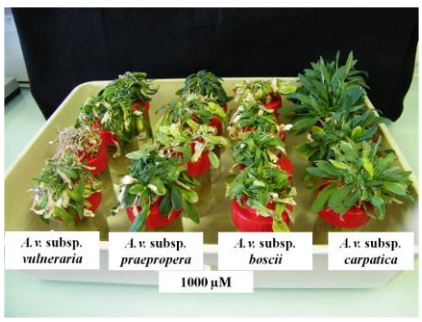
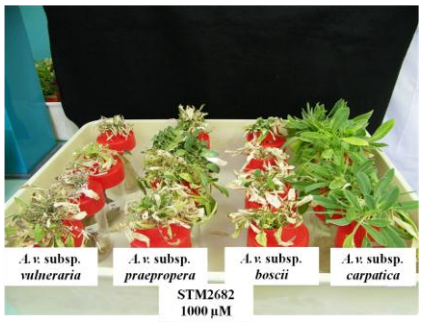
3 mM KNO_3	**STM2683**	**STM2682**
		

Figure 31 : Aspects des différentes sous-espèces d'*Anthyllis vulneraria* cultivées en hydroponie avec une solution nutritive contenant 1000 Zn µM. Chaque espèce a été cultivée en présence de 3 mM de KNO_3 ou inoculée soit avec la souche STM2683, soit avec la souche STM2682.

2.4. Concentration en zinc dans les parties aériennes et racinaires des différentes sous-espèces d'*A. vulneraria*

La concentration en Zn dans les racines des plantes appartenant aux différentes sous-espèces d'*A. vulneraria* alimentées avec 3 mM de KNO_3 atteignait 10 000 µg de Zn. g^{-1} de matière sèche pour toutes les sous-espèces lorsque les plantes ont été exposées à 250 µM de Zn et était de 50 000 µg de Zn. g^{-1} de matière sèche pour les sous-espèces *carpatica*, *praepropera* et *vulneraria* exposées à 1000 µM de Zn. La concentration en zinc dans les racines était plus faible avec la sous-espèce *boscii* (Figure 32b).

Au niveau des parties aériennes, la concentration en Zn est restée relativement faible si on la compare aux concentrations en Zn au niveau des racines, à l'exception de la sous-espèce *carpatica* pour laquelle on a observé 14 000 µg de Zn. g^{-1} de matière sèche aérienne lorsque les plantes ont été exposées à 1000 µM de Zn, (Figure 32a). La concentration en Zn au niveau des parties aériennes chez la sous-espèce *carpatica* est de 5 à 12 fois plus élevée que celle enregistrée chez les sous-espèces *boscii*, *praepropera* et *vulneraria*.

Les concentrations en zinc dans les racines des sous-espèces *carpatica*, *praepropera* et *vulneraria* est significativement plus élevée chez les plantes cultivées avec 3 mM de KNO_3 que chez les plantes inoculées soit avec la souche STM2683, soit avec la souche STM2682 (Figure 33b). La teneur en Zn a ainsi été réduite dans les parties racinaires d'au moins 60% pour des plantes des sous-espèces *carpatica*, *praepropera* et *vulneraria* qui ont été inoculées avec les souches STM2683 ou STM2682 par rapport à celles cultivées en présence de 3 mM de KNO_3. Cette diminution n'a pas été observée avec la sous-espèce *boscii* (Figure 33b, Tableau 8). Le point le plus remarquable est la diminution drastique de la concentration en Zn dans les parties aériennes des plantes de la sous-espèce *carpatica* exposées à 1000 µM de Zn et nodulées avec les souches symbiotiques métallicoles ou non métallicoles de *Mesorhizobium.*

La concentration en Zn dans les parties aériennes a en effet été réduite de 2,5 à 3 fois pour les plantes inoculées avec les souches STM2683 ou STM2682 (Figure 33a). Cette tendance n'a pas été observée avec les trois autres sous-espèces étudiées.

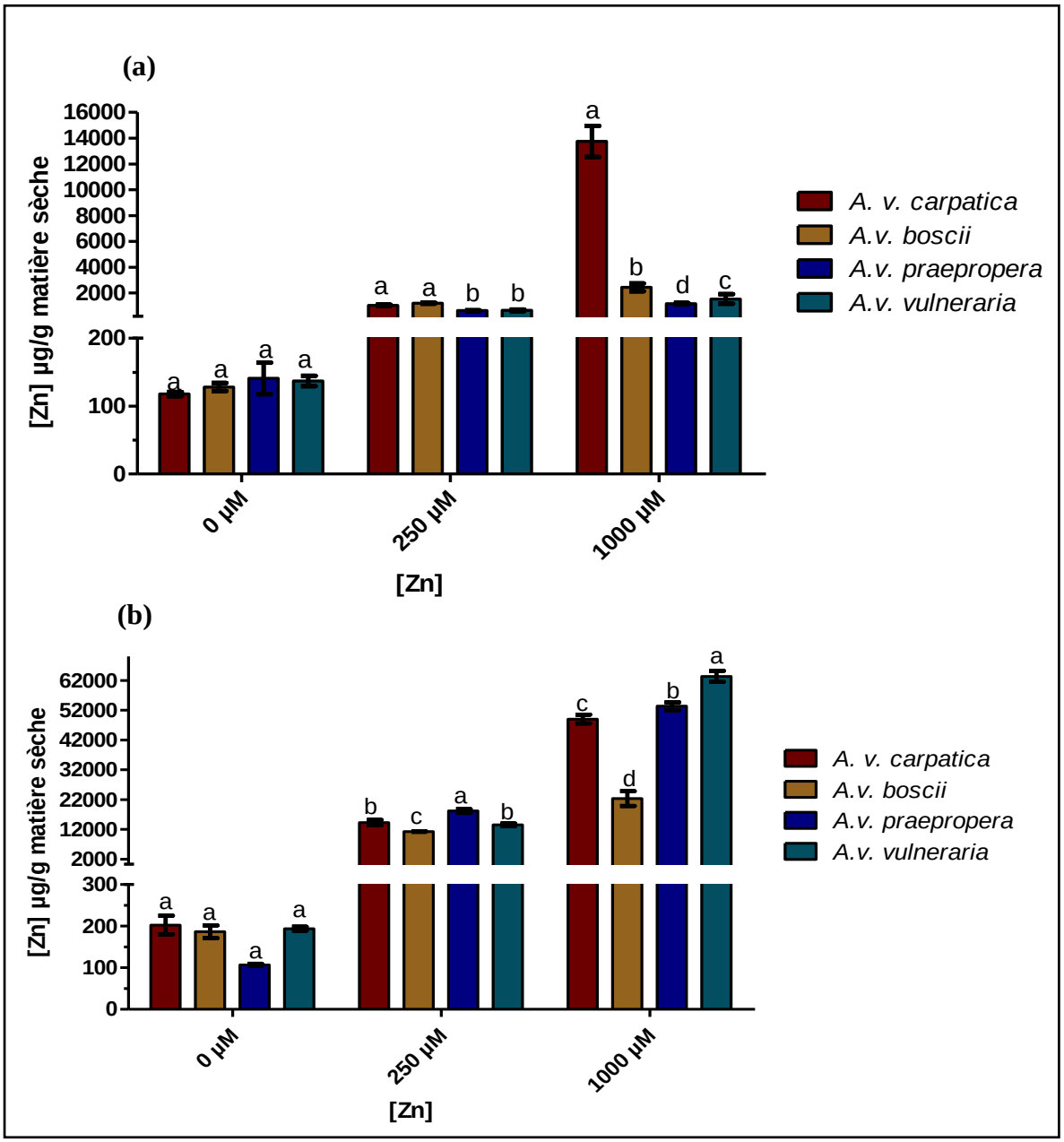


Figure 32 : Concentration en zinc dans les parties aériennes (a) et racinaires (b) des sous-espèces *carpatica, boscii, praepropera* et *vulneraria* alimentées en azote avec 3 mM de KNO_3 dans la solution nutritive hydroponique et exposées à trois concentrations de zinc (0, 250 et 1000 µM).

Des différences significatives au seuil de 5% pour chacun des différents traitements sont notées avec des lettres différentes.

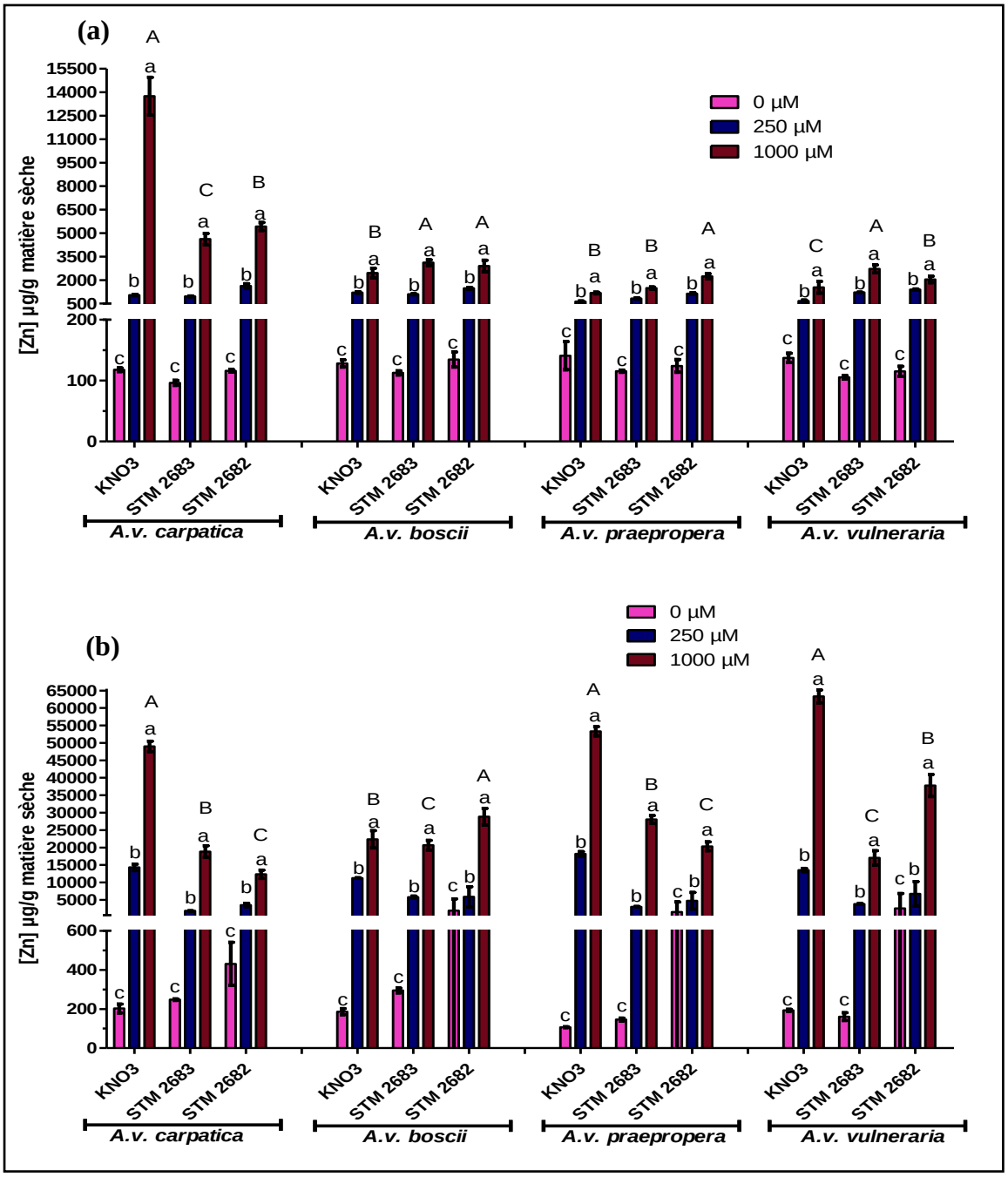


Figure 33 : Concentrations en zinc dans les parties aériennes (a) et racinaires (b) chez les sous-espèces *carpatica*, *boscii*, *praepropera* et *vulneraria* inoculées avec les bactéries symbiotiques ou alimentées avec 3mm KNO_3 dans une solution nutritive hydroponique et exposées à trois concentrations de zinc (0, 250 et 1000 µM).

Des différences significatives au seuil de 5% pour chacun des différents traitements sont notées avec des lettres différentes. Les lettres minuscules se réfèrent à la comparaison des concentrations en zinc dans les parties aériennes et racinaires au sein d'une même sous-espèce. Les lettres majuscules sont utilisées pour comparer les concentrations en Zn dans les parties aériennes et racinaires pour une espèce d'*Anthyllis* donnée et pour chacun des trois traitements: KNO_3, souche STM2683, souche STM2682 en présence de 1000 µM de Zn.

2.5. Concentration en zinc dans les nodosités

La concentration en Zn dans les nodosités chez les sous-espèces *boscii*, *praepropera* et *vulneraria* augmente avec la concentration en Zn dans la solution nutritive (Figure 34). Elle atteint moins de 3000 µg de $Zn.g^{-1}$ de matière sèche pour les plantes exposées à 250 µM de Zn et plus de 25000 à 35000 µg de Zn. g^{-1} de matière sèche lorsque les plantes ont été exposées à 1000 µM de Zn. La concentration la plus faible en Zn à l'intérieur des nodosités a été observée chez la sous-espèce *carpatica*, quelle que soit la souche symbiotique inoculée, avec une quantité de Zn qui était seulement un tiers de celle mesurée dans les nodosités des trois autres sous-espèces d'*Anthyllis*.

L'analyse statistique (ANOVA) des concentrations en Zn au niveau des nodosités a montré une interaction très significative entre les concentrations de Zn, de l'inoculation et la sous-espèce (Tableau 8).

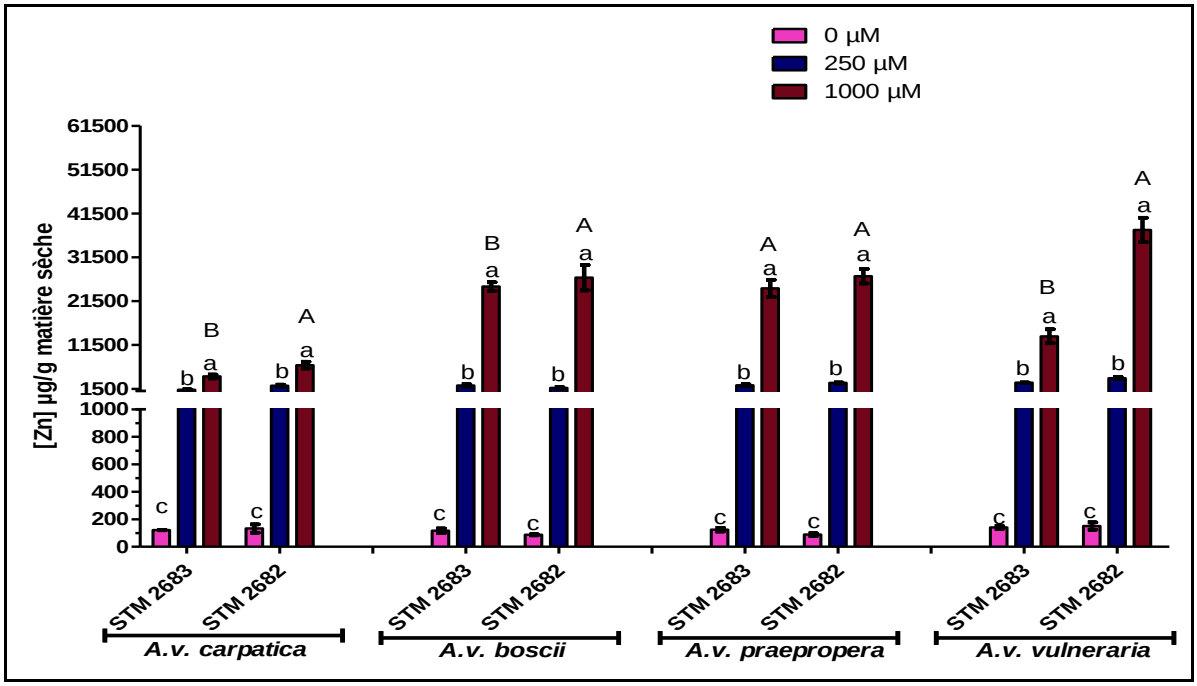


Figure 34 : Concentrations en Zn dans les nodosités chez les sous-espèces *carpatica*, *boscii*, *praepropera* et *vulneraria* inoculées avec des souches bactériennes symbiotiques STM2683 ou STM2682 exposées à trois concentrations de Zn : 0, 250 et 1000 µM.

Des différences significatives au seuil de 5% pour chacun des différents traitements sont notées avec des lettres différentes. Les lettres minuscules se réfèrent à des comparaisons de concentration en zinc dans les nodosités pour une même sous-espèce exposée à différentes concentrations de Zn. Les lettres majuscules concernent les concentrations en Zn dans les nodosités d'une même espèce exposée à 1000 µM Zn.

3. Discussion

Dans cette étude, nous avons caractérisé la croissance des quatre sous-espèces d'*Anthyllis vulneraria* exposées à différentes concentrations en zinc, en symbiose avec deux souches de *Mesorhizobium* ou en présence d'azote sous forme de KNO_3 dans la solution nutritive. La sous-espèce *carpatica* s'est révélée la plante la plus tolérante au zinc et cette plante a pu accumuler des niveaux élevés de cet élément dans les parties aériennes sans montrer des symptômes de toxicité.

Une réduction de la biomasse aérienne et racinaire a été observée avec les sous-espèces *boscii*, *praepropera* et *vulneraria* cultivées en présence de 3 mM de KNO_3 et exposées à 1000 µM de Zn alors que la sous-espèce *carpatica* n'a pas été affectée.

Au cours de la deuxième phase de l'expérimentation en hydroponie, la solution nutritive contenait seulement 0,5 mM de KNO_3 et la croissance des plantes inoculées avec des bactéries symbiotiques a été principalement basée sur leurs capacités de fixation de l'azote avec les différentes sous-espèces d'*Anthyllis*. Avec les sous-espèces *boscii*, *praepropera* et *vulneraria*, les biomasses des parties aériennes des plantes nodulées avec la souche métallicole STM2683 était supérieure à celles obtenues avec les plantes nodulées avec la souche non métallicole STM2682. La différence des performances symbiotiques entre les deux souches est probablement due aux niveaux différents de nodulation obtenus à la suite de la première phase de l'expérimentation avec une biomasse plus faible de nodosités avec la souche STM2682 chez les sous-espèces *boscii*, *praepropera* et *vulneraria*. En outre, avec les sous-espèces *praepropera* et *vulneraria*, les biomasses des parties aériennes des plantes inoculées avec la souche STM2683 ont été supérieures à celles des plantes alimentées en azote minéral (KNO_3) ou inoculées avec la souche STM2682.

D'autre part, sous forte contrainte métallique (1000 µM Zn), la souche métallicole STM2683 n'a pas permis d'améliorer la tolérance des sous-espèces *boscii*, *praepropera* et *vulneraria*. Il semble que lorsque la plante n'est pas intrinsèquement tolérante à de fortes concentrations en Zn, l'association avec la souche métallicole de *Mesorhizobium* ne permet pas une augmentation significative de leur tolérance. Des symptômes de toxicité ont été observés visuellement avec ces trois sous-espèces exposées à 250 et 1000 µM de Zn alors que les parties aériennes de la sous-espèce *carpatica* sont restées vertes et dans un bon état physiologique (Figure 31). L'application de 1000 µM de Zn a donc affecté clairement la photosynthèse chez trois des quatre sous-espèces d'*Anthyllis* étudiées dans cette expérience et

la toxicité du zinc est probablement due à la diminution de l'activité photosynthétique qui est souvent associée à des processus d'accélération de la sénescence (Monnet *et al.*, 2001). De plus, en présence de concentrations élevées en Zn, le Fe ajouté à la solution nutritive sous forme de Fe-EDTA a été pu être exclu et partiellement précipité, conduisant à une carence potentielle en Fe. Ainsi, la différence des mesures fluorescence des feuilles (SPAD) entre les différentes sous-espèces pourrait être liée à la différence de l'efficacité d'absorption en Fe (Hindt et Guerinot, 2012). Dans ce cas, la sous-espèce *carpatica*, qui continue à croître dans le milieu liquide riche en Zn, peut être considérée comme une plante efficiente pour l'absorption du Fe en présence de 1000 µM de Zn. Dans notre expérimentation, l'évaluation de l'état physiologique (couleur plus ou moins verte) par des mesures de fluorescence de feuilles était un meilleur indicateur de phytotoxicité que la biomasse des parties aériennes. En effet, bien qu'aucun effet significatif de 250 µM de Zn n'ait été observé sur la biomasse aérienne de toutes les sous-espèces d'*Anthyllis*, une diminution significative de la teneur en chlorophylle a été observée pour cette concentration avec les sous-espèces *boscii*, *praepropera* et *vulneraria*.

Avec les plantes alimentées en azote minéral (3 mM de KNO_3) et exposées à 1000 µM de Zn dans la solution nutritive, la concentration en Zn dans les racines des quatre sous-espèces d'*A.vulneraria* atteint 50 000 µg de Zn par gramme de matière sèche. Ces fortes concentrations de Zn dans les racines ont été observées dans des conditions comparables avec *Arabidopsis halleri* et *S. alfredii* (Yang *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2000). Au niveau des parties aériennes, l'accumulation de Zn chez la sous-espèce *carpatica* est apparue équivalente à celle de *Noccaea caerulescens* testée dans des conditions similaires, mais inférieure à celle d'*A. halleri* (Shen *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2000). Bien que la concentration en Zn dans les parties aériennes de la sous-espèce *carpatica* soit très élevée et ne génère pas de phénomène de phytotoxicité ou de réduction de la croissance, cette sous-espèce ne peut pas être considérée comme une plante hyperaccumulatrice. En effet, le rapport de la concentration en Zn dans les parties aériennes/concentration en Zn dans les racines est inférieur à 1 (0,31) et une accumulation très importante de Zn a été observée dans les racines et plus faiblement dans les parties aériennes (Reeves et Baker, 2000). Compte tenu des teneurs en Zn accumulées dans les racines et les parties aériennes, *A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* doit être considérée comme une plante hypertolérante et accumulatrice de Zn (Chaney *et al.*, 1997; Rascio et Navari-Izzo, 2011).

En ce qui concerne la sous-espèce *boscii*, et malgré la présence de concentrations importantes de métaux dans le sol d'Eylie où cette sous-espèce est naturellement présente, son comportement suggère que cette plante est non métallicole. En effet, la biomasse des parties aériennes et les valeurs de fluorescence au niveau des feuilles ont diminué en présence de Zn et cette sous-espèce ne pouvait pas être différenciée des sous-espèces *praepropera* et *vulneraria* qui sont naturellement présentes sur des sols non contaminés. Les métaux dans le sol Eylie étaient probablement pas ou peu disponibles pour les plantes. Par ailleurs, dans notre expérimentation, la teneur en Zn dans les racines de cette plante était nettement plus faible que dans celles des autres sous-espèces d'*Anthyllis* et ces données pourraient aussi suggérer que la sous-espèce *boscii* est moins efficace dans l'absorption de Zn. La pression sélective exercée par les métaux sur la sous-espèce *boscii* dans le sol Eylie a été probablement insuffisante pour sélectionner des génotypes tolérants à de fortes concentrations en Zn (Mahieu *et al.*, 2012).

La diminution des concentrations en zinc chez les plantes des différentes sous-espèces lorsqu'elles sont nodulées avec les bactéries symbiotiques fixatrices d'azote sont des données originales et elles ouvrent vers de nouvelles perspectives. En particulier, la sous-espèce *carpatica* présente un comportement très intéressant avec une baisse systématique de la teneur en Zn à l'intérieur des tissus de la plante (racines et parties aériennes), lorsqu'elle est associée à des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote. Il est d'ailleurs important de noter que chez cette sous-espèce, la quantité de Zn dans les nodosités ne dépasse pas 1% de la quantité totale de Zn par plante et on ne peut pas expliquer la diminution de la concentration en Zn dans les racines et les parties aériennes par l'accumulation de Zn dans les nodosités. Ehrlich (1997) et Faisal et Hasnain (2006) ont observé que certaines bactéries et des mycorhizes associées aux racines jouent un rôle important dans le contrôle de la disponibilité des oligo-éléments pour l'absorption des métaux lourds présents dans des sols contaminés par les racines des plantes. Jourand *et al.* (2010) justifient la diminution de l'accumulation de Ni dans les plantes ectomycorhizées par l'immobilisation de Ni dans la rhizosphère par des agents complexants libérés par les racines, par une absorption réduite ou par une augmentation de l'efflux par le champignon. Dans le cas des bactéries, Wani *et al.* (2008) ont montré que l'inoculation du pois avec la souche métallicole RP5 qui présente un niveau élevé de tolérance au nickel et au zinc génère une diminution de la concentration de ces deux métaux dans les plantes inoculées. Ces auteurs ont suggéré que le rôle de la souche RP5 dans l'élimination de ces métaux se fait par le biais d'un mécanisme d'adsorption / désorption dans la rhizosphère. Il est donc possible,

dans notre expérience, que la bactérie métallicole STM2683 qui peut coloniser les racines des plantes soit impliquée dans la diminution de la disponibilité de Zn. Cette diminution pourrait être expliquée par la séquestration intracellulaire par des agents chélateurs tels que le glutathion qui a été trouvé, par exemple, chez *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Figueira *et al.,* 2005). Une immobilisation de métaux par des parois cellulaires bactériennes pourrait également expliquer la diminution de l'absorption de Zn chez les plantes associées aux bactéries. Zhang et Min (2009) ont observé que, chez *Burkholderia Fungorum*, l'immobilisation des métaux a été promue par la synthèse d'exopolysaccharides capables de lier le Cd-Zn. Cette explication pourrait être validée avec la souche métallicole STM2683 qui pourrait survivre à l'extérieur de la plante, en présence de Zn, contrairement à la souche non métallicole. Cependant, dans notre expérience, il n'est pas possible de mettre en évidence une différence nette entre la souche métallicole et la souche non métallicole en ce qui concerne leur effet sur la réduction de l'accumulation de zinc dans les tissus végétaux. Nos résultats suggèrent donc que les bactéries pourraient être impliquées dans la régulation de l'accumulation en Zn dans les parties aériennes et racinaires via le processus de nodulation.

Pour mieux analyser le rôle de *Mesorhizobium* qui vivent à l'état libre dans la rhizosphère ou sont étroitement associées aux tissus végétaux au sein des nodosités, il serait important, dans l'avenir, d'examiner la souche rhizosphérique de *Mesorhizobium* en utilisant des mutants qui ne permettent plus d'initier la nodulation (Nod^-). Ceci permettra de voir si la diminution de Zn dans les parties racinaires et aériennes chez la sous espèce *carpatica* est également constatée lorsque les bactéries sont seulement à l'état libre dans la rhizosphère. La diminution de la concentration en Zn dans les parties aériennes des plantes de la sous-espèce *carpatica* lorsqu'elle est associée à des bactéries appartenant au genre *Mesorhizobium* est un résultat qui a des conséquences directes avec l'utilisation de cette association pour la phytostabilisation écologique des sites miniers.

L'association *Anthyllis vulneraria* sous-espèce *carpatica* / *Mesorhizobium metallidurans* STM2683, outre son intérêt comme modèle d'étude constitue également une source d'azote pour les substrats miniers généralement à faible teneur en matières organiques et sa présence en première séquence de végétation favorise l'installation et la croissance d'autres espèces végétales tolérantes non-fixatrices soumises au stress métallique (Frérot *et al.,* 2006).

En conclusion, cette étude a montré que la sous-espèce *carpatica*, en présence de 1000 µM de Zn, accumule des quantités importantes de métal dans ses parties aériennes lorsque les plantes sont alimentées en azote sous forme de nitrate. La concentration en Zn est nettement réduite en présence de souches symbiotiques. Ainsi, afin de mieux comprendre comment les bactéries interviennent pour initier cette diminution, d'autres études seront nécessaires. Les études futures devraient notamment porter sur l'utilisation spécifique de mutants de *Mesorhizobium* et de techniques capable de bien analyser la distribution en Zn dans les différents tissus végétaux. L'utilisation de l'association entre *A.vulneraria* sous-espèce *carpatica* et ses bactéries symbiotiques comme un nouveau modèle, ouvre de nouvelles perspectives pour comprendre comment une bactérie, qui est à la fois à l'état libre et / ou endophyte, est capable de réguler l'absorption de Zn, la translocation et l'accumulation dans la plante hôte.

Chapitre IV

Etude de la diversité phénotypique et génotypique des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote associées à des légumineuses métallicoles, présentes en Tunisie

Chapitre IV : Etude de la diversité phénotypique et génotypique des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote associées à des légumineuses métallicoles, présentes en Tunisie

1. Introduction

La phytostabilisation est une technologie fondée sur l'utilisation de végétaux et des microorganismes qui leur sont associés pour couvrir et stabiliser les sols et c'est une approche potentiellement très intéressante pour le confinement des matériaux à fortes teneurs en ETMs des anciennes mines (Escarré *et al.*, 2010; Salt *et al.*, 1995). La toxicité liée à la présence d'ETMs n'est pas la seule contrainte limitant l'installation des végétaux, les faibles teneurs en matière organique et en élément minéraux comme l'azote sont également à prendre en considération (Wong, 2003). Dans ce contexte, l'implication de plantes appartenant à la famille des *Fabaceae* dans le couvert végétal améliore naturellement la teneur en azote dans le sol et facilite l'installation d'autres espèces végétales (Frérot *et al.*, 2006). L'intérêt des *Fabaceae* est lié à leur capacité à mobiliser l'azote de l'air lorsqu'elles sont associées à des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote, les rhizobium.

Plusieurs études ont été réalisées sur : (i) l'association entre légumineuses/ bactéries symbiotiques présentes sur des sites contaminés, (ii) la diversité des rhizobium et (iii) leurs capacités à tolérer les métaux lourds (Carrasco *et al.*, 2005; Chaintreuil *et al.*, 2007; Delorme *et al.*, 2003; Klonowska *et al.*, 2012; Vidal *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2009). Certaines bactéries symbiotiques sont résistantes aux métaux (Klonowska *et al.*, 2012; Maynaud *et al.*, 2012; Vidal *et al.*, 2009) et d'autres arrivent à survivre dans des milieux chargés en métaux sans montrer de tolérance. Ceci peut être lié à la composition du substrat des sites miniers et à la

présence de matières organiques ou d'argile qui peuvent créer une protection physique et/ou chimique pour les bactéries sensibles (Celis *et al.*, 2000; Chaudri *et al.*, 2000; Delorme *et al.*, 2003). Cette protection peut être liée également à l'existence de micro-niches où la contamination métallique peut être minime (Giller *et al.*, 2009). Bååth *et al.* (1998) et Díaz-Raviña *et al.* (1994) ont signalé que la présence des métaux peut exercer une pression de sélection sur les micro-organismes issus d'une population microbienne avec une tolérance au métal assez importante mais avec moins de diversité par rapport à la zone voisine non polluée.

Parmi les Fabacées présentes en Afrique du Nord, les plantes appartenant au genre *Hedysarum* présente un réel intérêt car à l'état spontané, on les trouve sur les marnes et les terres argilo-calcaires (Ben Jeddi *et al.*, 1998). L'espèce *Hedysarum coronarium* L., connue sous le nom sulla, est une légumineuse présente dans le bassin méditerranéen et cultivée pour la production de fourrage (Mahdhi *et al.*, 2011; Squartini *et al.*, 2002). En Tunisie, sa présence a été signalée dans toute la zone du nord de la dorsale à partir de 300 mm de pluie par an.

Les bactéries isolées à partir des nodosités racinaires d'*H. coronarium* ont été décrites et étudiées par plusieurs auteurs (Mottareale, 1898; Squartini *et al.*, 2002). Les premières bactéries, isolées des nodosités de sulla, appartenaient à *Rhizobium hedysari*, mais depuis 2002, cette appellation a été modifiée et elles appartiennent désormais à *R. sullae* (IS123). D'autres études ont été réalisées, pour préciser le degré de spécificité d'hôte des rhizobium de sulla et il a été démontré que chez cette légumineuse, celui-ci était élevé. En effet, les rhizobium isolés soit à partir d'*H. coronarium* L., soit à partir d'*Hedysarum flexuosum* L. sont incapables de former des nodosités efficaces sur l'autre espèce végétale (Cabrera *et al.*, 1979 ; Kishinevsky *et al.*, 2003; Safronova *et al.*, 2004). De plus, des tests de nodulation des souches bactériennes isolées de nodosités d'*Hedysarum* avec d'autres légumineuses telles que *Trifolium repens* L., *Pisum sativum* L., *Vicia faba* L., *Glycine max* L., ainsi que *Cicer arietinum* L., ont toujours été négatifs (Cabrera *et al.*, 1979). De ce fait, pour avoir une fixation biologique d'azote optimale, la présence des rhizobium de sulla dans le sol où la plante est cultivée, reste incontournable. Par conséquent, et en raison de l'absence de populations naturelles de rhizobium compatibles, en dehors de la zone de distribution du sulla (Casella *et al.*, 1984), l'inoculation avec des souches spécifiques est une pratique indispensable pour avoir une nodulation adéquate (Fitouri *et al.*, 2011).

Le travail présenté dans ce chapitre est fondé sur l'observation de la présence, sur l'ancienne mine de Zn et de Pb de Fej El Hdoum (nord-ouest de la Tunisie), de plants d'*H. coronarium* et deux espèces annuelles de *Medicago.* Le substrat, dans lequel ont été trouvés les plants d' *H. coronarium*, présente des teneurs élevées en Zn, Pb et Cd et les systèmes racinaires des plantes portaient des nodosités. La présence dans le substrat de bactéries symbiotiques d'*H. coronarium* adaptées à la présence d'ETMs était donc vraisemblable et une étude portant sur la diversité génétique et phénotypique de ces bactéries a été réalisée.

2. Résultats

Le matériel et les méthodes utilisées pour cette partie sont présentées dans le **chapitre II, partie 2**.

2.1. Analyse des sols

Les teneurs en métaux totaux ou en métaux mesurées après extraction avec l'EDTA ou le DTPA, ainsi que les caractéristiques physico-chimiques des échantillons de sol prélevés sur le site de Fej El Hdoum et de la parcelle agricole sont présentées dans les tableaux 9 et 10.

Comme cela était attendu, le sol prélevé sur l'ancienne mine de Fej El Hdoum a des teneurs élevées en zinc, plomb et cadmium et celles-ci sont très au-dessus des teneurs maximales autorisées dans les sols recevant des boues de station d'épuration (Tableau 1, **chapitre I**). Le sol prélevé dans la parcelle agricole a de faibles concentrations en métaux ce qui correspond aux sols non pollués. Une particularité assez remarquable est la teneur très élevée en strontium du sol du site de Fej El Hdoum (6520 $mg.kg^{-1}$ de Sr total).

Les deux sols étudiés ont des pH alcalins et le sol de Fej El Hdoum contient des quantités de limons plus élevées que le sol agricole. La teneur en azote est nettement plus élevée dans le sol agricole non contaminé (3,9 fois plus élevée que celle du sol de l'ancienne mine de Fej El Hdoum). Cependant, le taux de calcaire est 6 fois plus élevé dans le sol de Fej El Hdoum. En ce qui concerne la matière organique, une teneur élevée a été enregistrée dans les deux sols étudiés (20,6 $g.kg^{-1}$ dans le sol minier et 28,6 $g.kg^{-1}$ dans le sol agricole).

Tableau 9 : Caractéristiques physico-chimiques des échantillons du sol prélevés du site de Fej el Hdoum et de la parcelle agricole.

Site	pH	Calcaire total ($g.kg^{-1}$)	Argiles (< 2µm) p.1000	Limons fins (2 à 20 µm) p.1000	Limons grossiers (20 à 50 µm) p.1000	Sables fins (50 à 200 µm) p.1000	Sables grossiers (200 à 2000 µm) p.1000
Fej El Hdoum	7,9	434	225	167	105	305	197
Parcelle agricole	8,5	68	227	77	88	507	100

Site	P_2O_5 ($g.kg^{-1}$)	K_2O ($g.kg^{-1}$)	MO ($g.kg^{-1}$)	Rapport C/N	Azote total ($g.kg^{-1}$)	CEC ($c_{mol+}.kg^{-1}$)
Fej El Hdoum	0,068	0,099	20,6	36,4	0,33	7,4
Parcelle agricole	0,109	0,377	28,6	12,8	1,3	16,4

Tableau 10 : Concentrations en métaux totaux et en métaux mesurés après extraction à l'EDTA ou au DTPA dans les échantillons du site de Fej El Hdoum et de la parcelle agricole. Les résultats sont exprimés en mg/kg, sauf pour le Fer total où les résultats sont exprimés en g/100g.

Site	Zn Total	Zn EDTA	Zn DTPA	Pb Total	Pb EDTA	Pb DTPA	Cd Total	Cd EDTA	Cd DTPA	Fe Total	Sr Total	Ca Total	Ar Total
Fej El Hdoum	10200	3290	731	3350	639	42,5	23,7	7,99	2,17	2,95	6520	17,1	39,5
Parcelle agricole	53,4	1,34	0,716	16,8	3,29	1,15	0,161	0,066	0,031	1,87	78,6	2,58	4,96

2.2. Isolement des rhizobia à partir de nodosités prélevées sur des plantes

Les isolements bactériens à partir des nodosités ont permis d'obtenir des colonies qui, à 28°C, apparaissent après 24 heures d'incubation sur YEM gélosé. Les colonies sont muqueuses et rondes.

Cent vingt-huit isolats ont été obtenus à partir des nodosités prélevées sur les racines de plants d'*Hedysarum coronarium,* collectés sur le site minier de Fej El Hdoum et cent quinze isolats sont issus des nodosités de plants d'*Hedysarum coronarium,* collectés dans une parcelle agricole située dans le village d'El Krib situé à 15 km du site minier.

En ce qui concerne *Medicago* sp., trente et un isolats ont été obtenus et conservés à -80 °C.

Pour la suite de mon travail, l'étude phylogénétique a été réalisée uniquement sur les isolats issus d'*H. coronarium*.

2.3. Piégeages bactériens

Les piégeages réalisés avec les échantillons de sol, prélevés à l'intérieur et à la périphérie des trois anciennes mines (Fej El Hdoum, Fed Hassène et Bou Aouane), n'ont pas permis de piéger de rhizobium symbiotique d'*H. coronarium* en ce sens qu'aucune nodosité n'a été obtenue. Un seul prélèvement de sol, collecté à l'intérieur du site minier de Fej El Hdoum, a permis de déceler la présence de rhizobium symbiotique d'*H. coronarium.*

2.4. Etudes phylogénétiques des souches isolées à partir d'*Hedysarum coronarium*

Trente-cinq isolats issus du site minier de Fej El Hdoum et 30 isolats issus du site cultivé d'El Krib ont été utilisés pour les caractérisations moléculaires (Tableau 11).

Tableau 11 : Liste des souches d'*Hedysarum coronarium* utilisées pour les études phylogénétiques et caractérisation moléculaire des souches basées sur les séquences partielles des gènes *rec*A , *atp*D, et de séquences d'ADNr 16S.

Site d'étude	N° de souches, collection STM	Groupes définis pour les différents gènes *rec*A	*atp*D	Numéro de Génotype (nombre de souches)	représentants groupe recA / ribotype 16S	Groupes définis par la combinaison des 3 gènes étudiés
H. coronarium **(sol non contaminé El Krib)** **(N=30)**	9028, 9029, 9035, 9036, 9037, 9039, 9041, **9042**, 9047, 9050, 9051, 9054, 9055	**rec 5**	**atp 5**	**1 (n= 13)**	STM9042 **S2**	rec5-atp5-S2
	9030, **9031**, 9032, 9033, 9034, 9038, 9043, 9045, 9052, 9053, 9056	**rec 8**	**atp 4**	**2 (n= 11)**	STM9031 **S1**	rec8-atp4-S1
	9040, 9046	**rec 9**	**atp 4**	**3 (n= 2)**	STM9040 **S1**	rec9-atp4-S1
	9044	**rec 6**	**atp 5**	**4 (n= 1)**	STM9044 **S2**	rec6-atp5-S2
	9048, 9049	**rec 7**	**atp 4**	**5 (n= 2)**	STM9058 **S3**	rec7-atp4-S3
	9057	**rec 17**	**atp 4**	**6 (n= 1)**	STM9057 **S1**	rec17-atp4-S1
H. coronarium **(site minier de Fej El Hdoum)** **(N=35)**	**9058**, 9061, 9066, 9068, 9070	**rec 7**	**atp 4**	**5 (n= 5)**	STM9058 **S3**	rec7-atp4-S3
	2681T (IS123T, Squartini *et al.*, 2002) 9059, 9062, 9071, 9072, 9073, 9076, 9077, 9079, 9085, 9088, 9090, 9091, **9092**	**rec 12**	**atp 2**	**7 (n= 13)**	STM9092, IS123^{T} **S1**	rec12-atp2-S1
	9060	**rec 14**	**atp 4**	**8 (n= 1)**	**S1**	rec14-atp4-S1
	9063, 9064, 9078, 9081, 9083	**rec 8**	**atp 4**	**2 (n= 5)**	STM9031 **S1**	rec8-atp4-S1
	9065, 9069, **9086**	**rec 2**	**atp 7**	**9 (n= 3)**	STM9086 **S6**	rec2-atp7-S6
	9067	**rec 16**	**atp 1**	**10 (n= 1)**	**S9**	rec16-atp1-S9
	9074	**rec 3**	**atp 3**	**11 (n= 1)**	**S5**	rec3-atp3-S5
	9075	**rec 13**	**atp 2**	**12 (n= 1)**	**S1**	rec13-atp2-S1
	9080	**rec 15**	**atp 2**	**13 (n= 1)**	**S1**	rec15-atp2-S1
	9082	**rec 4**	**atp 3**	**14 (n= 1)**	**S4**	rec8-atp3-S4
	9084	**rec 10**	**atp 2**	**15 (n= 1)**	**S8**	rec10-atp2-S8
	9087	**rec 1**	**atp 6**	**16 (n= 1)**	**S1**	rec1-atp6-S1
	9089	**rec 11**	**atp 2**	**17 (n=1)**	**S1**	rec11-atp2-S1

L'amplification a été positive avec les gènes de ménage *rec*A, *atp*D pour les 65 souches avec les amorces décrites dans le **chapitre II** « Matériel et Méthodes ».

2.4.1. Analyses phylogénétiques des séquences du gène *rec*A

Les séquences partielles du gène *rec*A (459 nucléotides) ont été obtenues pour les 65 souches bactériennes isolées à partir d'*H. coronarium*. Ces séquences ont été comparées avec celle d'une souche de *Rhizobium sullae* IS123^T isolée à partir d'*Hedysarum coronarium* L. et utilisée comme référence (Squartini *et al.*, 2002). Sur la base des séquences partielles de *rec*A, 17 génotypes ont été obtenus avec le logiciel Mothur. Treize souches issues du site de Fej El Hdoum ont une séquence du gène *rec*A identique à celle de la souche type (Tableau 11). Quatre souches (STM9084, STM9089, STM9075 et STM9080) diffèrent de la souche type par un nucléotide. L'arbre phylogénétique construit avec ces séquences (459 nucléotides) est présenté dans la figure 35.

Un nouvel arbre phylogénétique (334 nucléotides) a été construit en insérant les séquences représentatives des espèces de *Rhizobium*, de deux souches d'*Ensifer*, d'une souche de *Mesorhizobium* et d'une souche de *Bradyrhizobium* (Figure 36). Il apparaît que les souches issues des sites de Fej El Hdoum et d'El Krib appartiennent au genre *Rhizobium*. La majorité des isolats (à l'exception de la souche STM9067) sont proches phylogénétiquement de *Rhizobium sullae.* Sur les 17 souches utilisées, les isolats STM9084, STM9089, STM9075 et STM9080 présentent 100 % de similarité avec la souche type IS123^T, *R sullae*. Les autres souches présentent des séquences avec 3/334 nucléotides de différence pour la souche STM9087, 4/334 nucléotides pour les souches STM9031 et STM9082, 5/334 nucléotides pour les souches STM9060 et STM9074 et 6/334 nucléotides pour la souche STM9086. Tous les isolats obtenus à partir des plantes d'*Hedysarum* prélevées dans le sol agricole sont phylogénétiquement très proches de la majorité des isolats issus de nodosités d'*H. coronarium* du site de Fej El Hdoum et seules 14 souches (dont le génotype est représenté par la souche STM9042) présentent une similarité plus faible (99,1%) avec la souche type de *R. sullae*.

La souche STM9067 est phylogénétiquement proche de *R. mesoamericanum* et *R. grahamii* avec 44 et 45/334 nucléotides différents respectivement (Figure 36).

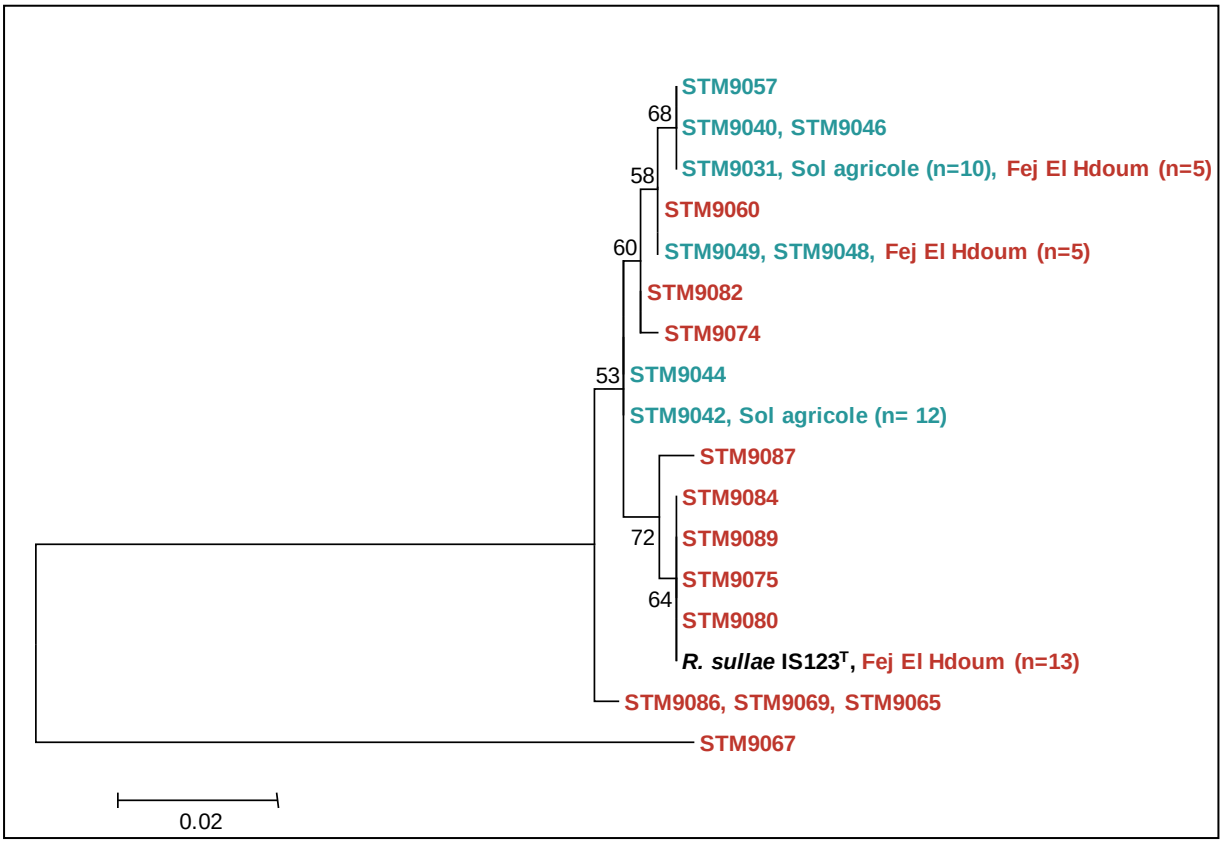


Figure 35 : Arbre phylogénétique des séquences partielles du gène *rec*A (459 nucléotides) construit par la méthode du maximum de vraisemblance selon le modèle GTR. Les valeurs de bootstrap (pourcentage de 1000 réplicats) supérieures à 50% sont indiquées. La barre d'échelle représente le nombre de substitutions nucléotidiques pour 1000 nucléotides. Les 35 souches provenant du site de Fej El Hdoum sont indiquées en rouge et les 30 issues du site d'El Krib (sol agricole) en vert.

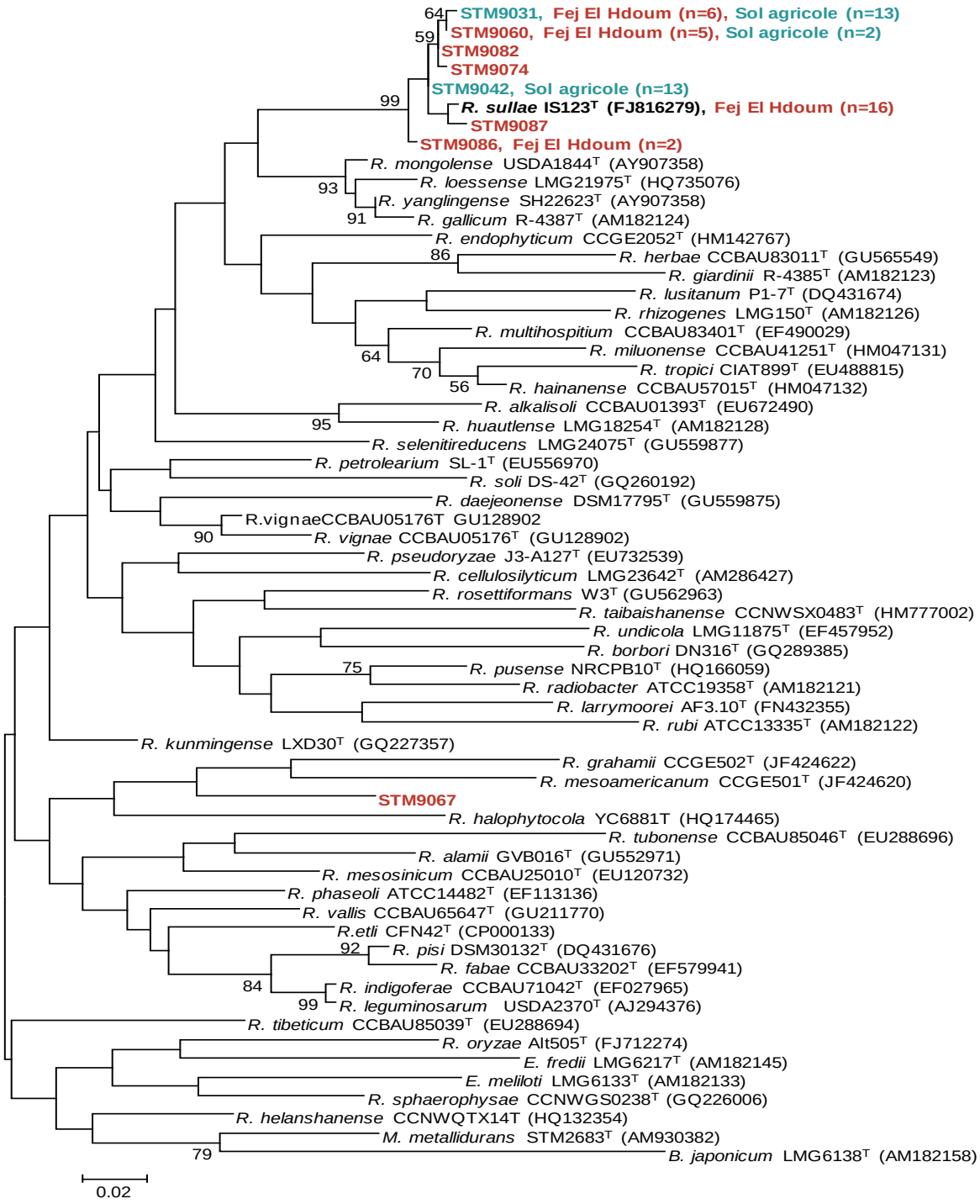


Figure 36 : Arbre phylogénétique du gène *rec*A construit par la méthode du maximum de vraisemblance selon le modèle GTR. L'indice de fiabilité des nœuds a été obtenu sur 1000 bootstrap. L'analyse est basée sur 334 nucléotides. Les numéros d'accès à Genbank sont indiqués entre parenthèses. La barre d'échelle représente le nombre de substitutions nucléotidiques par 1000 nucléotides. Les souches provenant du site de Fej El Hdoum sont indiquées en rouge et celles du sol agricole d'El Krib en vert.

2.4.2. Analyses phylogénétiques des séquences du gène *atp*D

Nous avons obtenu à l'issue de l'analyse des séquences du gène *atp*D, 7 génotypes différents et l'arbre phylogénétique construit confirme la proximité des souches issues des sites de Fej El Hdoum avec la souche type de *R. sullae* IS123^T. La majorité des souches sont très proches de la souche type de *R. sullae* (Figure 37) avec, par rapport à cette souche, une différence d'un nucléotide (sur les 397 analysés) pour les souches (STM9074 et STM9042), 2/397 nucléotides pour la souche STM9087 et 7/397 nucléotides pour la souche STM9086. 64 des 65 souches étudiées sont dans un cluster homogène qui se différencie assez nettement du cluster dans lesquels se situent les deux souches type de *R. loessense* (18/397 nucléotides de différence avec STM9086) et de *R. mongolense* (17/397 nucléotides de différence avec STM9086). Sur les 65 souches séquencées, 22 souches provenant du site de Fej El Hdoum et 16 souches issues du site d'El Krib ont 100% de similarité avec la souche type de *R. sullae* IS123^T.

Seule la souche STM9067 est phylogénétiquement éloignée de *R. sullae* et elle est proche de *R. grahamii* (11 nucléotides différents sur les 397 nucléotides analysés).

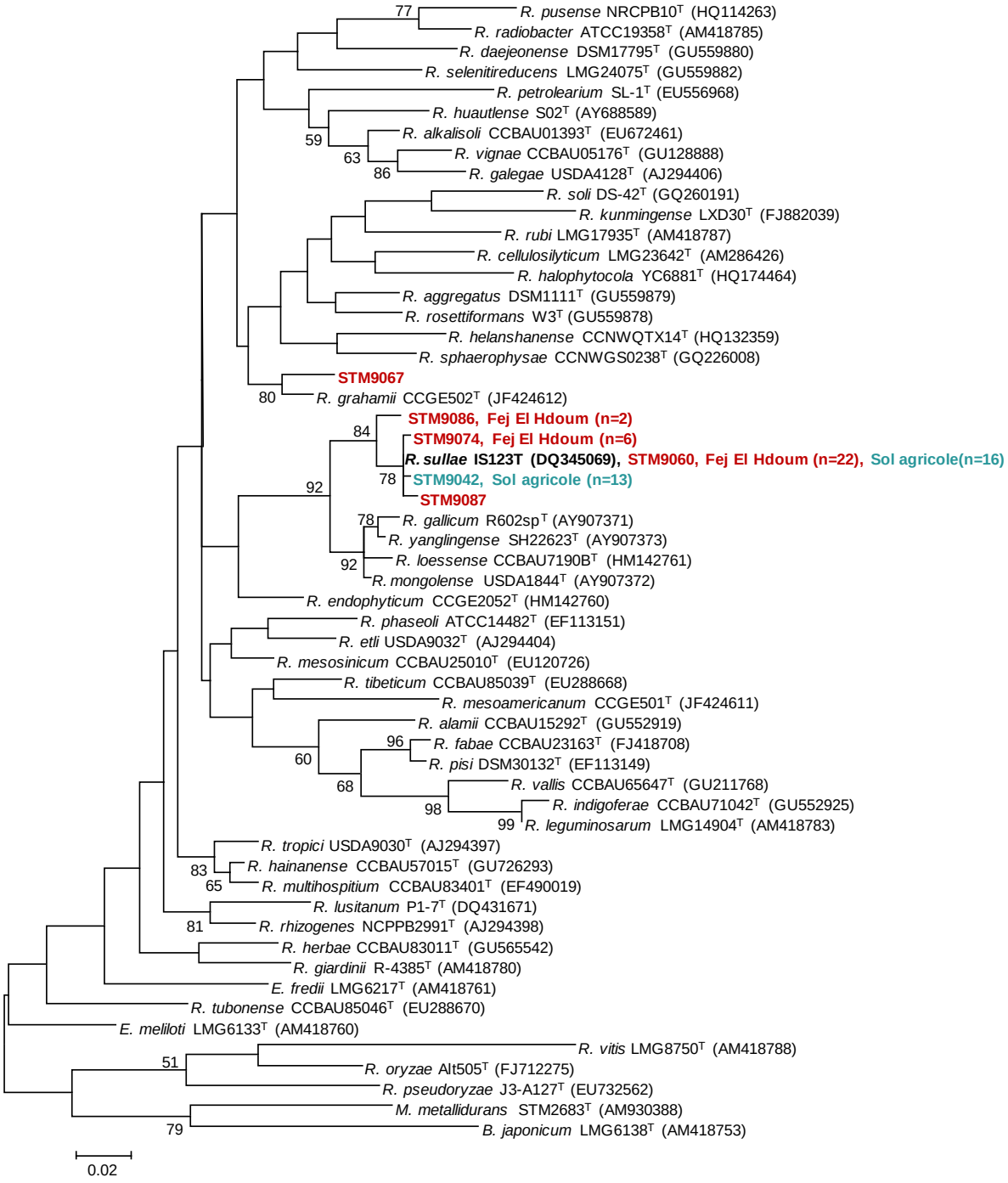


Figure 37 : Arbre phylogénétique du gène *atp*D construit par la méthode de maximum de vraisemblance selon le modèle GTR. L'indice de fiabilité des nœuds a été obtenu par bootstrap avec 1000 répétitions. L'analyse a été basée sur l'analyse de 397 nucléotides. Les numéros d'accès à Genbank sont indiqués entre parenthèses. La barre d'échelle représente le nombre de substitutions nucléotidiques par 1000 nucléotides. Les souches provenant du site de Fej El Hdoum sont indiquées en rouge et celles du site d'El Krib en vert.

2.4.3. Analyses phylogénétiques des séquences d'ADN ribosomal 16S

L'analyse des séquences partielles du gène de l'ARNr 16S pour une souche représentant chacun des 17 groupes définis à l'issue de l'analyse des séquences partielles du gène *rec*A, a permis de définir 8 ribotypes différents. L'analyse de ces séquences avec le logiciel Mothur a révélé que 9 des 17 souches ont la même séquence d'ADNr 16S et que cette séquence est identique à celle de la souche type *R. sullae* IS123^T (STM9089, STM9060, STM9057, STM9040, STM9075, STM9080, STM9087, STM9092 et STM9031) (Figure 38). Les autres souches sont différentes de la souche type avec un nombre de nucléotides variant de 2/1433 (cas de la souche STM9074) à 9 nucléotides différents /1433 (STM9086).

L'arbre phylogénétique construit avec les séquences des souches types appartenant au genre *Rhizobium* et l'ensemble des séquences des souches isolées à Fej El Hdoum et El Krib, est présenté dans la figure 39. Il apparaît clairement que l'ensemble des souches, à l'exception de l'une d'entre elles (STM9067 qui est phylogénétiquement proche de *R. endophyticum* et *R. mesoamericanum*), sont dans un cluster contenant la souche type IS123^T de *R. sullae*. Ce cluster est phylogénétiquement proche d'un cluster dans lequel on trouve les souches types des espèces *R. loessense, R. gallicum, R. mongolense et R. yanglingense.* Les pourcentages de similarité entre les souches issues des sites de Fej El Hdoum et d'El Krib ou entre des souches types sont présentés dans les tableaux 12 et 13.

Tableau 12 : Pourcentage de similarité entre les séquences étudiées pour les gènes de l'ARNr 16S, *rec*A et *atp*D et celles de la souche de référence : *R. sullae* (IS123^T).

	ADN r 16S	*rec*A	*atp*D
STM9060	100	98,5	100
STM9049	99,8	98,5	100
STM9031	100	98,8	100
STM9074	100	98,5	99,7
STM9082	99,9	98,8	99,7
STM9042	99,7	99,1	99,7
STM9086	99,7	98,2	98,2
STM9087	100	99,1	99,5
STM9067	97,4	85,9	91,7
R. loessense	99,2	89,8	95,7
R. gallicum	99,2	91,0	95,5
R. mongolense	98,2	91,3	96,0
R. yanglingense	99,3	91,6	96,0

Tableau 13 : Pourcentage de similarité entre les séquences partielles des souches types de *R. gallicum*, *R. loessense* et *R. yanglingense* pour les gènes de l'ARNr 16S, *rec*A et *atp*D et *R. mongolense* (USDA1844^T).

Souche type de :	ADN r 16S	*rec*A	*atp*D
R. gallicum	99,7	97,3	98,5
R. loessense	99,8	97,3	98,7
R. yanglingense	99,8	98,5	99,0

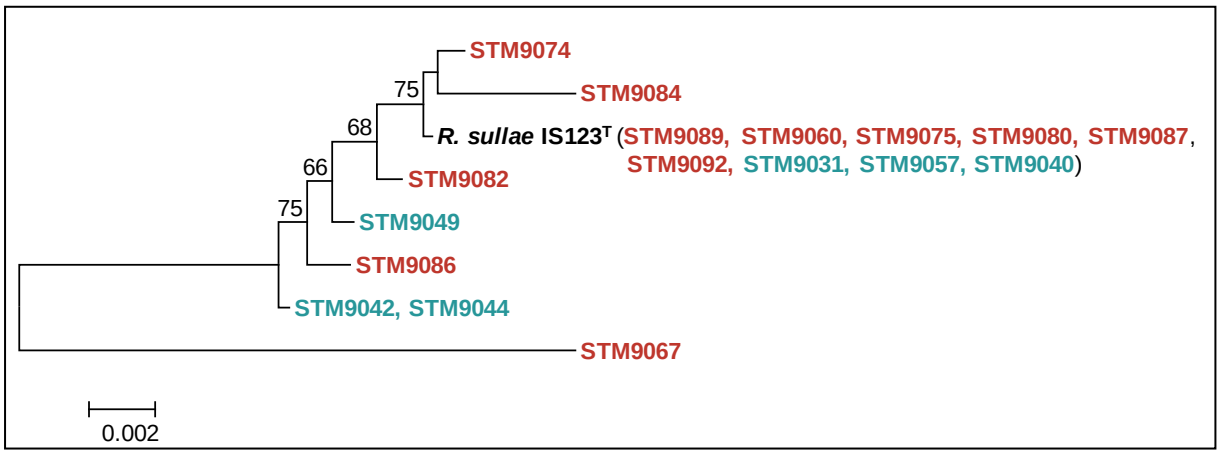


Figure 38 : Arbre phylogénétique des séquences partielles de l'ADN ribosomal 16S (1433 pb) construit avec les souches isolées de nodosités d'*H. coronarium* présente sur les sites de Fej el Hdoum et El Krib. L'arbre est construit à l'aide des méthodes de distance et de « Neighbor-joining » avec le modèle d'évolution de Kimura à deux paramètres. Les valeurs de bootstrap (pourcentage de 1000 réplicats) supérieures à 50% sont indiquées aux nœuds. Les souches provenant du site de Fej El Hdoum sont en rouge et celles du site d'El Krib en vert.

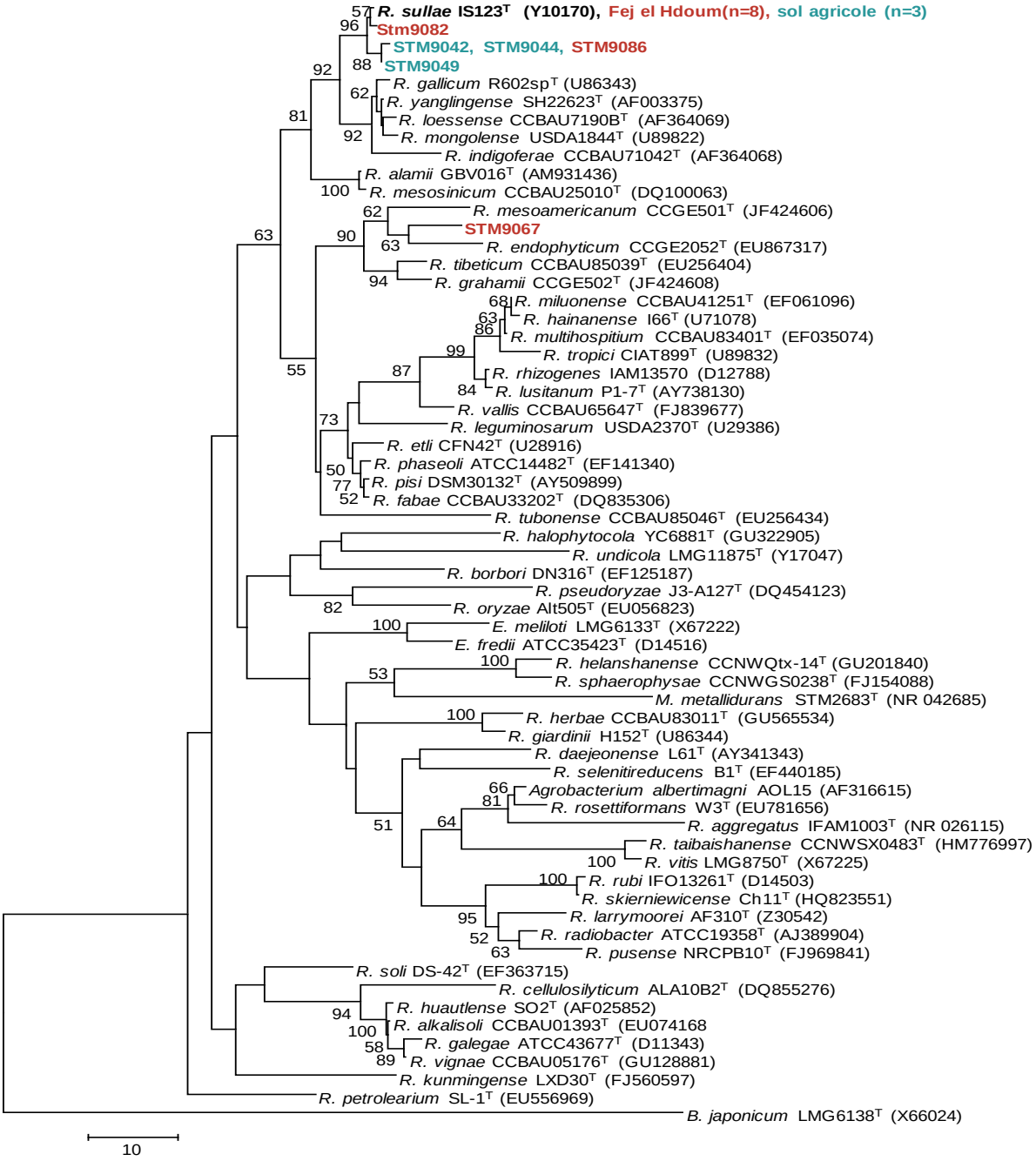


Figure 39 : Arbre phylogénétique des séquences partielles de l'ADN ribosomal 16S (1238 pb) construit avec les souches isolées de nodosités d'*H. coronarium* présente sur les sites de Fej el Hdoum, El Krib et les souches types de *Rhizobium*. L'arbre est construit à l'aide des méthodes de distance et du « Neighbor-joining » selon le modèle d'évolution de Kimura à deux paramètres. Les valeurs de bootstrap (pourcentage de 1000 réplicats) supérieures à 50% sont indiquées aux nœuds. Les numéros d'accès à Genbank sont indiqués entre parenthèses. Les souches provenant du site de Fej El Hdoum sont en rouge et celles du substrat agricole en vert.

2.4.4. Amplification des séquences des gènes *nod*A et *nod*C

Plusieurs tentatives ont été réalisées pour obtenir une amplification des gènes de nodulation *nod*A et *nod*C (Tableau 5, **Chapitre II, partie 2.2**), en utilisant différents types d'amorces ainsi que différentes conditions d'amplification (deux types de cycle). Alors que l'ADN utilisé comme témoin positif (*Rhizobium leguminosarum* STM6801) a, au cours de ce travail, toujours donné des séquences amplifiées, aucune des différentes tentatives avec l'ADN des souches de Fej El Hdoum, d'El Krib et de la souche type IS123^T n'a permis d'amplifier les gènes *nod*A et *nod*C.

2.5. Test de nodulation et de fixation

Les souches représentantes des 17 groupes *rec*A ont été testées pour leurs capacités de nodulation et de fixation de l'azote sur *H. coronarium* (Figure 40). Toutes les souches testées, à l'exception de la souche STM9067 et de la souche type *R. sullae* IS123^T ont été capables d'initier la formation de nodosités sur *H. coronarium* après 7 semaines d'inoculation. L'estimation de la capacité à fixer l'azote (par une méthode indirecte de la fluorescence au niveau des feuilles) a révélé que toutes les souches ayant nodulé, ont la capacité de fixer l'azote (Figure 41). L'inoculation des plants avec les différentes souches a permis d'avoir une biomasse aérienne et racinaire importante avec 15 des 17 souches testées, 2 souches (STM9080 et 9087) induisant une faible croissance. La biomasse aérienne et racinaire la plus importante a été obtenue avec la souche STM9042 issue du site cultivé d'El Krib.

L'incapacité de la souche STM9067 à noduler avec *H. coronarium* nous a conduit à la tester sur *Medicago orbicularis*, deuxième légumineuse trouvée sur le site de Fej El Hdoum. Cette souche n'a pas été capable de noduler *Medicago* mais il a été possible de mettre en évidence un effet positif de la souche STM9067 sur la croissance et le poids sec des plantes de *M. orbicularis*. Un examen approfondi du système racinaire a révélé une augmentation significative de la biomasse et de la longueur des parties aériennes ainsi que de la biomasse et de la longueur des racines des plantes de la luzerne, inoculées avec la souche STM9067 par rapport aux plantes non inoculées (Figures 42, 43, 44).

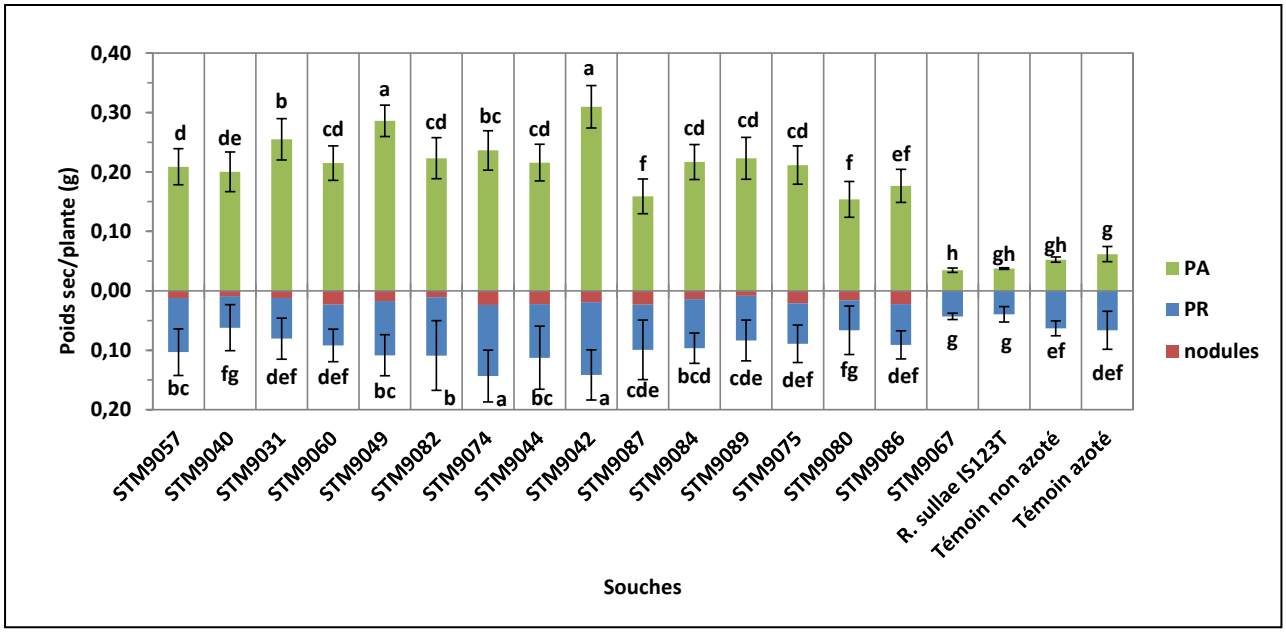


Figure 40 : Biomasse aérienne et racinaire et biomasse des nodosités des plantes d'*Hedysarum coronarium* inoculées avec les représentants des groupes *rec*A en les comparant avec des témoins non inoculées.

Les barres verticales représentent les écart-types (nombre de plants n= 10). Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p<0,05$, test d'homogénéité de Fisher).

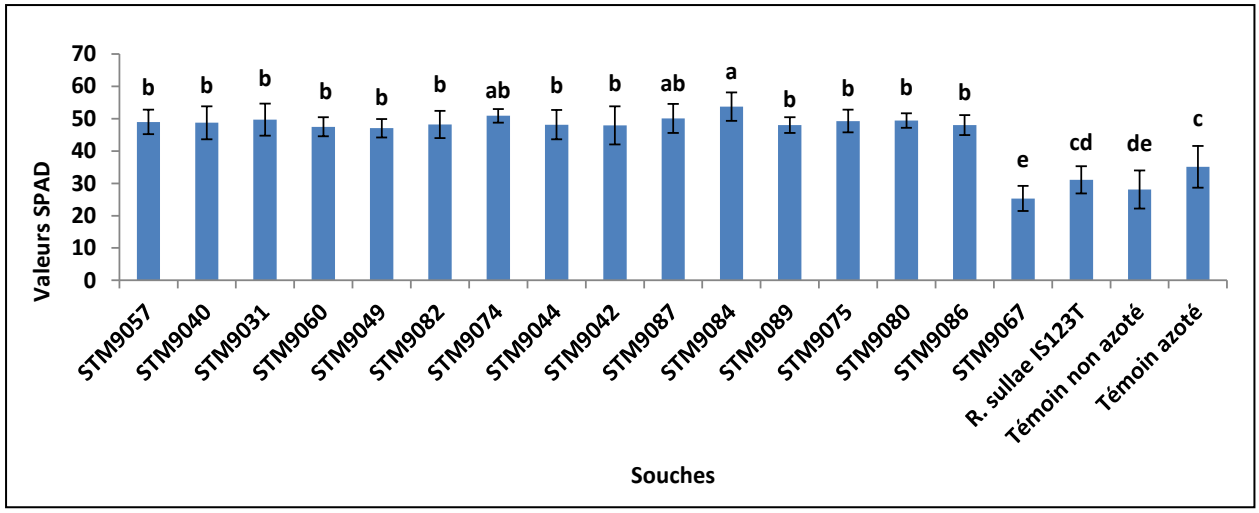


Figure 41 : Mesures de fluorescence de type SAPD au niveau des feuilles des plantes d'*Hedysarum coronarium* inoculées avec les représentants des différents groupes *rec*A en les comparant avec des plantes témoins non inoculées.

Les barres verticales représentent les écart-types (nombre de plants n= 10). Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p<0,05$, test d'homogénéité de Fisher

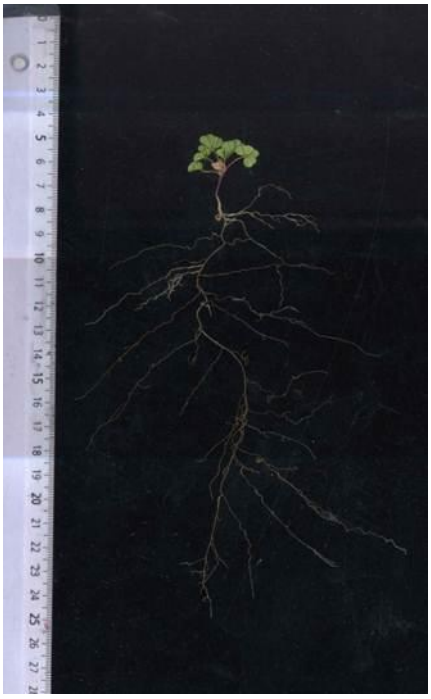
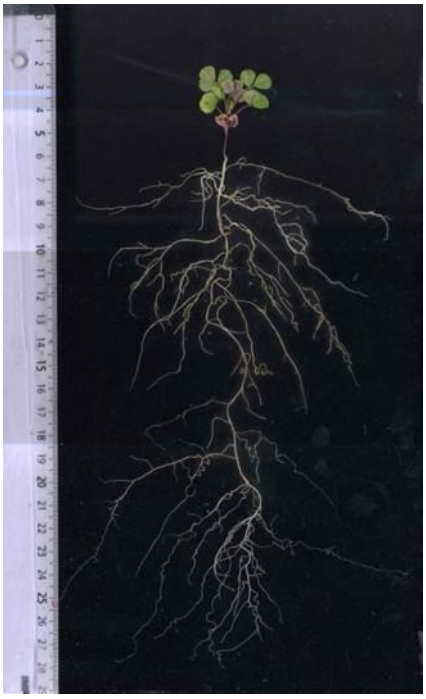
***M. orbicularis* non inoculée**	***M. orbicularis* inoculée avec STM9067**
	

Figure 42 : Photographies montrant l'effet de la souche STM9067 sur la croissance des parties aériennes et racinaires de *M. orbicularis*.

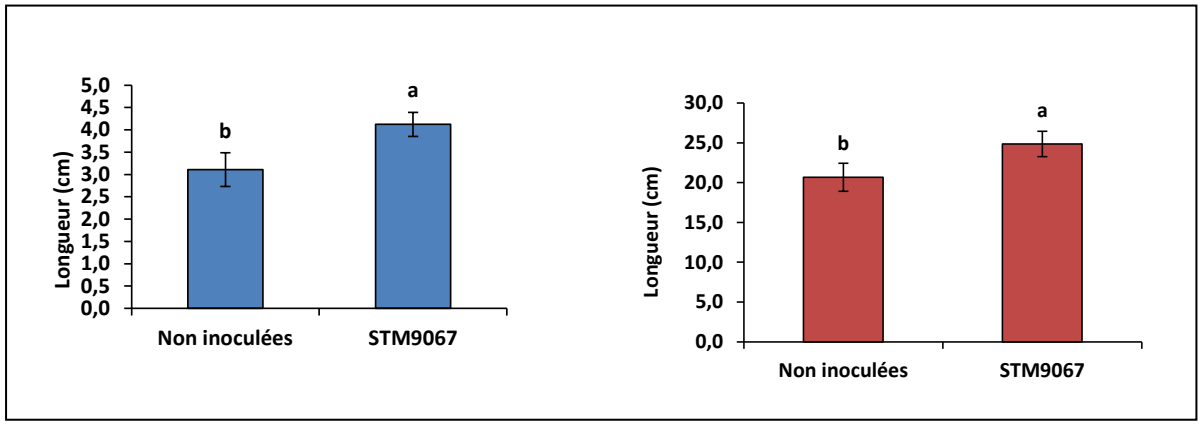


Figure 43 : Longueur des parties aériennes (à gauche) et racinaires (à droite) des plantes de *Medicago orbicularis* inoculées avec la souche STM9067 et comparées aux plantes témoins non inoculées.

Les barres verticales représentent les écart-types (nombre de plants n= 10). Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p<0,05$).

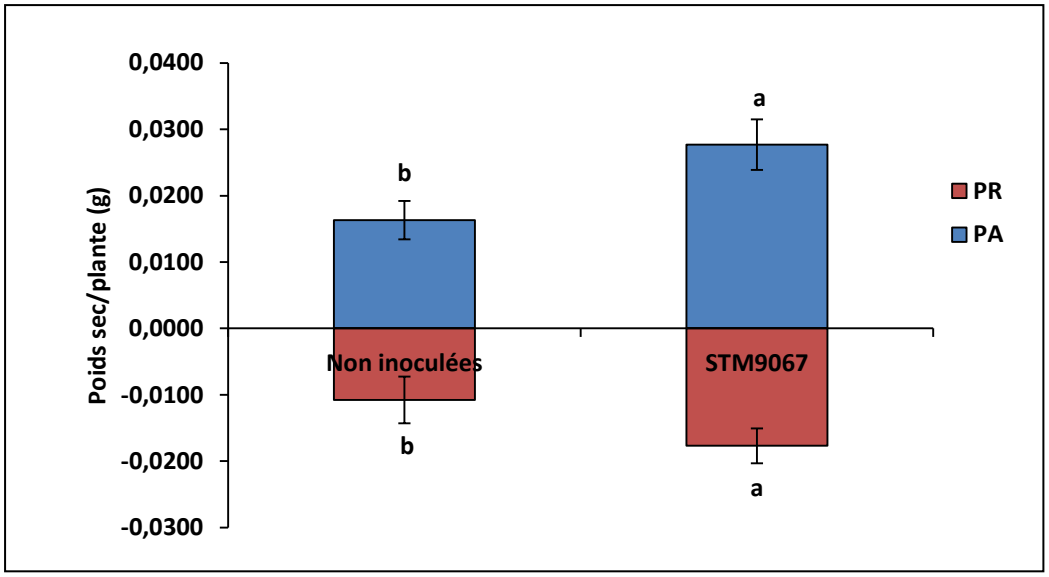


Figure 44 : Biomasse aérienne et racinaire des plantes de *Medicago orbicularis* inoculées avec la souche STM9067 et comparées aux plantes témoins non inoculées.

Les barres verticales représentent les écart-types (nombre de plants n= 10). Des lettres différentes indiquent une différence significative ($p<0,05$).

2.6. Caractéristiques de tolérance aux métaux

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées pour les 17 représentants des groupes définis d'après l'analyse des séquences du gène *rec*A.

Les isolats provenant du site d'El Krib (sol agricole non contaminé) présentent une faible résistance au Zn (CMI ne dépassant pas 0,5 mM de Zn) et paradoxalement, les isolats provenant du sol de Fej El Hdoum et capables de noduler *H. coronarium* ne présentent pas une résistance supérieure, à l'exception de la souche STM9067 qui possède une résistance élevée (CMI = 10 mM Zn) mais n'est pas capable de noduler *H. coronarium*.

Les tests de résistance au cadmium ont donné des résultats plus contrastés (Tableau 14). Deux souches issues du site de Fej El Hdoum (STM9087 et STM9086) présentent une CMI égale à 0,8 mM, une autre égale à 0,3 mM et cinq ont une CMI égale à 0,1 mM. Les autres souches des sites de Fej El Hdoum et El Krib, ainsi que la souche type IS123^T et la souche STM2682 (souche sensible de *Mesorhizobium*) ont des CMI ne dépassant pas 0,05 mM. La souche STM9067 présente une résistance élevée au Cd (CMI = 5 mM).

Tableau 14 : Résistance au Cd de différents isolats de *Rhizobium*. L'OD_{600nm} a été mesurée après deux semaines de croissance dans le milieu YEM (trois répétitions pour chaque souche de rhizobium testée).

CMI Cd	0,02 mM	0,05 mM	0,1 mM	0,3 mM	0,8 mM	3 mM	5 mM
Souches	STM2682	IS123^T	STM9074	STM9084	STM9086	STM2683	STM9067
	STM9031	STM9040	STM9075		STM9087		
	STM9057	STM9042	STM9082				
	STM9080	STM9044	STM9089				
		STM9058	STM9060				

Les souches présentées dans le tableau sont les représentants des 17 groupes définis d'après l'analyse des séquences du gène *rec*A. Les souches provenant du site de Fej El Hdoum sont indiquées en rouge et celles d'El Krib en vert. IS123^T est la souche type de *R. sullae* et STM2683 (résistante au Zn et Cd) celle de l'espèce *M. metallidurans*., STM2682 est une souche de *Mesorhizobium* sensible aux métaux (Mahieu *et al.*, 2011).

2.7. Hybridation ADN-ADN

Deux souches isolées à partir de nodosités prélevées sur des plants d'*H. coronarium* (STM9086 et STM9082) et se distinguant phylogénétiquement de la souche type de *R. sullae* (Figure 39) ont été choisies pour définir plus précisément leur position taxonomique par rapport à la souche type *R. sullae* IS123^T en procédant à des hybridations ADN-ADN. La souche type de *Rhizobium mongolensis* a également été utilisée. Les pourcentages d'hybridation des souches STM9086 et STM9082 avec la souche type IS123^T de *R. sullae* sont respectivement de 65,4 % et 77,5 %. Le pourcentage d'hybridation entre les souches STM9082 et STM9086 est de 83% (Tableau 15). Compte tenu du seuil d'hybridation de 70% pour définir une nouvelle espèce (Wayne *et al.*, 1987), les résultats d'hybridation tendent à indiquer que les deux souches, STM9086 et STM9082 appartiennent à l'espèce *R. sullae*.

Tableau 15 : Valeurs d'hybridation ADN-ADN entre deux souches isolées à partir de nodosités d'*Hedysarum coronarium*, et des souches types de *R. sullae* et *R mongolensis*.

	***Rhizobium sullae* IS123T**	***Rhizobium* sp. STM9086**	***Rhizobium* sp. STM9082**
***Rhizobium* sp. STM9086**	**65,4**	**100**	**100**
***Rhizobium* sp. STM9082**	**77,5**	**83,0**	**100**
***Rhizobium mongolensis* STM246**	**31,5**	**29,2**	**7,9**

3. DISCUSSION

L'isolement de bactéries symbiotiques à partir des nodosités d'*Hedysarum* présents sur deux sites du nord-ouest de la Tunisie nous a permis d'obtenir 65 isolats dont les colonies sont morphologiquement très homogènes, qu'elles proviennent de l'ancien site minier de Fej El Hdoum ou du sol agricole d'El Krib. Ces colonies qui sont apparues après 24 heures d'incubation sur milieu gélosé sont très muqueuses et ont toutes les caractéristiques des bactéries appartenant au genre *Rhizobium* (Berge *et al.*, 2009; Young *et al.*, 2001). L'amplification et l'analyse des séquences partielles des gènes *rec*A, *atp*D et des séquences d'ADNr 16S confirment leur appartenance au genre *Rhizobium* et permettent de préciser le positionnement phylogénétique des souches étudiées. 64 souches sur les 65 sont proches de la souche type IS123 qui représente l'espèce *Rhizobium sullae* définie par Squartini *et al.* (2002) et une seule (STM9067) se révèle relativement éloignée de *R. sullae* et proche de *R.*

endophyticum (Figure 39). Les résultats obtenus avec les 65 souches pour les gènes *rec*A, *atp*D et de l'ADNr 16S sont concordants. Une plus grande diversité est observée avec le gène *rec*A (17 génotypes) alors que seulement 7 génotypes ont été obtenus avec le gène *atp*D. L'analyse des séquences de l'ADNr 16S de 17 représentants des génotypes *rec*A a permis de définir 8 ribotypes. Par ailleurs, sur les 17 génotypes *rec*A, 11 sont retrouvés sur le site de Fej El Hdoum et 4 seulement sur le site d'El Krib. Ainsi, 2 génotypes sont constitués de souches issues des deux sites (Figure 35 et Tableau 11). Il se peut donc que la pression de sélection exercée par la présence de métaux ait favorisé la diversification des souches de *Rhizobium,* comme cela a été observé dans le cas des sols salins non cultivés (Elboutahiri *et al.*, 2010; Trabelsi *et al.*, 2010). *H. coronarium* est une légumineuse qui est couramment cultivée en Tunisie pour la production de fourrage (Ben Jeddi *et al.*, 1998). Sa présence sur le site de Fej El Hdoum pourrait être donc liée à la migration des graines par voie éolienne ou hydrique à partir des parcelles agricoles et cette migration a pu être accompagnée par des souches de *Rhizobium*. Stepkowski *et al.* (2011) ont montré que la séparation géographique (Pologne et Mediterranée) n'a pas permis d'avoir une grande variabilité entre les souches de *Bradyrhizobium*. Ces auteurs ont interprété leurs résultats avec l'hypothèse d'une migration des graines accompagnées de leurs symbiotes. Cette migration pourrait expliquer l'absence de tolérance de la majorité des souches au Zn et au Cd.

Les données disponibles concernant la diversité des bactéries symbiotiques d'*Hedysarum* sont très contrastées et ont été l'objet de controverses. En effet Benhizia *et al.* (2004) ont publié un article dans lequel était revendiqué la découverte, à l'intérieur des nodosités de trois espèces d'*Hedysarum (H. carnosum, H., spinosissimum* et *H. pallidum*) de plusieurs genres bactériens appartenant aux Gamma protéobactéries. Cependant, aucune preuve formelle de la capacité de ces bactéries à noduler *Hedysarum* n'avait été apportée et Muresu *et al.* (2008) ont précisé, d'une part, que ces bactéries étaient incapables de provoquer la nodulation de leurs plantes hôtes respectives et d'autre part, qu'elles n'étaient que de simples bactéries endophytiques accompagnant des rhizobium dont la présence *in situ* a été révélée par l'analyse des gènes de l'ARNr 16S. Des résultats similaires ont été rapportés par Fitouri *et al.* (2011) avec l'isolement de pas moins, sur les 44 souches isolées, de 12 souches bactériennes appartenant à des genres relativement éloignés de *Rhizobium*. Dans notre étude une seule souche (STM9067) s'est révélée génétiquement divergente par rapport aux 65 étudiées. Cette souche, isolée d'un lobe d'une nodosité d'*H. coronarium* s'est révélée incapable de promouvoir la nodulation de cette plante en conditions axéniques mais a par contre un effet

promoteur de la croissance de *Medicago orbicularis* en conditions axéniques. De telles bactéries, dite PGPR « Plant Growth-Promoting Rhizobacteria » (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003), ont été décrites dans des nodosités de pois (Elvira-Recuenco et van Vuurde, 2000), de soja (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004) et de trèfle (Sturz *et al.*, 1997). Il est à noter que la souche STM9067, est phylogénétiquement proche de *R. endophyticum* qui est elle-même une espèce de *Rhizobium* non nodulante (Lopez-Lopez *et al.*, 2010). Il est évident que pour une légumineuse donnée, les nodosités constituent une niche écologique pour les rhizobium (Boivin-Masson *et al.*, 2006) mais ceux-ci sont situés au centre de la nodosité et lors de l'isolement, l'étape de désinfection a pour objectif d'éliminer toutes les bactéries endophytiques issues du sol et ayant colonisé les premières couches cellulaires de la nodosité. L'état physiologique des nodosités et le mode opérationnel mis en œuvre pour la stérilisation est donc déterminant pour la mise en culture des rhizobium et une rigueur absolue lors de l'isolement et pour la vérification de la capacité des bactéries à noduler est nécessaire afin de ne pas surestimer la diversité des bactéries symbiotiques.

La présence d'un écotype d'*Hedysarum coronarium* sur l'ancien site minier de Fej El Hdoum avec des concentrations élevées en Zn, Pb et Cd dans le substrat laissait supposer que les bactéries symbiotiques présentes dans les nodosités présentaient un niveau de résistance élevée au Zn et Pb, comme cela a été observé avec *Mesorhizobium metallidurans*, bactérie symbiotique de la légumineuse *Anthyllis vulneraria* (Vidal *et al.*, 2009). Dans le cas des souches isolées à partir des nodosités d'*H. coronarium* du site de Fej El Hdoum (35 souches), 34 n'ont pas présenté un niveau de résistance au Zn supérieur à celui des souches témoins sensibles. Par contre, plusieurs souches issues de ce site présentent un niveau de résistance au cadmium assez élevé et comparable à des souches de *Mesorhizobium* isolées de divers site miniers (Vidal *et al.*, 2009). Il y a cependant, parmi les 35 souches de Fej El Hdoum, une souche (STM9086) qui se différencie des autres isolats et de la souche type *R. sullae* du point de vue phylogénétique (gènes *rec*A, *atp*D et ADNr 16S) et phénotypique avec une valeur de CMI de 0,8 mM pour le Cd. Les tests d'hybridation ADN-ADN indiquent cependant que la souche STM9086 appartient à l'espèce *R. sullae*. Aucune des souches issues du sol agricole d'El Krib (30 souches), ne présente une résistance au zinc ou au cadmium.

Le fait de ne pas avoir obtenu de nodosités avec l'ensemble des échantillons de sol prélevés à l'intérieur et à l'extérieur de trois sites miniers est à mettre en relation avec l'observation de Robson et Bottomley (1991) selon laquelle les populations de bactéries associées à *Hedysarum* ne sont pas abondantes, voire absentes lorsque la plante n'a pas été

cultivée depuis longtemps ou dans des sols situés dans des régions où la plante n'est pas naturellement présente (Ewing *et al.*, 2001). Ces observations sont à mettre en relation avec le fait qu'il n'a pas été possible d'amplifier et de caractériser les gènes de nodulation *nod*A et *nod*C alors que les souches étudiées sont parfaitement capables d'initier la formation de nodosités sur *H. coronarium.* Cela pourrait signifier, d'une part, que la relation entre *H. coronarium* et sa bactérie symbiotique est très spécifique et implique des gènes *nod*A et *nod*C très particuliers, d'autre part, que *R. sullae* est totalement inféodée à *H. coronarium* et qu'elle n'est donc présente que dans les sols où se trouve sa plante hôte.

Les amorces qui ont pu être définies sur la base des zones conservées au sein des gènes de nodulation connus n'ont pas permis d'amplifier les séquences *nod*A ou n*od*C de ces souches associées à *H. coronarium*. De plus, il n'a jamais été décrit, de séquences *nod* chez des souches de *H. coronarium* publiées à ce jour. Ces observations laissent supposer que les gènes de nodulation de ces souches possèdent des séquences particulières à ce groupe de spécificité d'hôtes.

La présence de bactéries ne présentant pas un niveau de résistance élevée au cadmium ou au zinc dans le substrat de Fej el Hdoum où ces deux éléments sont présents à de fortes concentrations peut paraître surprenante. Cela est sans doute à rapprocher des teneurs en argiles (22,5 %), et en matière organique (2%). Ces éléments sont connus pour, d'une part, complexer les métaux et diminuer leur nocivité (Celis *et al.*, 2000; Peris *et al.*, 2007) et d'autre part, ce sont des éléments constitutifs du complexe argilo-humique. Ce dernier pourrait donc expliquer la présence de micro-niches où les bactéries seraient regroupées et protégées contre les concentrations élevées en métaux (Delorme *et al.*, 2003; Klonowska *et al.*, 2012). Le système racinaire de la plante lui-même ou des fragments de racine pourraient également jouer un rôle protecteur (Giller *et al.*, 2009).

En conclusion, nous avons étudié la diversité des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote associées à *H. coronarium* présentes sur deux sites au nord de la Tunisie, l'ancienne mine de Fej El Hdoum et le sol agricole d'El Krib. Une variation de tolérance au Cd a été observée pour les isolats issus du substrat de Fej El Hdoum. L'analyse phylogénétique a montré que tous les isolats étudiés appartenaient au genre *Rhizobium* et que toutes les souches, à l'exception d'une, sont proches de la souche type de *R. sullae*. L'absence d'amplification de gènes de la symbiose et le fait que la présence de la bactérie soit associée à la présence de la plante hôte sont des indices qui plaident en faveur d'une très forte spécificité d'hôte. Le

séquençage du génome de la souche STM9086 permettra d'identifier les gènes de symbiose et de vérifier l'originalité et les particularités des rhizobium associés au genre *Hedysarum*.

Par ailleurs, l'isolement et la caractérisation des isolats adaptés aux conditions physico-chimiques du site Fej El Hdoum offre la possibilité d'utiliser *H. coronarium* en symbiose avec ses bactéries fixatrices d'azote pour développer une stratégie de phytostabilisation du site.

Chapitre V

Adaptation d'Anthyllis vulneraria, d'Hedysarum coronarium et de Medicago orbicularis à la contamination métallique et influence des bactéries symbiotiques

Chapitre V : Adaptation d'Anthyllis vulneraria, d'Hedysarum coronarium et de Medicago orbicularis à la contamination métallique et influence des bactéries symbiotiques

1. Introduction

Il existe, dans le bassin méditerranéen, de nombreux anciens sites miniers dont l'exploitation est arrêtée depuis plusieurs dizaines d'années. Parmi ces sites figurent les anciennes mines de zinc et plomb localisées au nord de la Tunisie et au sud de la France. Ces sites sont tous sous la contrainte du climat méditerranéen avec d'abondantes précipitations à l'automne et une sécheresse estivale marquée, ce qui rend très difficile l'implantation d'un couvert végétal capable de phytostabiliser les déblais miniers.

Une des règles générales en écologie de la restauration est d'utiliser des espèces locales. On considère que le succès d'installation des espèces diminuera si on utilise des diaspores en provenance de sites éloignés (Linhart, 1995). Ainsi, l'utilisation d'espèces locales adaptées aux conditions d'un site donné est un mot clé pour faciliter sa restauration écologique (Bischoff *et al.*, 2008; Leimu et Fischer, 2008; McKay *et al.*, 2005). L'adaptation locale a été démontrée dans les sols serpentiniques (Kazakou *et al.*, 2008) ou dans les sols des anciens sites miniers fortement contaminés par les ETMs comme le Zn, le Pb, le Cd ou le Ni (Shaw, 1990). Les espèces qui colonisent ces sols ont développé des mécanismes de tolérance comme par exemple l'exclusion du métal en empêchant son entrée par les racines ou bien en confinant le métal dans les parties aériennes comme les vacuoles ou les trichomes de manière à ne pas interférer avec le métabolisme cellulaire (Baker et Walker, 1990).

Toutefois, la diversité des espèces végétales et entre-autre celle des légumineuses est généralement très faible dans les milieux où le substrat contient de fortes teneurs en ETMs et seules les plantes tolérantes sont capables de les coloniser (Antonovics *et al.,* 1971). Aussi, la recherche des espèces végétales appartenant à la famille des Fabacées poussant sur d'autres sites miniers doit être envisagée pour permettre l'entrée d'azote dans l'écosystème et ainsi accélérer l'installation d'une couverture végétale. C'est dans ce contexte, que nous avons réalisé une expérimentation consistant à évaluer les niveaux de tolérance et de croissance de plusieurs légumineuses et de leurs microsymbiotes fixateurs d'azote atmosphérique issus de deux sites miniers sur leur substrat d'origine et sur le substrat contaminé d'une autre mine ainsi que sur celui d'un sol non contaminé. L'expérimentation s'apparente à une transplantation réciproque (Kawecki et Ebert, 2004 ; Mahieu *et al.,* 2012).

Des études antérieures conduites au Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes ont montré que *Mesorhizobium metallidurans,* une souche isolée des nodosités d'*Anthyllis vulneraria* sous-espèce *carpatica*, présente sur l'ancienne mine des Avinières (Saint Laurent Le minier) (Vidal *et al.,* 2009), est capable de tolérer de fortes en Zn et Pb. Ainsi, on a également montré dans le **chapitre III** que la population de la sous-espèce *carpatica* qui se développe sur les sols contaminés de la mine des Avinières (Gard) est une plante hypertolérante et accumulatrice de Zn. L'utilisation de cette légumineuse sur le site des Avinières est importante puisqu'elle favorise l'installation ultérieure d'autres espèces végétales (Frérot *et al.,* 2006) grâce à la fixation d'azote atmosphérique. Mahieu *et al.* (2011) ont démontré que 80% de l'azote total dans *A. vulneraria* est originaire de N_2 atmosphérique.

En plus d'*Anthyllis vulneraria*, d'autres légumineuses ont été observées sur un ancien site minier au nord de la Tunisie. *Hedysarum coronarium* et *Medicago orbicularis* ont été identifiées et utilisées dans le **chapitre IV** comme plantes hôtes pour isoler des bactéries symbiotiques. Par contre, aucune étude n'a été réalisée sur ces deux espèces pour caractériser leur tolérance aux métaux.

L'objectif de ce chapitre est donc d'étudier et d'évaluer le niveau d'adaptation d'*A. vulneraria*, d'*H. coronarium* et de *M. orbicularis* associées à leurs bactéries symbiotiques sur les substrats miniers des Avinières et de Fej El Hdoum.

2. Résultats

Le matériel et les méthodes utilisés pour cette partie sont présentés dans le **chapitre II**, **partie 3**.

2.1. Biomasse aérienne et racinaire

Sur le substrat des Avinières, la biomasse des parties aériennes et racinaires d'*Anthyllis vulneraria* sous-espèce *carpatica* est supérieure à celle obtenue sur les substrats de Fej El Hdoum et du Col du Vent. Lorsque les plantes sont cultivées en présence d'azote minéral (3 mM de KNO_3), la biomasse est respectivement de 3 et 4 fois plus élevée que celle des plantes cultivées sur les substrats du Col du Vent et de Fej El Hdoum (Figure 45a et b). En ce qui concerne *Hedysarum coronarium*, la biomasse des plantes (parties aériennes et racinaires) cultivées en présence d'azote minéral (3 mM de KNO_3) est significativement plus élevée sur son substrat d'origine (Fej El Hdoum). En effet, les matières sèches des parties aériennes et racinaires des plantes cultivées sur le substrat des Avinières ne représentent respectivement que 14 % et 16,5 % de celles des plantes cultivées sur le substrat de Fej El Hdoum (Figure 46a et b). De même, une différence significative des biomasses des parties aériennes et racinaires des plantes d'*H. coronarium* est observée entre les plantes cultivées sur les substrats de Fej El Hdoum et du Col du Vent. Par contre, les biomasses des parties aériennes et racinaires de *M. orbicularis* sont très sensiblement réduites au contact des substrats de Fej El Hdoum et des Avinières. En effet, les matières sèches aériennes des plantes cultivées sur le substrat de Fej El Hdoum et des Avinières représentent respectivement 30,8 % et 35 % de celles des plantes cultivées sur le substrat non contaminé du Col du Vent (Figure 47a). Au niveau des racines, une biomasse racinaire significativement plus élevée a été observée avec les plantes de *M. orbicularis* cultivées sur le sol de Fej El Hdoum par rapport à celles placées au contact du substrat des Avinières (Figure 47b).

Lorsque les plantes sont cultivées sur les deux substrats contaminés, l'inoculation d'*A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* avec la souche symbiotique STM2683, d'*H. coronarium* avec la souche STM9069 et de *M. orbicularis* avec l'inoculum composé de trois souches symbiotiques a généré une légère augmentation de la matière sèche des parties aériennes et racinaires par rapport aux plantes alimentées en azote avec 3 mM de KNO_3 (Figures 45, 46 et 47). Cependant, cette augmentation générée par l'inoculation avec les souches symbiotiques pour les substrats des Avinières et de Fej El Hdoum n'est pas statistiquement significative à

l'exception de la matière sèche racinaire d'*A.v.* sous-espèce *carpatica* sur son substrat d'origine (Figure 45a et b et Figure 46a et b).

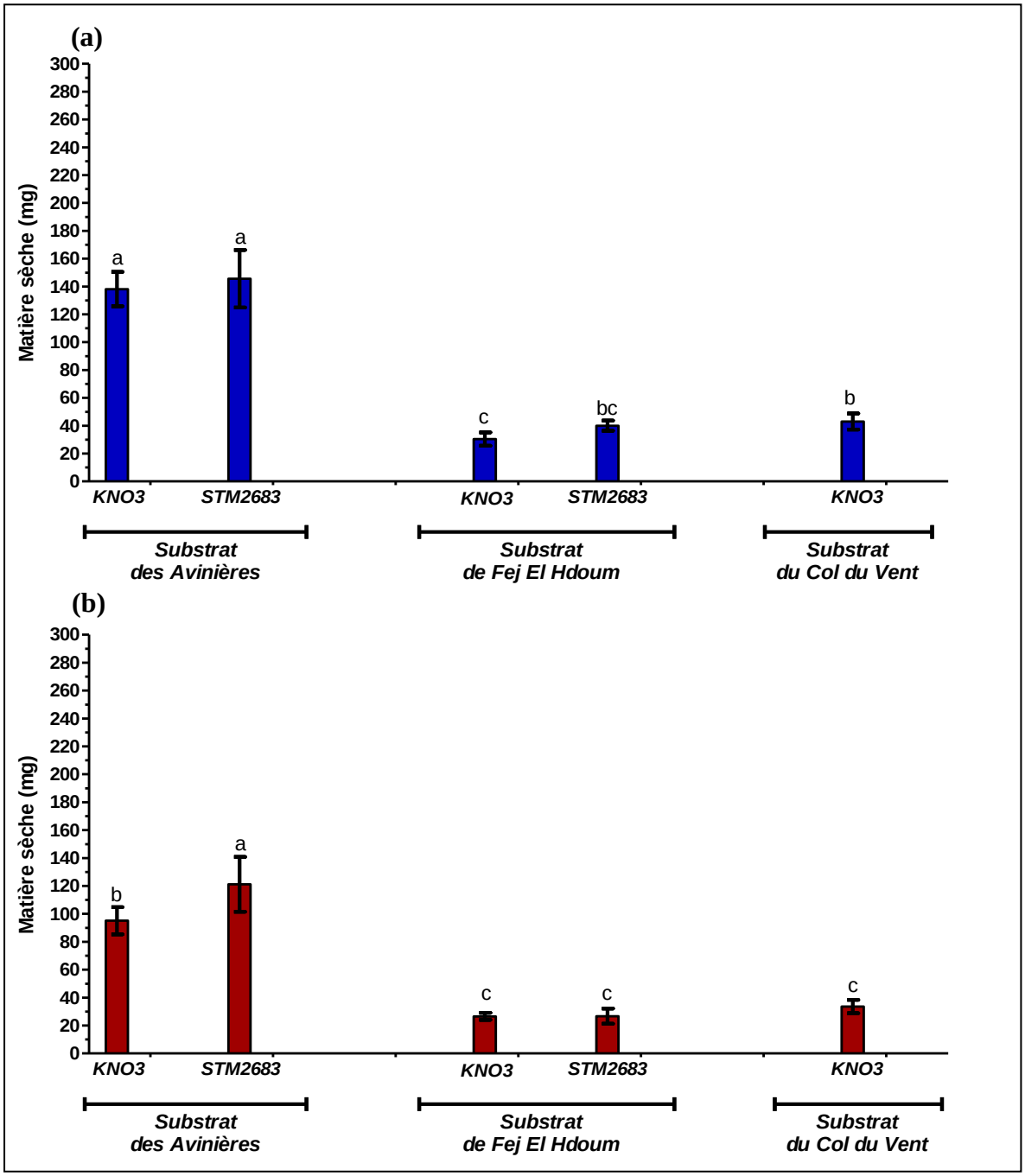


Figure 45 : Biomasse des parties aériennes en g par plante (a) et racinaires (b) d'*Anthyllis vulneraria* sous-espèce *carpatica* cultivée sur trois types de substrats (Avinières, Fej El Hdoum et Col du Vent) alimentée en azote avec 3 mM de KNO_3 ou inoculée avec la bactérie symbiotique STM2683.

Des différences significatives au seuil de 5% sont notées par des lettres différentes.

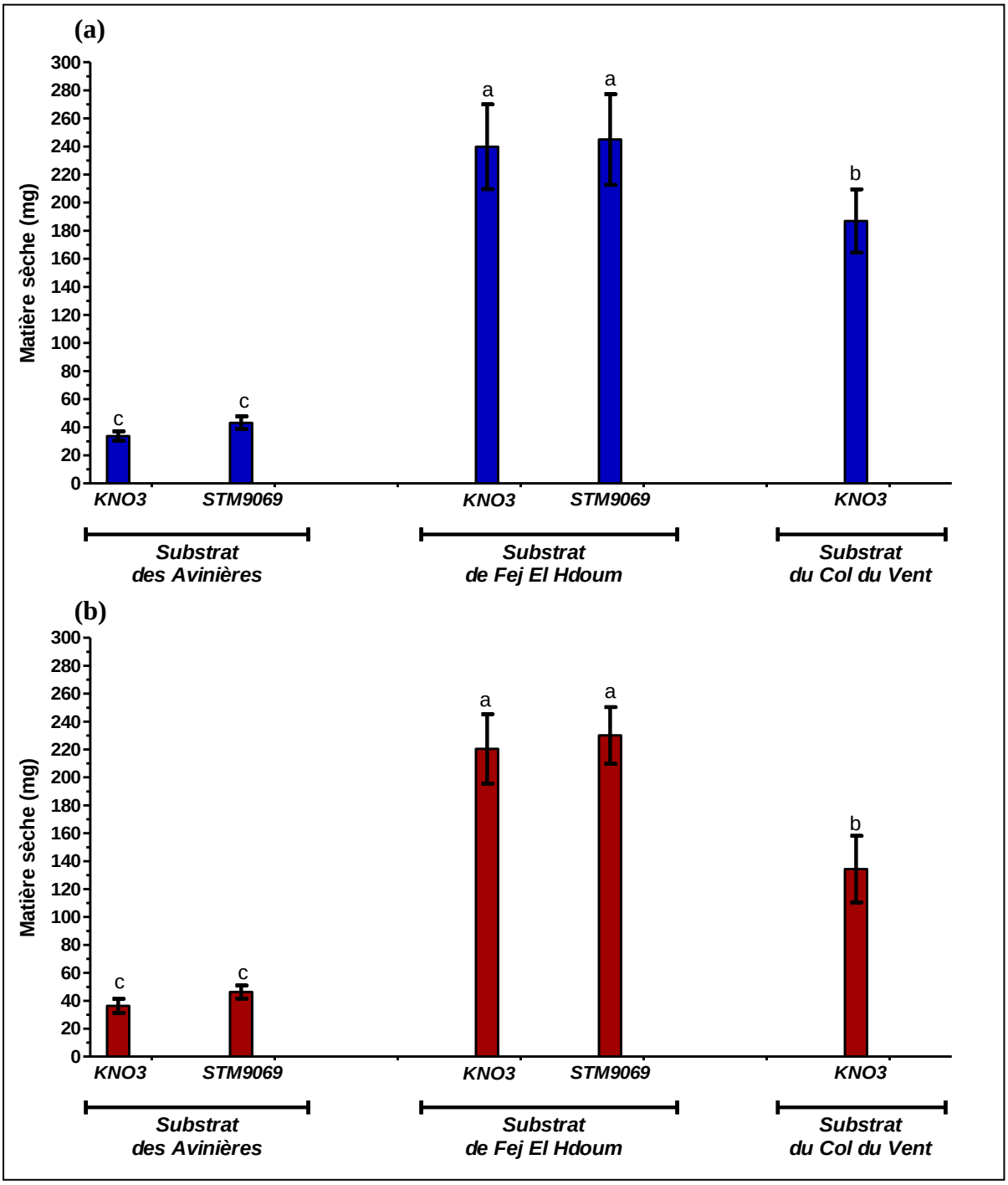


Figure 46 : Biomasse des parties aériennes en g par plante (a) et racinaires (b) d'*Hedysarum coronarium* cultivée sur trois types de substrats (Avinières, Fej El Hdoum et Col du Vent), alimentée en azote avec 3 mM de KNO_3 ou inoculée avec la bactérie symbiotique STM9069.

Des différences significatives au seuil de 5% sont notées par des lettres différentes.

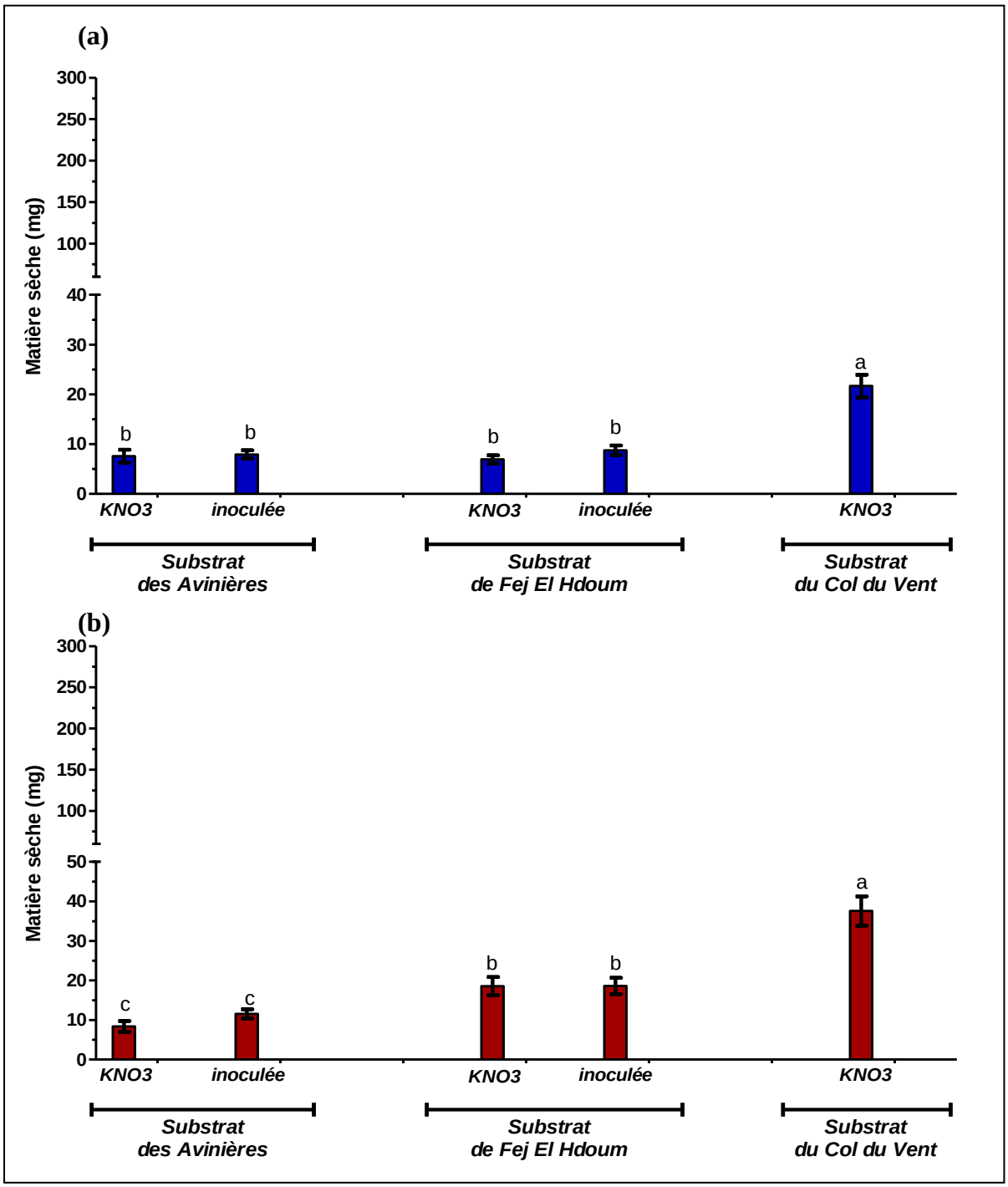


Figure 47 : Biomasse des parties aériennes en g par plante (a) et racinaires (b) de *Medicago orbicularis* cultivée sur trois types de substrats (Avinières, Fej El Hdoum et Col du Vent), alimentée en azote avec 3 mM de KNO_3 ou inoculée avec un inoculum associant trois souches.

Des différences significatives au seuil de 5% sont notées par des lettres différentes.

2.2. Biomasse des nodosités

L'analyse statistique (ANOVA) de la biomasse des nodosités révèle un effet significatif des deux substrats contaminés pour chacune des deux légumineuses testées. En effet, chaque espèce a beaucoup mieux nodulé sur son substrat d'origine. Avec *H. coronarium* et *M. orbicularis*, la biomasse des nodosités atteint respectivement 37 mg et 0,15 mg pour les plantes cultivées sur le substrat de Fej El Hdoum. Cette biomasse est respectivement 14 et 2,5 fois plus élevée que celle obtenue avec les plantes cultivées sur le substrat des Avinières. Sur ce dernier substrat, *A.v.* sous-espèce *carpatica* a produit 17 fois plus de nodosités que sur le substrat de Fej El Hdoum (Figure 48).

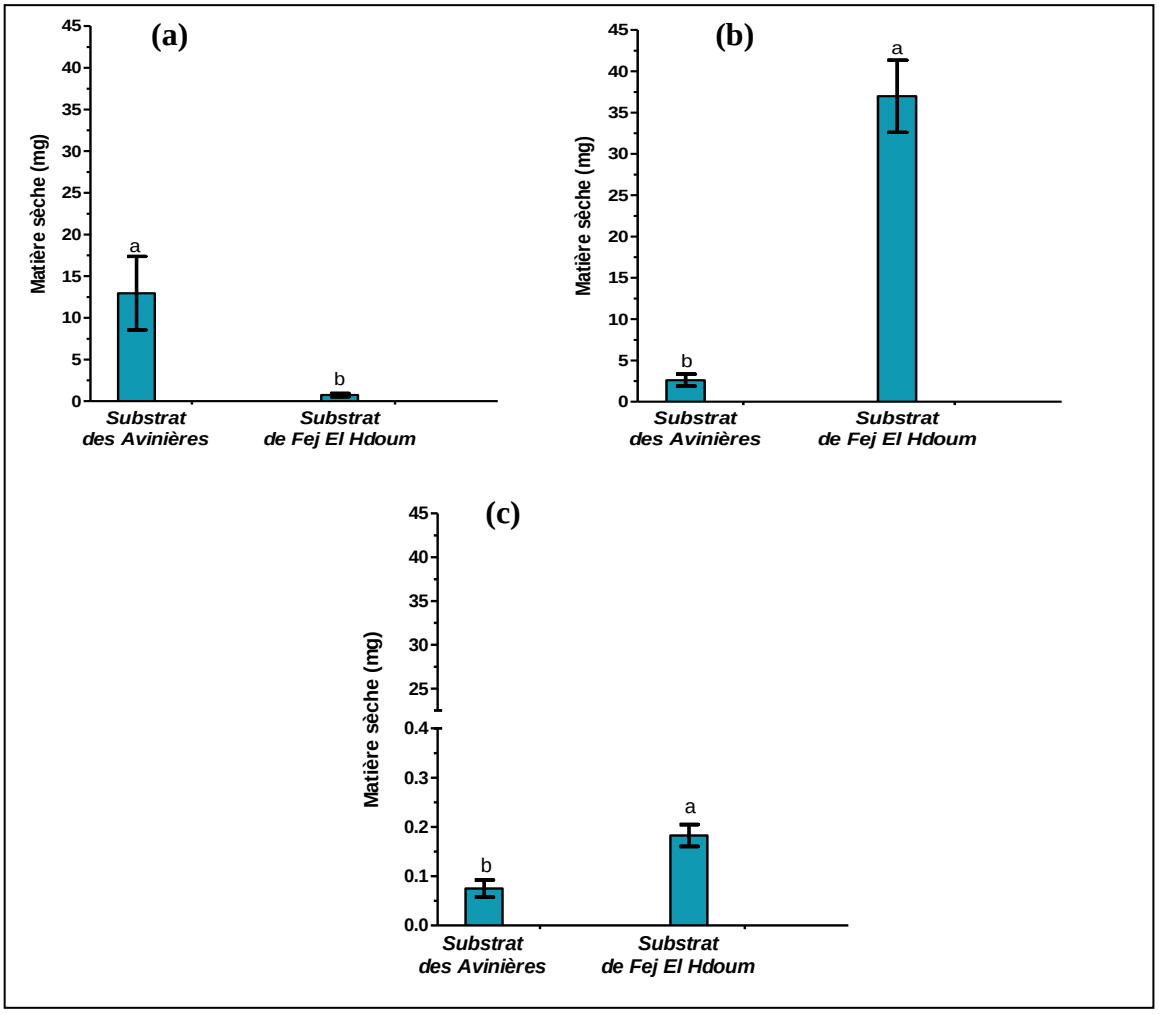


Figure 48 : Biomasse de nodosités d'*A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* (a), d'*H. coronarium* (b) et de *M. orbicularis* (c) inoculées avec les bactéries symbiotiques dans les substrats des Avinières et de Fej El Hdoum.

Des différences significatives au seuil de 5% sont notées par des lettres différentes.

2.3. Mesures de fluorescence des feuilles

Lorsque les plantes sont cultivées en présence de 3 mM de KNO_3, la teneur en chlorophylle la plus élevée a été enregistrée avec *A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* cultivée sur son substrat d'origine (les Avinières). En effet, lorsque cette sous-espèce est cultivée sur le substrat de Fej El Hdoum, la valeur de fluorescence déterminée par SPAD ne dépasse pas 57 % de celle qui est obtenue avec les plantes cultivées sur le substrat des Avinières (Figure 49a). De même, pour *H. coronarium,* la valeur SPAD la plus élevée a été obtenue lorsque cette espèce végétale est cultivée sur le substrat de Fej el Hdoum (Figure 49b). La fluorescence des feuilles obtenue pour les plantes cultivées sur le substrat des Avinières est faible (environ 38% de celle enregistrée avec les plantes cultivées sur le substrat de Fej El Hdoum) alors que les plantes cultivées sur le substrat du Col du Vent présentent une fluorescence des feuilles équivalente à celle obtenue avec le substrat de Fej el Hdoum. En ce qui concerne *M. orbicularis*, seules les plantes cultivées avec le substrat du Col du Vent et en présence de 3 mM de KNO_3 présentent une fluorescence assez importante. Au niveau des deux substrats contaminés, une teneur en chlorophylle plus élevée a été obtenue avec le substrat Fej El Hdoum tandis qu'avec le substrat des Avinières, des symptômes de toxicité très nets sont observés au niveau des feuilles (fluorescence des feuilles ne dépassant pas les 46 % de celle enregistrée avec les plantes cultivées sur le substrat de Fej El Hdoum) (Figure 49c).

Par rapport aux plantes alimentées avec une solution nutritive contenant 3 mM de KNO_3, l'inoculation des plantes d'*A.v.* sous-espèce *carpatica* avec la souche de *Mesorhizobium* STM2683 n'a pas modifié de façon significative la teneur en chlorophylle des plantes placées au contact du substrat des Avinières alors que pour le substrat de Fej El Hdoum, l'augmentation de la fluorescence des feuilles est significative (Figure 49a).

Chez les deux autres légumineuses, l'inoculation d' *H. coronarium* avec la souche de *Rhizobium* STM9069 et de *M. orbicularis* avec des souches bactériennes a favorisé une augmentation significative de la teneur en chlorophylle pour les plantes qui ont été cultivées sur le substrat des Avinières mais en valeur absolue, la teneur en chlorophylle reste faible. Il n'y a pas eu de modification significative pour les plantes inoculées placées sur le substrat de Fej El Hdoum.

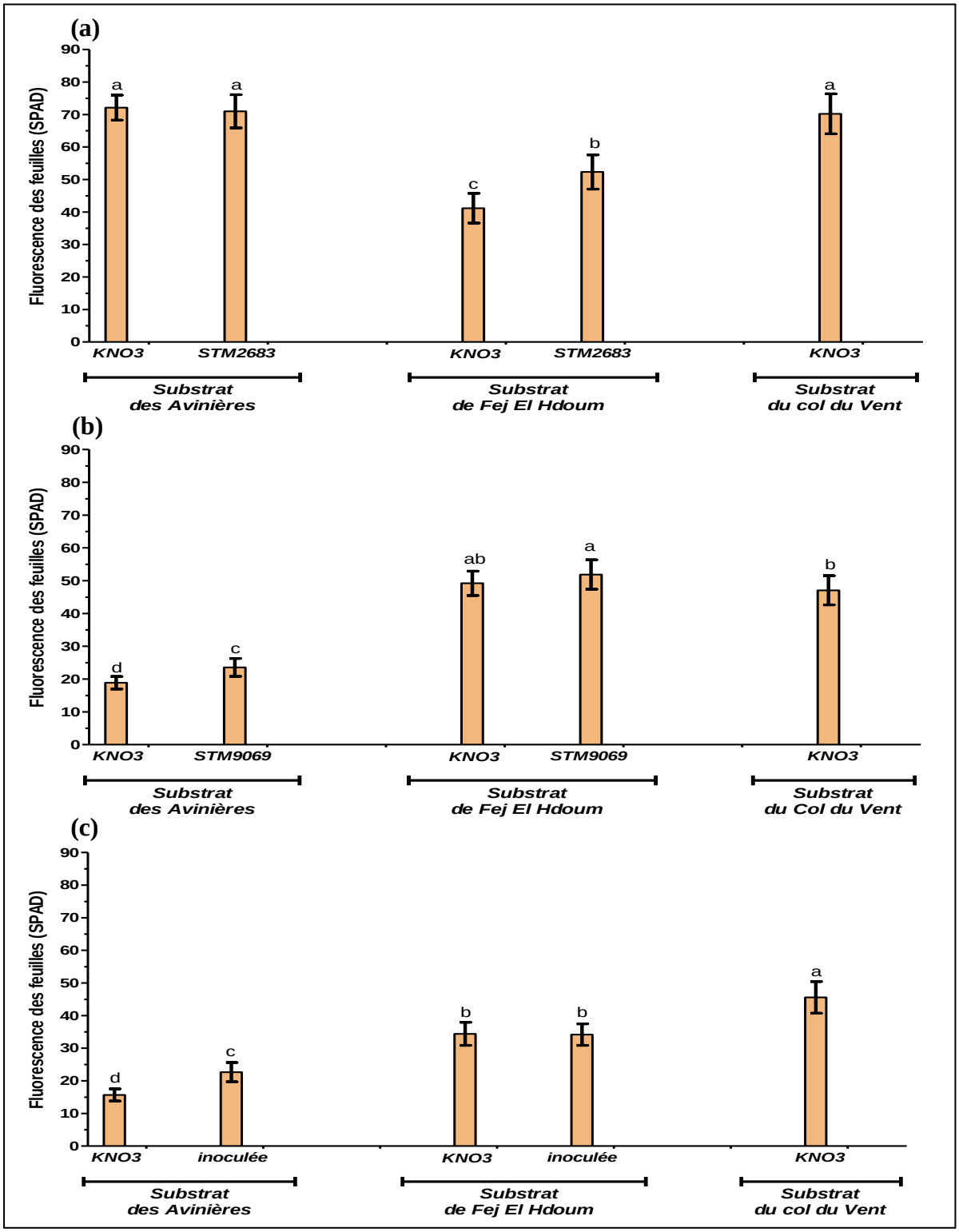


Figure 49 : Mesures de fluorescence des feuilles d'*A.v.* sous-espèce *carpatica* (a), d'*H. coronarium* (b) et de *M. orbicularis* (c) cultivées sur trois types de substrats (Avinières, Fej El Hdoum et Col du Vent) soit en présence de 3 mM KNO_3 ou inoculée avec des souches symbiotiques.

Des différences significatives au seuil de 5% sont notées par des lettres différentes.

3. Discussion

Dans cette expérimentation, nous avons caractérisé la croissance de trois espèces végétales : *A. vulneraria* sous-espèce *carpatica, H. coronarium et M. orbicularis* alimentées en azote (KNO_3) sur trois types de substrats ou en symbiose avec des souches bactériennes sur deux substrats contaminés par des métaux.

La biomasse des parties aériennes et racinaires a toujours été nettement plus élevée lorsque l'espèce végétale était cultivée sur son substrat d'origine. La culture des plantes sur un autre substrat a généré une forte réduction de la biomasse des parties aériennes et racinaires pour *A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* et *H. coronarium*. Ceci est particulièrement accentué avec *A. vulneraria* sous-espèce c*arpatica,* y compris lorsqu'elle était placée sur le substrat non contaminé. Ce résultat confirme celui obtenu par Mahieu *et al.* (2012) qui ont montré que les populations d'*A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* ne présentent pas une croissance optimale et ont un taux de mortalité élevé sur le substrat non contaminé. Bien qu'*A. vulneraria* sous-espèce c*arpatica* soit une plante hypertolérante et accumulatrice en Zn (résultats du **chapitre III**), sa croissance sur le substrat de Fej El Hdoum est assez inattendue. Ceci peut cependant s'expliquer, si on considère que la contamination des sols et des substrats de culture des plantes par les métaux exerce une forte sélection sur les espèces végétales et favorise une adaptation locale (Antonovics et Bradshaw, 1970 ; Antonovics *et al.*, 1971 ; Mahieu *et al.*, 2012). De surcroît, le substrat de Fej El Hdoum contient des quantités importantes de strontium et l'effet de la surabondance de cet élément sur la croissance des végétaux est peu documenté.

Par ailleurs, et en dehors du fait que les substrats miniers des Avinières et de Fej El Hdoum aient en commun d'être contaminés par des métaux, ils sont très différents du point de vue de leurs propriétés physico-chimiques (Tableaux 6 et 7). La diminution observée pour les biomasses des parties racinaires et aériennes d'*A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* et d'*H. coronarium* est accompagnée par d'évidents symptômes de toxicité (diminution de la fluorescence des feuilles) lorsqu'ils sont mis en contact avec les substrats contaminés dont ils ne sont pas issus (Figure 49a et b). Cette tendance a été également observée avec *M. orbicularis* sur les substrats contaminés avec valeur de fluorescence clairement affectée pour le substrat des Avinières (Figure 49c). La diminution de la fluorescence des feuilles est très certainement liée à une diminution de l'activité photosynthétique qui est souvent associée à des processus d'accélération de la sénescence (Monnet *et al.*, 2001).

La toxicité des métaux lourds est également liée à des stress oxydatifs induits dans les systèmes vitaux des végétaux (Hattab *et al.*, 2009). Chez le pois, l'application d'une concentration élevée en Cd a provoqué une nette baisse de la teneur en chlorophylle. Cette diminution pourrait être liée à l'augmentation de la concentration cellulaire des dérivés réactifs de l'oxygène en réduisant la capacité antioxydante cellulaire (Hattab *et al.*, 2009).

L'inoculation d'*A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* avec la souche STM2683, d'*H. coronarium* avec la souche STM9069 et de *M. orbicularis* avec les souches bactériennes a induit une modification du comportement des plantes lorsqu'elles sont placées au contact des substrats contaminés. L'inoculation d'*A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* avec la souche STM2683 et d'*H. coronarium* avec la souche STM9069 a permis, lorsque les plantes ont été mises en contact avec les substrats des sites dont elles sont originaires, d'obtenir des biomasses des parties aériennes et racinaires équivalentes à celles obtenues lorsque les plantes étaient cultivées en présence de 3 mm de KNO_3 sauf pour les racines des plantes d'*A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* où une amélioration significative de la biomasse racinaire a été observée. Par contre, lorsque les plantes ont été mises en contact avec l'autre substrat, celui de Fej El Hdoum pour *A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* et des Avinières pour *H. coronarium*, aucune amélioration significative de la production de biomasse n'a été observée. Ceci est à relier à la très faible biomasse de nodosités observées pour ces plantes qui montre que l'interaction plante-bactérie a été perturbée et la mobilisation de l'azote de l'air n'a pas été efficace. Il est cependant intéressant de voir qu'*A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* inoculée avec la souche STM2683 présente une valeur de fluorescence supérieure à celle enregistrée avec les plantes alimentées en KNO_3 ce qui traduit un meilleur état physiologique des plantes et une meilleure adaptation au substrat de Fej El Hdoum. En ce qui concerne *M. orbicularis*, bien qu'elle soit issue du site minier de Fej El Hdoum, elle n'a pas montré une forte production de biomasse végétale lorsqu'elle est cultivée sur son substrat d'origine ou sur celui des Avinières lorsqu'elle est alimentée avec 3 mM de KNO_3.

En raison de la très faible biomasse de nodosités, l'augmentation de fluorescence des feuilles ne peut être imputée à une entrée d'azote significative dans la plante mais plutôt à la présence des bactéries dans la rhizosphère et au niveau du rhizoplan d'*Anthyllis*. Plusieurs études ont en effet montré que l'interaction entre les plantes et les microorganismes rhizosphériques peut avoir un effet bénéfique pouvant stimuler la production de biomasse et la tolérance des plantes aux métaux (Belimov *et al.*, 2005; Glick, 2003). Comme cela a été

discuté dans le **chapitre III**, les bactéries rhizosphériques, peuvent diminuer le stress métallique induit par les métaux lourds par des mécanismes comme l'efflux d'ions métalliques vers l'extérieur de la cellule végétale, la biostimulation, la réduction des métaux ou la biosorption (Outten *et al.*, 2000). D'autres travaux réalisés avec les champignons mycorhiziens ont mis en évidence un effet protecteur de ces champignons vis à vis des plantes exposées à de fortes concentrations en métaux (Chen *et al.*, 2007; Janouskova et Vosatka, 2005; Leyval *et al.*, 1995).

Le dosage des métaux dans les tissus végétaux d'*Anthyllis* permettra de vérifier le rôle protecteur de la souche STM2683. Il serait également nécessaire de dénombrer dans la rhizosphère, les bactéries apportées par inoculation dans les deux types de substrats afin de vérifier que les quantités de bactéries au contact des racines sont compatibles avec leur capacité à limiter l'effet toxique des métaux.

Une association performante entre une légumineuse et sa bactérie symbiotique permet d'augmenter la teneur en azote dans le substrat et facilite l'installation d'autres espèces végétales (Frérot *et al.*, 2006 ; Mahieu *et al.*, 2011). Cependant, la présence de légumineuses sur tous les sites fortement pollués n'est pas acquise et il peut donc être nécessaire de rechercher des espèces végétales appartenant à la famille des Fabacées sur d'autres sites miniers pour les introduire sur les sites à réhabiliter. Cependant, si on se réfère aux résultats de notre étude et ceux obtenus par Mahieu *et al.* (2012), on constate que l'association entre *A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* et d'*H. coronarium* et leurs bactéries symbiotiques fixatrices d'azote sont performantes sur leur substrat d'origine mais pas nécessairement sur d'autres substrats. Ceci est probablement dû à la composition physico-chimique des deux substrats, à la teneur en métaux et peut-être à la spéciation chimique des métaux dans les deux substrats.

McKay *et al.* (2005) avaient souligné l'intérêt des espèces locales pour la restauration écologique et nos résultats sont en accord avec les conclusions des travaux de Bischoff *et al.* (2008).

A. vulneraria sous-espèce *carpatica*, comme il a été montré dans le **chapitre III**, est une plante hypertolérante et accumulatrice de Zn. Son utilisation pourrait être d'une grande efficacité dans la restauration des sites fortement contaminés par les métaux (> 30000 $mg.kg^{-1}$ de Zn) du sud de la France (Mahieu *et al.*, 2012). *H. coronarium* semble très bien adaptée au

site de Fej El Hdoum et cette légumineuse est potentiellement très intéressante pour la végétalisation des anciens sites miniers du nord de la Tunisie et du nord de l'Algérie.

En ce qui concerne *M. orbicularis* qui a produit une biomasse des parties aériennes et racinaires élevée sur un substrat normal (non contaminé), elle ne semble pas très adaptée aux substrats contaminés mais elle pourrait être employée pour restaurer des milieux perturbés comme les sites d'extraction de granulats (Cullen *et al.*, 1998).

Chapitre VI

Discussion générale et perspectives

Chapitre VI : Discussion générale et perspectives

Les questions scientifiques et les approches expérimentales présentées et développées dans mon mémoire de thèse ont permis de préciser :

- l'absorption et l'accumulation du zinc chez plusieurs sous-espèces d'une légumineuse, *Anthyllis vulneraria*, associée ou non à sa bactérie symbiotique (**Chapitre III**).

- la diversité phénotypique et génotypique de microsymbiotes fixateurs d'azote associés à *H. coronarium,* une légumineuse présente sur un ancien site minier du nord de la Tunisie (**Chapitre IV**).

- l'adaptation locale réciproque d'*A. vulneraria,* d'*H. coronarium* et de *M. orbicularis* à la contamination métallique du sol, en présence ou en absence de leurs bactéries symbiotiques (**Chapitre V**).

Originalité de l'association *A. vulneraria-Mesorhizobium* et de son adaptation à la contrainte métallique

L'étude de l'accumulation de Zn chez quatre sous-espèces d'*Anthyllis vulneraria* a permis de mettre en évidence les particularités de la sous espèce *A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* et l'importance de l'association symbiotique dans l'absorption de métal par la plante (**chapitre III**).

(i) **Etude de la plante hôte, *A. vulneraria* :** en présence de 3 mM de KNO_3, l'exposition des différentes sous-espèces d'*A. vulneraria* à 1000 µM de Zn a révélé que la sous-espèce la

plus tolérante était celle qui est naturellement présente sur le site des Avinières à Saint Laurent le Minier dans le Gard. Cette plante, *A. vulneraria* sous-espèce *carpatica*, a poursuivi sa croissance en présence de 1000 µM de Zn sans montrer de symptômes de toxicité. Par contre, le mauvais état physiologique des trois sous-espèces, *boscii*, *praepropera* et *vulneraria*, en présence de 1000 µM de Zn s'est traduit par une très nette diminution de leurs biomasses aériennes et racinaires. La toxicité a été observée visuellement avec les sous-espèces *boscii*, *praepropera* et *vulneraria*, dès qu'elles ont été exposées à 250 µM de Zn et cela a été confirmé par une diminution significative des valeurs de fluorescence des feuilles, indice permettant de mesurer leur état de verdissement. La mesure de la fluorescence s'est ainsi révélée être un meilleur indicateur pour montrer la phytotoxicité du Zn que la biomasse des parties aériennes. La toxicité du zinc est souvent associée à des processus d'accélération de la sénescence (Monnet *et al.*, 2001). Cependant, dans notre cas, la diminution de la photosynthèse pourrait également être liée à une différence de l'efficacité de l'absorption du Fe qui, étant ajouté sous forme Fe-EDTA, a pu être exclu et partiellement précipité, provoquant une carence potentielle en cet élément (Hindt et Guerinot, 2012).

L'originalité de la sous-espèce *carpatica*, en plus de ses caractéristiques physiologiques de tolérance au Zn, a également été révélée par sa capacité à accumuler des quantités élevées de Zn dans ses tissus. La teneur en Zn atteint 14 000 µg / g de matière sèche dans les parties aériennes sans montrer de symptômes de toxicité. Ces résultats sont comparables à ceux observés avec d'autres plantes comme *Noccaea caerulescens* et *Arabidopsis halleri* qui ont fait l'objet de nombreuses études portant sur les mécanismes d'absorption et d'accumulation du Zn et du Cd (Assunçao *et al.*, 2003; Bert *et al.*, 2002; Escarre *et al.*, 2000; Frerot *et al.*, 2010; Milner et Kochian, 2008). Cependant, le rapport de la concentration en Zn dans les parties aériennes / concentration en Zn dans les racines chez *A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* est inférieur à 1 (0,31), ce qui ne permet pas de la considérer comme une plante hyperaccumulatrice (Reeves et Baker, 2000). *A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* doit être considérée comme une plante hypertolérante et accumulatrice de Zn (Chaney *et al.*, 1997; Rascio et Navari-Izzo, 2011).

La seconde sous-espèce, *A. vulneraria* sous-espèce *boscii*, issue de l'ancienne mine d'Eylie n'a pas montré un comportement aussi particulier que la sous-espèce *carpatica* quand elle a été exposée à de fortes concentrations en zinc. En effet, cette sous-espèce s'est comportée comme une espèce non tolérante en présence de Zn et elle ne se différencie pas des sous-

espèces *praepropera* et *vulneraria* qui sont issues de sols non contaminés. Ceci est peut-être lié à l'origine de cette plante et aux propriétés physico-chimiques du sol dont la teneur en matières organiques est élevée, induisant une diminution de la disponibilité des métaux (Peris *et al.*, 2007). La disponibilité en ETMs pourrait donc être insuffisante pour exercer une pression de sélection suffisamment forte sur la sous-espèce *boscii* pour lui permettre d'acquérir une tolérance significative au Zn (Mahieu *et al.*, 2012).

(ii) **La bactérie symbiotique :** Sous forte contrainte métallique (1000 µM Zn), l'inoculation avec la souche symbiotique métallicole STM2683 n'a pas permis d'améliorer la tolérance des sous-espèces *boscii*, *praepropera* et *vulneraria*. Il semble que lorsqu'une plante n'est pas intrinsèquement tolérante à de fortes concentrations en Zn, l'association avec la souche métallicole de *Mesorhizobium* ne permet pas une augmentation significative de sa tolérance. Par contre, lorsqu'elle est exposée à une concentration modérée de Zn (250 µM), la souche métallicole de *M. metallidurans* joue un rôle protecteur qui est notamment perceptible lorsque l'on prend en compte les valeurs de fluorescence des feuilles. La protection des sous-espèces d'*A. vulneraria* sensibles par la souche métallicole de *M. metallidurans* est certainement liée à des déterminants génétiques qui sont impliqués dans la tolérance de cette bactérie aux métaux. Certains déterminants ont été étudiés par Maynaud *et al.* (in preparation) et il a été montré que la résistance de cette souche est déterminée par une séquestration des métaux et un système d'efflux de type P-ATPase tel que CadA1. Ces mécanismes sont sans doute utilisés par la bactérie pour détoxifier le milieu.

L'association de la sous-espèce *carpatica* et des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote, que celles-ci soient métallicoles ou non métallicoles, a induit un comportement très intéressant avec une baisse systématique de la teneur en Zn à l'intérieur de la plante. Cette diminution ne peut être expliquée par l'accumulation de ce métal dans les nodosités puisque la quantité de Zn dans les nodosités ne dépasse pas 1% de la quantité totale de Zn par plante. Ceci pourrait plutôt être expliqué par le fait que les microsymbiotes peuvent limiter l'entrée ou réduire la biodisponibilité des ETMs et modifier leur absorption par la plante hôte. En effet, la séquestration ou l'efflux de métaux lors de la phase libre dans la rhizosphère représente un phénomène répandu qui limite l'entrée massive des métaux dans les racines (Blindauer *et al.*, 2002; Nies, 2003). De plus, une absorption suivie d'une séquestration intracellulaire grâce aux agents chélateurs comme le glutathion (Figueira *et al.*, 2005) ou une

immobilisation des métaux au niveau des parois cellulaires bactériennes par la synthèse des exopolysaccharides capable de lier les métaux pourrait également expliquer la diminution de l'absorption de métaux et notamment le Zn chez les plantes associées aux bactéries (Zhang et Min, 2009). Ainsi, l'activation du système ROS (Reactive Oxygen Species)-désintoxication de la plante par les bactéries endophytes est considérée comme une voie prometteuse pour protéger l'espèce végétale hôte contre les effets toxiques des ETMs (Zaets *et al.*, 2010). Dans ce contexte, la tolérance des plantes hôtes au stress oxydatif pourrait être améliorée par des endophytes et White et Torres (2010) ont suggéré qu'une surproduction d'antioxydants par la plante pourrait être le résultat d'une production de ROS par les endophytes. Ces derniers pourraient activer de multiples enzymes antioxydantes impliquées dans la lutte contre le stress oxydatif causé par les ROS (Ardanov *et al.*, 2011).

La contribution de *M. metallidurans* comme bactérie endophyte sur l'absorption des métaux et leur accumulation dans la légumineuse *A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* doit être spécifiquement étudiée car Glick (2003) a démontré que des microorganismes rhizosphériques peuvent améliorer la production de biomasse et la tolérance des plantes aux ETMs. Pour cela, il serait intéressant d'examiner cette bactérie métallicole au niveau de la rhizosphère en utilisant des mutants ne permettant pas d'initier la nodulation (Nod^-). Ceci nous permettrait de voir si la diminution de Zn dans *A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* est liée à la présence de *M. metallidurans* en phase libre dans la rhizosphère ou si cette bactérie doit être à l'intérieur des tissus du végétal et notamment dans les nodosités.

Dans le cadre de mon travail de thèse, l'utilisation de la souche sensible STM2682 a également favorisé la diminution de la concentration en Zn dans les parties aériennes de la sous-espèce *carpatica* et dans les racines de toutes les sous-espèces. Ces résultats suggèrent que les bactéries pourraient être impliquées dans la régulation de l'accumulation de Zn via le processus de nodulation. Cette observation est intéressante car dans le cadre de l'utilisation de la sous-espèce *carpatica* en association avec ses microsymbiotes pour la phytostabilisation écologique des sites miniers, la présence des bactéries symbiotiques conduit à une diminution de la teneur en ETMs dans les parties aériennes et limite ainsi le risque de transfert dans la chaîne alimentaire. Cependant, dans le substrat des Avinières qui contient des concentrations très élevées en ETMs, la souche sensible, STM2682 disparaît très rapidement (Mahieu *et al.*, 2011) et seule la souche métallicole peut survivre. En hydroponie, le caractère d'hypertolérance de la sous-espèce *carpatica* à 1000 µM de Zn a sans doute permis de

protéger la bactérie sensible. Cependant, une analyse fine de la localisation et de la spéciation du Zn dans la plante, y compris dans les nodosités par des techniques de rayonnements synchrotrons (Sarret *et al.*, 2009) permettra d'évaluer l'impact de l'interaction *A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* - souches symbiotiques métallicoles ou non métallicoles sur les mécanismes d'absorption et de localisation du Zn dans les tissus de la plante. Des analyses de localisation et de spéciation de Zn chez cette sous-espèce inoculée avec STM2683 ou STM2682 sont en cours de réalisation dans le cadre de l'ANR SyMetal (Rhizostabilisation de déblais miniers à fortes teneurs en métaux par des plantes Metallicoles associées à leurs microorganismes SyMbiotiques, CES 2010) en collaboration avec M.P. ISAURE (Laboratoire de Chimie Analytique Bio-inorganique et Environnement ; Université de Pau). Il serait également important d'étudier les mécanismes à l'origine de l'acquisition des caractères d'hypertolérance au zinc et son accumulation dans les parties aériennes et surtout racinaires d'*A. vulneraria* sous-espèce *carpatica*. Ce travail pourrait être réalisé en collaboration avec P. DOUMAS et P. BERTHOMIEU (Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes ; Montpellier) pour identifier les gènes responsables de cette tolérance.

L'étude du transport de Zn et la détermination de la localisation du métal dans les cellules végétales et bactériennes nous permettront de définir les bases physiologiques et moléculaires qui différencient la sous-espèce *carpatica* des autres sous-espèces non métallicoles et ainsi mieux comprendre comment la présence des bactéries peut réguler les gènes impliqués dans le transport et l'accumulation du Zn.

Diversité des populations symbiotiques associées à *Hedysarum coronarium*

L'étude de diversité des rhizobium associés à *H. coronarium* issus de deux sites du nord de la Tunisie (Fej El Hdoum : ancienne mine de Zn et Pb et El Krib : sol d'une ferme agricole) a montré que la population de rhizobium du site de Fej El Hdoum possède une signature phylogénétique et phénotypique particulière en ce sens que la diversité observée est plus importante que celle du sol agricole non contaminé (**Chapitre IV**).

L'analyse phénotypique portant sur la tolérance au Zn et au Cd a mis en évidence l'existence d'isolats présentant une réelle tolérance au Cd (CMI = 0,02-5 mM) sur le site minier alors qu'aucune tolérance n'a été détectée chez les isolats issus du site non contaminé (CMI≤0,05 mM). La variabilité de la tolérance au Cd pourrait être déterminée par la

composition du sol qui contient des quantités élevées de calcaire (43,4 %), d'argiles (22,5 %) et de matière organique (2%). Ces éléments sont connus pour leur capacité à complexer les métaux et à diminuer leur nocivité (Celis *et al.*, 2000; Peris *et al.*, 2007; Tlustoš *et al.*, 2006). Ainsi, la formation du complexe argileux-humique pourrait intervenir dans la protection des bactéries sensibles en formant des micro-niches (Delorme *et al.*, 2003).

En ce qui concerne les analyses phylogénétiques, les isolats étudiés appartiennent au genre *Rhizobium* et sont proches de la souche type *R. sullae* (pourcentage identité supérieur à 98 % pour les gènes *rec*A et *atp*D). L'analyse du gène de l'ARNr 16S révèle que seule, la souche STM9067 est phylogénétiquement éloignée de *R. sullae* et proche de *R. endophyticum*. Cette distance phylogénétique est à rapprocher de l'absence de nodulation des plantes de l'écotype d'*Hedysarum* présent sur le site de Fej El Hdoum lorsqu'elles sont inoculées avec la souche STM9067 et de la double résistance de cette souche à des concentrations élevées en Zn et en Cd. La présence de cette souche dans une nodosité d'*Hedysarum* pourrait s'expliquer par le fait que c'est une bactérie rhizosphérique et accompagnatrice des bactéries symbiotiques. Il a été montré que l'exsudation de petites molécules comme les acides aminés, les sucres et les acides organiques par les racines des plantes ont la capacité d'attirer les bactéries rhizosphériques qui ont besoin de ces exsudats pour leur croissance et leur métabolisme (Glick, 2003). Ceci pourrait donc expliquer la présence de la souche STM9067 dans les nodosités d'*H. coronarium*. L'inoculation de *Medicago orbicularis* avec la souche STM9067 n'a pas permis d'initier la formation de nodosités mais un effet significatif sur la croissance des parties aériennes et racinaires a été observé. L'effet PGPR de cette souche peut présenter un intérêt dans des milieux chargés en ETMs pour améliorer la croissance des plantes (Glick, 2003). En effet, l'efficacité de la phytoremédiation pourrait dans ce cas être améliorée par une double inoculation et l'utilisation conjointe de bactéries symbiotiques et rhizosphériques (Dary *et al.*, 2010). Il serait donc important lors de futures études de tester l'effet PGPR de la souche STM9067 en association avec des bactéries symbiotiques sensibles dans des milieux chargés en ETMs comme les sites de Fej El Hdoum ou des Avinières.

Toutes les souches isolées des deux sites de Fej El Hdoum et El Krib, à l'exception de la souche STM9067 proche de *R. endophyticum*, ont été capables d'initier la formation de nodosités sur *H. coronarium.* Les mesures de fluorescence sont généralement assez directement corrélées à l'efficacité de la symbiose et peuvent traduire l'efficacité des bactéries symbiotiques (Maynaud *et al.*, 2012). Cependant, dans notre étude, les mesures de

fluorescence sont plutôt corrélées à la présence/absence de nodosités sur *Hedysarum* et ce sont les biomasses des parties aériennes qui sont beaucoup plus informatives et permettent d'identifier les souches très efficaces pour la fixation de l'azote (Rejili *et al.*, 2012). Malgré l'évidente aptitude des souches testées à noduler, les essais d'amplification des gènes symbiotiques (*nod*A et *nod*C) n'ont pas permis d'accéder à la diversité des gènes de nodulation des microsymbiotes d'*H. coronarium.* La relation entre *H. coronarium* et ses bactéries symbiotiques est probablement hautement spécifique et le séquençage du génome sera nécessaire pour identifier le cluster des gènes impliqués dans la symbiose.

H. coronarium a été introduite au nord de la Tunisie pour principalement lutter contre l'érosion du sol des zones montagneuses et pour ses qualités fourragères (Slim et Ben Jeddi, 2011; Slim *et al.*, 2012). Son introduction est obligatoirement accompagnée d'une inoculation afin d'optimiser la croissance des plantes (Fitouri *et al.*, 2012). Compte tenu de l'emplacement géographique de l'ancienne mine de Fej El Hdoum, il est possible que la présence de cette légumineuse avec ses microsymbiotes soit issue d'une dissémination des graines accompagnées de leurs symbiotes par voie éolienne (anémochorie) ou hydrique (hydrochorie) à partir des parcelles agricoles avoisinantes (Stepkowski *et al.*, 2011). Ainsi, dans un substrat où la présence d'ETMs est faible, certaines bactéries symbiotiques d'*Hedysarum* auraient pu s'adapter aux conditions locales du milieu. La résistance de nos souches au Cd pourrait être dans ce cas liée une acquisition des gènes de résistance par transferts plasmidiques ou d'ilots génomiques provenant d'une souche déjà tolérante aux métaux (Janssen *et al.*, 2010). Une étude comparative du génome de la souche résistante et de celui d'une souche sensible nous aidera à confirmer cette hypothèse.

Influence du milieu sur l'adaptation des légumineuses et leurs microsymbiotes : Intérêt pour la restauration des sols

Des études antérieures ont montré l'intérêt d'*A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* dans l'installation des autres espèces végétales sur le site des Avinières (Frérot *et al.*, 2006 ; Mahieu *et al.*, 2011). Cependant, nous ne disposons pas de données scientifiques sur l'intérêt d'*H. coronarium* et de *M. orbicularis* au niveau du site de Fej El Hdoum. L'utilisation des trois légumineuses (*A. vulneraria, H. coronarium* et de *M. orbicularis*) sur deux substrats chargés en ETMs (Avinières, Fej El Hdoum) et d'un troisième non contaminé (Col du Vent) a permis de mettre en évidence une réponse différenciée en relation avec la nutrition azotée et le

type de sol. Nous avons pu montrer une forte adaptation des espèces végétales sur le substrat sur lequel elles sont naturellement présentes (**Chapitre V**). Cette adaptation a été mise en évidence avec les valeurs élevées de fluorescence au niveau des feuilles et par l'amélioration de la production de biomasse aérienne. En revanche, lorsque ces trois légumineuses sont mises en contact avec un substrat qui n'est pas celui de leur milieu d'origine, cela a généré une forte réduction de la biomasse et des symptômes de toxicité ont été mis en évidence (diminution de la fluorescence des feuilles). Cette adaptation à la contrainte du substrat d'origine était particulièrement marquée avec *A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* qui est une plante hypertolérante et accumulatrice de Zn (**chapitre III**). L'inhibition de la croissance d'*A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* sur le substrat de Fej El Hdoum est assez surprenante et son comportement pourrait certainement être dû à des exigences particulières en éléments minéraux et en particulier en zinc qui ne serait pas suffisamment disponible en raison des caractéristiques physico-chimiques de ce substrat. En fait, les propriétés physico-chimiques du substrat des sites des Avinières et de Fej El Hdoum sont différentes, ce qui pourrait avoir induit la sélection de génotypes particuliers pour chaque espèce végétale sur un site donné et ainsi favoriser l'acquisition d'une capacité d'adaptation de chaque espèce aux conditions locales de son milieu (Antonovics et Bradshaw, 1970 ; Antonovics *et al.*, 1971 ; Mahieu *et al.*, 2012). L'adaptation des métallophytes à un environnement minier pourrait se faire suite à une évolution rapide car les ETMs exerceraient une forte sélection dans les populations de plantes qui peuvent maintenir une adaptation locale, malgré un flux de gènes importants (Antonovics et Bradshaw, 1970 ; Frérot, 2004). Cette adaptation est généralement présente dans les populations qui se développent sur un sol non contaminé et le milieu chargé en ETMs ne fait que sélectionner les individus déjà tolérants (Walley *et al.*, 1974 ; Wu *et al.*, 1975). Ces individus sont en très petit nombre sur un sol normal parce qu'ils sont faiblement compétitifs. En effet, des expériences comparant la compétitivité de plantes tolérantes ou pas, de la même espèce, sur un sol non contaminé, ont montré que les plantes tolérantes aux métaux lourds sont plus petites et faiblement compétitives (Antonovics *et al.*, 1971 ; Bastow Wilson, 1988 ; Cook *et al.*, 1972 ; Hickey et McNeilly 1975). Cette faible compétitivité a été interprétée comme un coût lié à la tolérance, c'est à dire l'énergie dépensée dans la création de complexes métalliques ou bien dans la séquestration du métal dans les vacuoles par exemple. Pour cette raison, on a suggéré que les plantes tolérantes ont besoin probablement de fortes quantités de métaux et pour cette raison elles montrent une déficience métallique dans les sols non contaminés (Wu, 1990 ; Macnair *et al.*, 2000). Le meilleur exemple est celui de

préadaptation à la colonisation des sols serpentiniques par une sous-espèce de *Phacelia dubia*, provenant d'un substrat granitique (Taylor et Levy, 2002). L'adaptation d'*H. coronarium* et d'*A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* à un nouveau substrat minier nécessite très probablement l'obtention d'un caractère adaptatif et l'implantation de nombreux génotypes de chacune des deux espèces sur de nouveaux sites permettrait sans doute de détecter des individus adaptés à de nouveaux environnements.

La difficulté d'adaptation d'*H. coronarium* et d'*A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* cultivées sur le substrat dont elles ne sont pas issues, s'est également traduit par une faible nodulation. Cette perturbation de l'interaction plante-bactérie a engendré un défaut de mobilisation de l'azote de l'air et une déficience de production de biomasse pour *A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* sur le substrat de Fej El Hdoum et chez *H. coronarium* sur le substrat des Avinières. Cependant, l'analyse des données de fluorescence au niveau des feuilles a permis de déceler une amélioration de l'état physiologique des plantes d'*A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* et d'*H. coronarium* inoculées avec leurs bactéries symbiotiques respectives montrant ainsi une meilleure adaptation respectivement au substrat de Fej El Hdoum et des Avinières. L'inoculation des plantes dans le substrat dont elles ne sont pas issues avec une suspension bactérienne dense (10^9 UFC. ml^{-1} de bactérie) a donc eu un effet positif, indépendamment de la faible nodulation. Une étude complémentaire est ainsi nécessaire pour évaluer la survie de chaque souche dans les trois sols. Ceci nous permettra ainsi de suivre leur adaptation aux conditions de chaque milieu et de vérifier l'effet bénéfique de cette interaction sur la stimulation, la production de biomasse et la tolérance des plantes aux métaux comme cela a été signalé par Belimov *et al.* (2005) et Glick (2003).

Comme cela a été démontré dans le **chapitre III**, l'association d'*A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* avec la souche STM2683 a induit une diminution de la concentration en Zn dans les tissus végétaux de la plante, ce qui présente de nouvelles perspectives pour la phytostabilisation, en diminuant les risques de transfert des ETMs dans la chaîne alimentaire. Il serait donc important de doser les métaux dans *H. coronarium* et *M. orbicularis* afin de mieux appréhender le comportement de ces plantes en présence de leurs souches symbiotiques.

En conclusion, le travail présenté dans mon mémoire de thèse montre l'importance des caractéristiques physico-chimiques des substrats miniers et notamment de la présence des ETMs comme facteur déterminant de l'adaptation de Fabacées et de leurs bactéries symbiotiques à la contrainte métallique. Ainsi, les caractéristiques du substrat minier des Avinières ont favorisé l'acquisition d'une très forte tolérance d'*A. vulneraria* sous-espèce *carpatica* aux ETMs et au Zn en particulier, avec la capacité de cette plante à accumuler cet élément dans ses parties aériennes sans présenter de symptômes de toxicité. L'expérimentation réalisée en conditions contrôlées a également révélé qu'une autre espèce d'*Anthyllis, A. vulneraria* sous-espèce *boscii,* issue d'un ancien site minier ne se différencie pas clairement des sous-espèces non métallicoles. L'exposition d'*Hedysarum coronarium* qui est spontanément présente sur l'ancienne mine de Fej El Hdoum au nord-ouest de la Tunisie, sur le substrat des Avinières et d'*A. vulneraria* sous-espèce *carpatica,* sur le substrat de Fej El Hdoum, confirme que la forte pression de sélection exercée par le milieu sur les plantes conduit à leur adaptation à un environnement spécifique.

La présence dans les substrats miniers de bactéries symbiotiques fixatrices d'azote spécifiques des Fabacées métallicoles permet à ces dernières, grâce à la formation de nodosités, de mobiliser l'azote de l'atmosphère et favorise leur croissance. Ces bactéries ont également la capacité de faire diminuer la concentration en Zn dans les tissus végétaux et de maintenir les Fabacées non métallicoles dans un bon état physiologique lorsque ces dernières sont exposées à des concentrations modérées en Zn.

La coexistence, dans un substrat fortement contaminé en ETMs, de bactéries symbiotiques non métallicoles et métallicoles, suppose l'existence de micro-niches qui favoriserait la protection des bactéries symbiotiques sensibles et augmenterait leur chance de survie.

L'ensemble du travail montre que l'installation d'un couvert végétal stable et diversifié, sur les sites fortement impactés par la présence d'ETMs, doit être réfléchi en amont avec des études portant sur les végétaux, la microflore et les amendements visant à corriger les paramètres physico-chimiques pour faciliter l'installation, en première séquence de végétation, de Fabacées et de leurs microsymbiotes bactériens et mycorhiziens.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abd-Alla, M.H., Morsy, F.M., El-Enany, A.W.E., Ohyama, T., 2012. Isolation and characterization of a heavy-metal-resistant isolate of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* potentially applicable for biosorption of Cd^{2+} and Co^{2+}. International Biodeterioration and Biodegradation 67 : 48-55.

ADEME., APCA., 2005. Dérogation relative à la règlementation sur l'épandage des boues de stations d'épuration. Comment formuler une demande pour les sols à teneurs naturelles élevées en éléments traces métalliques ? Guide technique. Bernard, J. et Bispo (Coordinateurs). Baize, D., Sterckeman, T., Piquet, A., Ciesielski, H., Béraud, J. et Bispo, A. (Eds). pp 11.

Adhikari, T., Singh, M.V., 2003. Sorption characteristics of lead and cadmium in some soils of India. Geoderma 114 : 81-92.

Adriano, D.C., 2001. Trace elements in terrestrial environments: Biochemistry, bioavailability and risks of metals. 2ed. Springer-Verlag, New York. pp 4-12, 64-65.

Alloway, B.J., 1995. Heavy metals in soils. 2ed. Blackie Academic and professional. pp 11.

An, Y.J., 2004. Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. Environmental Pollution 127 : 21-26.

Andrews, J.M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 48 : 5-16.

Antonovics, J., Bradshaw, A.D., 1970. Evolution in closely adjacent plant populations .8. Clinal patterns at a mine boundary. Heredity 25 : 349-362.

Antonovics, J., Bradshaw, A.D., Turner, R.G., 1971. Heavy metal tolerance in plants. Advances in Ecological Research 7 : 1-85.

Ardanov, P., Ovcharenko, L., Zaets, I., Kozyrovska, N., Pirttilä Anna, M., 2011. Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.). Biological Control 56 : 43-49.

Arrivault, S., Senger, T., Kramer, U., 2006. The *Arabidopsis* metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply. Plant Journal 46 : 861-879.

Assuncao, A.G., Pieper, B., Vromans, J., Lindhout, P., Aarts, M.G., Schat, H., 2006. Construction of a genetic linkage map of *Thlaspi caerulescens* and quantitative trait loci analysis of zinc accumulation. New Phytologist 170 : 21-32.

Assunção, A.G.L., Da Costa Martins, P., De Folter, S., Vooijs, R., Schat, H., Aarts, M.G.M., 2001. Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Plant, Cell and Environment 24 : 217-226.

Assunçao, A.G.L., Schat, H., Aarts, M.G.M., 2003. *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. New Phytologist 159 : 351-360.

Aucour, A.M., Pichat, S., Macnair, M.R., Oger, P., 2011. Fractionation of stable zinc isotopes in the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* and nonaccumulator *Arabidopsis petraea*. Environmental Science and Technology 45 : 9212-9217.

Bååth, E., Diaz-Ravin, M., Frostegård, A., Campbell, C.D., 1998. Effect of Metal-Rich Sludge Amendments on the Soil Microbial Community. Applied and Environmental Microbiology 64 : 238–245.

Babbou-Abdelmalek, C., Sebei, A., Chaabani, F., 2011. Incurred environmental risks and potential contamination sources in an abandoned mine site. African Journal of Environmental Science and Technology 5 : 894-915.

Bai, Z.G., Dent, D.L., Olsson, L., Schaepman, M.E., 2008. Proxy global assessment of land degradation. Soil Use and Management 24 : 223-234.

Baize, D., 2009. Cadmium in soils and cereal grains after sewage-sludge application on French soils. A review. Agronomy for Sustainable Development 29 : 175-184.

Baker, A.J.M., 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., Walker, P.L., 1990. Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In : Shaw, A. J. (Ed). Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. pp 155-177.

Bani, A., Echevarria, G., Sulçe, S., Morel, J.L., 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.

Banwart, S., 2011. Save our soils. Nature 474 : 151-152.

Bastow Wilson, J., 1988. The cost of heavy-metal tolerance: an example. Evolution 42 : 408-413.

Begum, A.A., Leibovitch, S., Migner, P., Zhang, F., 2001. Specific flavonoids induced nod gene expression and pre-activated nod genes of *Rhizobium leguminosarum* increased pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments. Journal of Experimental Botany 52 : 1537-1543.

Bejaoui, J., Bouhlel, S., Barca, D., Braham, A., 2011. Le champ filonien à (Zn-Pb, Cu, As, Hg) du district minier de Fedj Hassène (Nord Ouest de la Tunisie): Minéralogie, Eléments en traces, Isotopes du Soufre et Inclusions Fluides. Estudios Geológicos 67 : 5-20.

Belimov, A.A., Hontzeas, N., Safronova, V.I., Demchinskaya, S.V., Piluzza, G., Bullitta, S., 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.

Ben Jeddi, F., Zouaghi, M., Behaeghe, T., 1998. Le sulla sauvage: biodiversité et création variétale. In Actes du premier séminaire international sur la mobilisation, l'exploitation et la conservation des ressources naturelles. pp 387-397.

Ben Jeddi, F., 2005. *Hedysarum coronarium* L.: variation génétique, création variétale et utilisation dans des rotations tunisiennes. Thèse présentée pour l'obtention du grade de Docteur (Ph.D.) en Sciences Biologiques Appliquées. Faculté de Bio-Ingénieurs Wetenschappen, pp 5-7.

Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Muresu, R., Giacomini, A., Squartini, A., 2004. Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. Systematic and Applied Microbiology 27 : 462-468.

Berge, O., Lodhi, A., Brandelet, G., Santaella, C., Roncato, M.A., Christen, R., Heulin, T., Achouak, W., 2009. *Rhizobium alamii* sp. nov., an exopolysaccharide-producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59 : 367-372.

Bert, V., Bonnin, I., Saumitou-Laprade, P., de Laguerie, P., Petit, D., 2002. Do *Arabidopsis halleri* from nonmetallicolous populations accumulate zinc and cadmium more effectively than those from metallicolous populations? New Phytologist 155 : 47-57.

Berti, W.R., Cunningham, S.D., 2000. Phytostabilization of metals. In : Raskin, I. and Ensley, B.D. (Eds). Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean- up the environment. New York, John Wiley & Sons, Inc. pp 71-77.

Bertrand, H., Nalin, R., Bally, R., Cleyet-Marel, J.C., 2001. Isolation and identification of the most efficient plant growth-promoting bacteria associated with canola (*Brassica napus*). Biology and Fertility of Soils 33 : 152–156.

Bischoff, A., Steinger, T., Müller-Schärer, H., 2008. The Importance of Plant Provenance and Genotypic Diversity of Seed Material Used for Ecological Restoration. Restoration Ecology 18 : 338-348.

Blencowe, D.K., Morby, A.P., 2003. Zn(II) metabolism in prokaryotes. FEMS Microbiology Reviews 27 : 291-311.

Blindauer, C.A., Harrison, M.D., Robinson, A.K., Parkinson, J.A., Bowness, P.W., Sadler, P.J., Robinson, N.J., 2002. Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. Molecular Microbiology 45 : 1421-1432.

Boivin-Masson, C., Bontemps, C., Golfier, G., Gris-Liebe, C., Talini, L., 2006. Détection et typage du gène *nodC* à l'aide de biopuces à ADN : perspectives pour l'étude de la diversité et de l'écologie moléculaire des rhizobia. Les Actes du BRG 6 : 97-110.

Boullard B., 2001. Dictionnaire: Plantes médicinales du monde, réalités et croyances. Ed

Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme, F.W., 2000. Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxicology and Environmental Safety 45 : 198-207.

Cabrera E., Villa A., Ruiz-Argüeso T., 1979. Diversidad y caracterizacion de la flora nativa de rizobios que nodulan en zulla.VII Congreso National de Microbiologia.Cadiz. pp 294.

Carrasco, J.A., Armario, P., Pajuelo, E., Burgos, A., Caviedes, M.A., López, R., Chamber, M.A., Palomares, A.J., 2005. Isolation and characterisation of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcóllar pyrite mine. Soil Biology and Biochemistry 37 : 1131-1140.

Casella, S., Gault, R.R., Reynolds, K.C., Dyson, J.R., Brockwell, J., 1984. Nodulation Studies on Legumes Exotic to Australia - *Hedysarum Coronarium*. FEMS Microbiology Letters 22 : 37-45.

Cashion, P., Holder-Franklin, M.A., McCully, J., Franklin, M., 1977. A rapid method for base ratio determination of bacterial DNA. Analytical Biochemistry 81 : 461-466.

Celis, R., Hermosiän, M.C., Cornejo, J., 2000. Heavy Metal Adsorption by Functionalized Clays. Environmental Science and Technology 34 : 4593-4599.

Chaintreuil, C., Rigault, F., Moulin, L., Jaffre, T., Fardoux, J., Giraud, E., Dreyfus, B., Bailly, X., 2007. Nickel resistance determinants in *Bradyrhizobium* strains from nodules of the endemic New Caledonia legume *Serianthes calycina*. Applied and Environmental Microbiology 73 : 8018-8022.

Chaney, R.L., Angle, J.S, Broadhurst, C.L., Peters, C.A., Tappero, R.V., Donald, L.S., 2007. Improved understanding of hyperaccumulation yields commercial phytoextraction and phytomining technologies. Journal Environmental Quality. 36 : 1429-1443.

Chaney, R.L., Malik, M., Li, Y.M., Brown, S.L., Brewer, E.P., Angle, J.S., Baker, A.J.M., 1997. Phytoremediation of soil metals. Current Opinion in Biotechnology 8 : 279-284.

Chaudhary, M., Mobbs, H.J., Almås, Å.R., Singh, B.R., 2011a. Assessing long-term changes in cadmium availability from Cd-enriched fertilizers at different pH by isotopic dilution. Nutrient Cycling in Agroecosystems 91 : 109-117.

Chaudhary, P., Dudeja, S.S., Kapoor, K.K., 2004. Effectivity of host-*Rhizobium leguminosarum* symbiosis in soils receiving sewage water containing heavy metals. Microbiological Research 159 : 121-127.

Chaudhary, S.K., Inouhe, M., Rai, U.N., Mishra, K., Gupta, D.K., 2011b. Inoculation of *Rhizobium* (VR-1 and VA-1) induces an increasing growth and metal accumulation potential in *Vigna radiata* and *Vigna angularis* L. growing under fly-ash. Ecological Engineering 37 : 1254-1257.

Chaudri, A.M., Allain, C.M.G., Barbosa-Jefferson, V.L., Nicholson, F.A., Chambers, B.J., McGrath, S.P., 2000. A study of the impacts of Zn and Cu on two rhizobial species in soils of a long-term field experiment. Plant and Soil 221 : 167–179.

Chen, B.D., Zhu, Y.G., Duan, J., Xiao, X.Y., Smith, S.E., 2007. Effects of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on growth and metal uptake by four plant species in copper mine tailings. Environmental Pollution 147 : 374-380.

Chen, W.M., Wu, C.H., James, E.K., Chang, J.S., 2008. Metal biosorption capability of *Cupriavidus taiwanensis* and its effects on heavy metal removal by nodulated *Mimosa pudica*. Journal of Hazardous Materials 151 : 364-371.

Chen, W.P., Kuo, T.T., 1993. A Simple and Rapid Method for the Preparation of Gram-Negative Bacterial Genomic DNA. Nucleic Acids Research 21 : 2260-2260.

Cheng, Q., 2008. Perspectives in biological nitrogen fixation research. Journal of Integrative Plant Biology 50 : 786-798.

Choudhury, R., Srivastava, S., 2001. Zinc resistance mechanisms in bacteria. Current Science 81 : 768-775.

Chovanová, K., Sládeková, D., Kmeť, V., Prokšová, M., Harichová, J., Puškárová, A., Polek, B., Ferianc, P., 2004. Identification and characterization of eight cadmium resistant bacterial isolates from a cadmium-contaminated sewage sludge. Biologia, Bratislava 59 : 817-827.

Christensen, H., Kuhnert, P., Olsen, J.E., Bisgaard, M., 2004. Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atp*D, *inf*B and *rpo*B and the 16S rRNA gene within the *Pasteurellaceae*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54 : 1601-1609.

Cook, S.C.A., Lefèbvre, C., McNeilly, T., 1972. Competition between metal tolerant and normal plant populations on normal soils. Evolution 22 : 366-372.

Cosio, C., Martinoia, E., Keller, C., 2004. Hyperaccumulation of cadmium and zinc in *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri* at the leaf cellular level. Plant Physiology 134 : 716-725.

Coudrec, H., 1980. Biologie florale de quelques espèces du genre *Anthyllis* L. et nottamment de l'*A. montana* L. France : Bulletin of the Botanical Society.

Cullen, W.R., Wheater, C.P., Dunleavy, P.J., 1998. Establishment of species-rich vegetation on reclaimed limestone Quarry faces in Derbyshire, UK. Biological Conservation 84 : 25-33.

Dahmani-Muller, H., van Oort, F., GeÂ lie, B., Balabane, M., 2000. Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. Environmental Pollution 109 : 231-238.

Dary, M., Chamber-Perez, M.A., Palomares, A.J., Pajuelo, E., 2010. "In situ" phytostabilisation of heavy metal polluted soils using Lupinus luteus inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. Journal of Hazardous Materials 177 : 323-330.

De Faria, S., Lewis, G., Sprent, J., Sutherland, J., 1989. Occurrence of nodulation in the *Leguminosae*. New Phytologist 111 : 607-619.

De Ley, J., Cattoir, H., Reynaerts, A., 1970. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. European Journal of Biochemistry 12 : 133-142.

Delorme, T.A., Gagliardi, J.V., Angle, J.S., van Berkum, P., Chaney, R.L., 2003. Phenotypic and Genetic Diversity of Rhizobia Isolated from Nodules of Clover Grown in a Zinc and Cadmium Contaminated Soil. Soil Science Society of America Journal 67 : 1746-1754.

Demange M., 1973. Contribution à l'étude des gisements plombo-zincifères français. Bulletin du Bureau des Ressources Géologiques et Minières (deuxième série) Section II, n°1: 1-30 ESTEM. pp 45.

Díaz-Raviña, M., Bååth, E., Frostegård, A., 1994. Multiple Heavy Metal Tolerance of Soil Bacterial Communities and Its Measurement by a Thymidine Incorporation Technique. Applied and Environmental Microbiology 60 : 2238-2247.

do Nascimento, C.W.A., Xing, B.S., 2006. Phytoextraction: A review on enhanced metal availability and plant accumulation. Scientia Agricola 63 : 299-311.

Dong, J., Wu, F.B., Zhang, G.P., 2005. Effect of cadmium on growth and photosynthesis of tomato seedlings. Journals of Zhejiang University-Science B 6 : 974-980.

Doyle, J.J., Luckow, M.A., 2003. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. Plant Physiology 131 : 900-910.

Dudka, S., Piotrowska, M., Terelak, H., 1996. Transfer of cadmium, lead, and zinc from industrially contaminated soil to crop plants: a field study. Environmental Pollution 94 : 181-188.

Echevarria, G., Sterckeman, T., Morel, J.L., 2012. Phytoextraction des éléments en traces métalliques par les plantes hyperaccumulatrices (As, Cd, Ni, et Zn). Dans Phytotechnologies appliquées aux sites pollués. 7ème Journée technique nationale à Paris. ADEME.

Ehrlich, H.L., 1997. Microbes and metals. Applied Microbiology and Biotechnology 48 : 687-692.

Eisen, J.A., 1995. The *Rec*A Protein as a Model Molecule for Molecular Systematic Studies of Bacteria: Comparison of Trees of RecAs and 16S rRNAs from the Same Species. Journal of Molecular Evolution 41 : 1105-1123.

Elboutahiri, N., Thami-Alami, I., Udupa, S.M., 2010. Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* from drought and salt affected regions of Morocco. BMC Microbiology 10 : 1-15.

Elvira-Recuenco, M., van Vuurde, J.W.L., 2000. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. Canadian Journal of Microbiology 46 : 1036-1041.

Ensley, B.D., 2000. Rational for use of phytoremediation. In: Raskin, I. and Ensley, B.D. (Eds). Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean- up the environment. New York, John Wiley & Sons, Inc. pp 4-5.

Ertl, G., 2012. The Arduous Way to the Haber-Bosch Process. Zeitschrift Fur Anorganische Und Allgemeine Chemie 638 : 487-489.

Escarré, J., Lefèbvre, C., Gruber, W., Leblanc, M., Lepart, J., Riviere, Y., Delay, B., 2000. Zinc and cadmium hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens* from metalliferous and nonmetalliferous sites in the Mediterranean area: implications for phytoremediation. New Phytologist 145 : 429-437.

Escarré, J., Lefèbvre, C., Raboyeau, S., Dossantos, A., Gruber, W., Cleyet Marel, J.C., Frérot, H., Noret, N., Mahieu, S., Collin, C., Oort, F., 2010. Heavy Metal Concentration Survey in Soils and Plants of the Les Malines Mining District (Southern France): Implications for Soil Restoration. Water, Air and Soil Pollution 216 : 485-504.

Ewing, M., Poole, C., Skinner, P., Bennett, A., 2001. Sulla and other forage species for southern Australia. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. pp 190.

Faisal, M., Hasnain, S., 2006. Growth stimulatory effect of *Ochrobactrum intermedium* and *Bacillus cereus* on *Vigna radiata* plants. Letters in Applied Microbiology 43 : 461-466.

Fan, L.M., Ma, Z.Q., Liang, J.Q., Li, H.F., Wang, E.T., Wei, G.H., 2011. Characterization of a copper-resistant symbiotic bacterium isolated from *Medicago lupulina* growing in mine tailings. Bioresource Technology 102 : 703-709.

Fan, X., Pedroli, B., Liu, G., Liu, Q., Liu, H., Shu, L., 2012. Soil salinity development in the yellow river delta in relation to groundwater dynamics. Land Degradation and Development 23 : 175-189.

Ferguson, B.J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.H., Lin, Y.H., Reid, D.E., Gresshoff, P.M., 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. Journal of Integrative Plant Biology 52 : 61-76.

Figueira, E.M., Lima, A.I., Pereira, S.I., 2005. Cadmium tolerance plasticity in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*: glutathione as a detoxifying agent. Canadian Journal of Microbiology 51 : 7-14.

Fitouri, D.S., Ben Jeddi, F., Zribi, K., Rezgui, S., Mhamdi, R., 2012. Effet de l'inoculation par une souche osmotolerante de *Rhizobium sullae* sur la croissance et la production en proteine du sulla (*Sulla coronarium* L.) sous déficit hydrique Journal of Applied Biosciences 51 : 3642- 3651.

Fitouri, S.D., Trabelsi, D., Saïdi, S., Zribi, K., Ben Jeddi, F., Mhamdi, R., 2011. Diversity of rhizobia nodulating sulla (*Hedysarum coronarium* L.) and selection of inoculant strains for semi-arid Tunisia. Annals of Microbiology 62 : 77-84.

Floch, C., Chevremont, A.C., Joanico, K., Capowiez, Y., Criquet, S., 2011. Indicators of pesticide contamination: Soil enzyme compared to functional diversity of bacterial communities via Biolog® Ecoplates. European Journal of Soil Biology 47 : 256-263.

Fonseca, B., Figueiredo, H., Rodrigues, J., Queiroz, A., Tavares, T., 2011. Mobility of Cr, Pb, Cd, Cu and Zn in a loamy sand soil: A comparative study. Geoderma 164 : 232-237.

Forgacs, E., Cserhati, T., Oros, G., 2004. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. Environment International 30 : 953-971.

Frank, B., 1889. Uber die pilzsymbiose der leguminosen. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft 7 : 332-346.

Frérot, H., 2004. Aspects génétiques et écologiques de la tolérance aux métaux lourds et de l'hyperaccumulation chez *Thlaspi caerulescens* (*Brassicaceae*) Perspectives en phytoremédiation. Thèse pour l'obtention de diplôme de doctorat à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier. pp 7, 39-43.

Frérot, H., Faucon, M.P., Willems, G., Gode, C., Courseaux, A., Darracq, A., Verbruggen, N., Saumitou-Laprade, P., 2010. Genetic architecture of zinc hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*: the essential role of QTL x environment interactions. New Phytologist 187 : 355-367.

Frérot, H., Lefèbvre, C., Gruber, W., Collin, C., Santos, A.D., Escarré, J., 2006. Specific Interactions between Local Metallicolous Plants Improve the Phytostabilization of Mine Soils. Plant and Soil 282 : 53-65.

Friedland, AJ., 1990. Movement of metals through soils and ecosystems. In AJ Shaw (Ed.), Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects. CRC Press: Boca Raton, Floride, USA.

Galardi, F., Corrales, I., Mengoni, A., Pucci, S., Barletti, L., Barzanti, R., Arnetoli, M., Gabbrielli, R., Gonnelli, C., 2007. Intra-specific differences in nickel tolerance and accumulation in the Ni-hyperaccumulator *Alyssum bertolonii*. Environmental and Experimental Botany 60 : 377-384.

Galloway, J.N., Aber, J.D., Erisman, J.W., Seitzinger, S.P., Howarth, R.W., Cowling, E.B., Cosby, B.J., 2003. The nitrogen cascade. Bioscience 53 : 341-356.

Gasco, G., Lobo, M.C., 2007. Composition of a Spanish sewage sludge and effects on treated soil and olive trees. Waste Management 27 : 1494-1500.

Gaunt, M.W., Turner, S.L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilps, S.A., Young, J.P.W., 2001. Phylogenies of *atp*D and *rec*A support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. International Journal of Systematic and Evolutionary 51 : 2037-2048.

Giller, K.E., Witter, E., McGrath, S.P., 2009. Heavy metals and soil microbes. Soil Biology and Biochemistry 41 : 2031-2037.

Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J.C., Jaubert, M., Simon, D., Cartieaux, F., Prin, Y., Bena, G., Hannibal, L., Fardoux, J., Kojadinovic, M., Vuillet, L., Lajus, A., Cruveiller, S., Rouy, Z., Mangenot, S., Segurens, B., Dossat, C., Franck, W.L., Chang, W.S., Saunders, E., Bruce, D., Richardson, P., Normand, P., Dreyfus, B., Pignol, D., Stacey, G., Emerich, D., Vermeglio, A., Medigue, C., Sadowsky, M., 2007. Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. Science 316 : 1307-1312.

Gisladottir, G., Stocking, M., 2005. Land degradation control and its global environmental benefits. Land Degradation and Development 16 : 99-112.

Glick, B.R., 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. Biotechnology Advances 21 : 383-393.

Gode, C., Decombeix, I., Kostecka, A., Wasowicz, P., Pauwels, M., Courseaux, A., Saumitou-Laprade, P., 2012. Nuclear microsatellite loci for Arabidopsis halleri (*Brassicaceae*), a model species to study plant adaptation to heavy metals. American Journal of Botany 99 : 49-52.

Gremion, F., Chatzinotas, A., Kaufmann, K., Von Sigler, W., Harms, H., 2004. Impacts of heavy metal contamination and phytoremediation on a microbial community during a twelve-month microcosm experiment. FEMS Microbiology Ecology 48 : 273-283.

Gupta, R.S., 1998. Protein Phylogenies and Signature Sequences: A Reappraisal of Evolutionary Relationships among Archaebacteria, Eubacteria, and Eukaryotes. Microbiology and Molecular Biology Reviews 1435-1491.

Gyaneshwar, P., Hirsch, A.M., Moulin, L., Chen, W.M., Elliott, G.N., Bontemps, C., de los Santos, P.E., Gross, E., dos Reis, F.B.J., Sprent, J.I., Young, J.P.W., James, E.K., 2011. Legume-Nodulating Betaproteobacteria: Diversity, Host Range, and Future Prospects. The American Phytopathological Society 24 : 1276-1288.

Hassinen, V.H., Tervahauta, A.I., Halimaa, P., Plessl, M., Peraniemi, S., Schat, H., Aarts, M.G., Servomaa, K., Karenlampi, S.O., 2007. Isolation of Zn-responsive genes from two accessions of the hyperaccumulator plant *Thlaspi caerulescens*. Planta 225 : 977-989.

Hattab, S., Dridi, B., Chouba, L., Ben Kheder, M., Bousetta, H., 2009. Photosynthesis and growth responses of pea *Pisum sativum* L. under heavy metals stress. Journal of Environmental Sciences 21 : 1552-1556.

Hickey, D., McNeilly, T., 1975. Competition between metal tolerant and normal plant populations: a field experiment. Evolution 29 : 458-464.

Hindt, M.N., Guerinot, M.L., 2012. Getting a sense for signals: regulation of the plant iron deficiency response. Biochimica et Biophysica Acta 1823 : 1521-1530.

Hirsch, A.M., Lum, M.R., Downie, J.A., 2001. What Makes the Rhizobia-Legume Symbiosis So Special? Plant Physiology 127 : 1484-1492.

Hong, S.M., Candelone, J.P., Patterson, C.C., Boutron, C.F., 1996. History of ancient copper smelting pollution during Roman and medieval times recorded in Greenland ice. Science 272 : 246-249.

Hooda, V., 2007. Phytoremediation of toxic metals from soil and waste water. Journal of Environmental Biology 28 : 367-376.

Huss, V.A.R., Festl, H., Schleifer, K.H., 1983. Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. Systematic and Applied Microbiology 4 : 184-192.

Janouskova, M., Vosatka, M., 2005. Response to cadmium of *Daucus carota* hairy roots dual cultures with *Glomus intraradices* or *Gigaspora margarita*. Mycorrhiza 15 : 217-224.

Janssen, P.J., Van Houdt, R., Moors, H., Monsieurs, P., Morin, N., Michaux, A., Benotmane, M.A., Leys, N., Vallaeys, T., Lapidus, A., Monchy, S., Medigue, C., Taghavi, S., McCorkle, S., Dunn, J., van der Lelie, D., Mergeay, M., 2010. The complete genome sequence of Cupriavidus metallidurans strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. PLoS One 5(5) : 1-33, e10433.

Jiries, A.G., Al Nasir, F.M., Beese, F., 2002. Pesticide and heavymetals residue in wastewater, soil and plants in wastewater disposal site near Al-lajoun valley, Karak / Jordan. Water, Air, and Soil Pollution 133 : 97-107.

Jordan, D.C., 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a Genus of Slow-Growing, Root Nodule Bacteria from Leguminous Plants. International Journal of Systematic Bacteriology 136-139.

Jourand, P., Ducousso, M., Reid, R., Majorel, C., Richert, C., Riss, J., Lebrun, M., 2010. Nickel-tolerant ectomycorrhizal *Pisolithus albus* ultramafic ecotype isolated from nickel mines in New Caledonia strongly enhance growth of the host plant *Eucalyptus globulus* at toxic nickel concentrations. Tree Physiology 30 : 1311-1319.

Kawecki, T.J., Ebert, D., 2004. Conceptual issues in local adaptation. Ecology Letters **7** : 1225-1241.

Kazakou, E., Dimitrakopoulos, P.G., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Troumbis, A.Y., 2008. Hypotheses, mechanisms and trade-offs of tolerance and adaptation to serpentine soils: from species to ecosystem level. Biological-Reviews 83 : 495-508.

Kidd, P., Barceló, J., Pilar Bernal, M., Navari-Izzo, F., Poschenrieder, C., Shilev, S., Rafael, C., Monterroso, C., 2009. Trace element behaviour at the root–soil interface: Implications in phytoremediation. Environmental and Experimental Botany **67**(1) : 243-259.

Kishinevsky, B.D., Nandasena, K.G., Yates, R.J., Nemas, C., Howieson, J.G., 2003. Phenotypic and genetic diversity among rhizobia isolated from three *Hedysarum* species: *H. spinosissimum*, *H. coronarium* and *H. flexuosum*. Plant and Soil 215 : 143-153.

Klonowska, A., Chaintreuil, C., Tisseyre, P., Miche, L., Melkonian, R., Ducousso, M., Laguerre, G., Brunel, B., Moulin, L., 2012. Biodiversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts (*Cupriavidus taiwanensis*, *Rhizobium mesoamericanum*) in New Caledonia and their adaptation to heavy metal-rich soils. FEMS Microbiology Ecology 81 : 618-635.

Komarek, M., Vanek, A., Chrastny, V., Szakova, J., Kubova, K., Drahota, P., Balik, J., 2009. Retention of copper originating from different fungicides in contrasting soil types. Journal of Hazardous Materials 166 : 1395-1402.

Köster, E., Bitocchi, E., Papa, R., Pihu, S., 2008. Genetic structure of the *Anthyllis vulneraria* L. s. l. species complex in Estonia based on AFLPs. Central European Journal of Biology 3 : 442-450.

Kuklinsky-Sobral, J., Araujo, W.L., Mendes, R., Geraldi, I.O., Pizzirani-Kleiner, A.A., Azevedo, J.L., 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. Environ Microbiol 6 : 1244-1251.

Lahmar, R., Ruellan, A., 2007. Dégradation des sols et stratégies coopératives en Méditerranée : la pression sur les ressources naturelles et les stratégies de développement durable. Cahiers Agricultures 16(4) : 318-323.

Lasat, M.M., Pence, N.S., Garvin, D.F., Ebbs, S.D., Kochian, L.V., 2000. Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Journal of Experimental Botany 51 : 71-79.

Lefèbvre C., Vernet P., 1990. Microevolutionary processes on contaminated deposits. In: Shaw, A.J. (Ed). Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects. Ed.CRC Press Inc., Boca Raton, FL, pp 286-297.

Leimu, R., Fischer, M., 2008. A Meta-Analysis of Local Adaptation in Plants. PLoS One 3.

Lewis, G.P., 2005. *Caesalpinieae*. In : Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B., and Lock, M. (Eds). Legumes of the world. Royal Botanic Gardens, Kew, Surrey, UK. pp 127.

Lewis, G.P., Schrire, B., Mackinder, B., Lock, M., 2005. Legumes of the world. Royal Botanic Gardens, Kew, Surrey, UK. pp 577.

Leyval, C., Singh, B.R., Joner, E.J., 1995. Occurrence and infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in some norwegian soils influenced by heavy metals and soil properties. Water, Air and Soil Pollution 84 : 203-216.

Li, W.H., Tanimura, M., Sharp, P.M., 1987. An Evaluation of the Molecular Clock Hypothesis Using Mammalian DNA Sequences. Journal of Molecular Evolution 25 : 330-342.

Li, Z., Ma, Z., Hao, X., Wei, G., 2012. Draft genome sequence of *Sinorhizobium meliloti* CCNWSX0020, a nitrogen-fixing symbiont with copper tolerance capability isolated from lead-zinc mine tailings. Journal of Bacteriology 194 : 1267-1268.

Lindberg, S., Greger, M., 2002. Plant genotypic differences under metal deficient and enriched conditions. In : Prasad, M.N.V and Strzalka, K. (Eds). Physiology and Biochemistry of metal toxicity and tolerance in plant. Ed Netherlands. pp 357-393.

Lindstrom, K., Murwira, M., Willems, A., Altier, N., 2010. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. Journal of Microbiology Research 161 : 453-463.

Linhart, Y.B., 1993. Restoration, Revegetation, and the Importance of Genetic and Evolutionary Perspectives. In : Roundy, B.A., McArthur, E.D., Haley, J.S. and Mann, D.K. (Eds). Proceedings: wildland shrub and arid land restoration symposium. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Intermountain Research Station. Las Vegas, NV. pp 271-287.

Long, S.R., 1996. Rhizobium Symbiosis: Nod Factors in Perspective. Plant Cell 8 : 1885-1898.

Long, S.R., 2001. Genes and Signals in the Rhizobium-Legume Symbiosis. Plant Physiology 125 : 69-72.

Lopez-Lopez, A., Rogel, M.A., Ormeno-Orrillo, E., Martinez-Romero, J., Martinez-Romero, E., 2010. *Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. Systematic and Applied Microbiology 33 : 322-327.

Ma, J.F., Ueno, D., Zhao, F.J., McGrath, S.P., 2005. Subcellular localisation of Cd and Zn in the leaves of a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*. Planta 220 : 731-736.

Macdonald, C.A., Clark, I.M., Zhao, F.J., Hirsch, P.R., Singh, B.K., McGrath, S.P., 2011. Long-term impacts of zinc and copper enriched sewage sludge additions on bacterial, archaeal and fungal communities in arable and grassland soils. Soil Biology and Biochemistry 43 : 932-941.

Macnair, M.R., Tilstone, G.H., Smith, S.E., 2000. The genetics of metal tolerance and accumulation in higher plants. In : Terry, A. C. and Bañuelos, N. (Eds). Phytoremediation of contaminated soil and water. Lewis Publishers, Boca Raton. pp 235-250.

Mahdhi, M., Fterich, A., Rejili, M., Rodriguez-Llorente, I.D., Mars, M., 2011. Legume-nodulating bacteria (LNB) from three pasture legumes (*Vicia sativa*, *Trigonella maritima* and *Hedysarum spinosissimum*) in Tunisia. Annals of Microbiology 62 : 61-68.

Mahieu, S., Frérot, H., Vidal, C., Galiana, A., Heulin, K., Maure, L., Brunel, B., Lefèbvre, C., Escarré, J., Cleyet-Marel, J.C., 2011. *Anthyllis vulneraria/Mesorhizobium metallidurans*, an efficient symbiotic nitrogen fixing association able to grow in mine tailings highly contaminated by Zn, Pb and Cd. Plant and Soil 342 : 405-417.

Mahieu, S., Soussou, S., Cleyet-Marel, J.C., Brunel, B., Mauré, L., Lefèbvre, C., Escarré, J., 2012. Local adaptation of metallicolous and non-metallicolous *Anthyllis vulneraria* populations: their utilization in soil restoration. Restoration Ecology in press. DOI: 10.1111/j.1526-100X.2012.00927.x

Mamaril, J.C., Paner, E.T., Alpante, B.M., 1997. Biosorption and desorption studies of chromium (III) by free and immobilized *Rhizobium* (BJVr 12) cell biomass. Biodegradation 8 : 275-285.

Marschner A., 2008. Mineral nutrition of higher plants. 2ème Edition. Ed Academic press, Britain. pp 362.

Martens, M., Dawyndt, P., Coopman, R., Gillis, M., De Vos, P., Willems, A., 2008. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58 : 200-214.

Martin, S., Griswold, W., 2009. Human Health Effects of Heavy Metals. Environmental Science and Technology Briefs for Citizens 15 : 1-6.

Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., Batut, J., 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? Trends Microbiol 17 : 458-466.

Maynaud, G., Brunel, B., Yashiro, E., Mergeay, M., Cleyet-Marel, J.C., Le-Quéré, A., CadA1 is a novel P IB -type ATPase involved in cadmium and zinc resistance in *Mesorhizobium metallidurans* isolated from a mining soil. In preparation.

Maynaud, G., Willems, A., Soussou, S., Vidal, C., Maure, L., Moulin, L., Cleyet-Marel, J.C., Brunel, B., 2012. Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria. Systematic and Applied Microbiology 35 : 65-72.

McBride, M.B., Cherney, J., 2004. Molybdenum, Sulfur, and Other Trace Elements in Farm Soils and Forages After Sewage Sludge Application. Communications in Soil Science and Plant Analysis 35 : 517-535.

Mcgrath, S.P., Brookes, P.C., Giller, K.E., 1988. Effects of Potentially Toxic Metals in Soil Derived from Past Applications of Sewage-Sludge on Nitrogen-Fixation by *Trifolium-Repens* L. Soil Biology and Biochemistry 20 : 415-424.

McGrath, S.P., Zhao, F.J., 2003. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. Current Opinion in Biotechnology 14 : 277-282.

McKay, J.K., Christian, C.E., Harrison, S., Rice, K.J., 2005. ‘‘How Local Is Local?’’—A Review of Practical and Conceptual Issues in the Genetics of Restoration. Restoration Ecology 13 : 432-440.

Mergeay, M.L., Nies, D., Schlegel, H.G., Gerits, J., Charles, P., Van Gijsegem, F., 1985. *Alcaligenes eutrophus* CH34 Is a Facultative Chemolithotroph with Plasmid-Bound Resistance to Heavy Metals. Journal of Bacteriology 328-334.

Mezned, N., Abdeljaouad, S., Boussema, M.R., 2008. Caractérisation des rejets miniers dans le bassin versant de la Medjerda en utilisant les données aster. Revue Télédétection 8 : 83-92.

Miche, L., Moulin, L., Chaintreuil, C., Contreras-Jimenez, J.L., Munive-Hernandez, J.A., Del Carmen Villegas-Hernandez, M., Crozier, F., Bena, G., 2010. Diversity analyses of *Aeschynomene* symbionts in Tropical Africa and Central America reveal that nod-independent stem nodulation is not restricted to photosynthetic bradyrhizobia. Environmental Microbiology 12 : 2152-2164.

Milner, M.J., Kochian, L.V., 2008. Investigating heavy-metal hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a model system. Annals of Botany 102 : 3-13.

Monnet, F., Vaillanta, N., Hitmia, A., Coudreta, A., Sallanonb, H., 2001. Endophytic *Neotyphodium lolii* induced tolerance to Zn stress in *Lolium perenne*. Physiologia Plantarum 113 : 557-563.

Mottareale, G., 1898. Di alcuni organi particolari delle radici tubercolifere dello *Hedysarum coronarium* in relazione al *Bacillus radicicola* e alla *Phytomyxa leguminosarum*. Atti R Ist Incoragg Napoli 11 : 1-7.

Muresu, R., Polone, E., Sulas, L., Baldan, B., Tondello, A., Delogu, G., Cappuccinelli, P., Alberghini, S., Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Mori, B., Calamassi, R., Dazzo, F.B., Squartini, A., 2008. Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. FEMS Microbiology Ecology 63 : 383-400.

Nanni, L., Ferradini, N., Taffetani, F., Papa, R., 2004. Molecular phylogeny of *Anthyllis* spp. Plant Biology 6 : 454-464.

Nicholas, K.B., Nicholas, H.B.Jr., 1997. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. http://www.psc.edu/biomed/genedoc. Pittsburgh, PA: Pittsburgh Supercomputing Center.

Nies, D., 1999. Microbial heavy-metal resistance. Applied Microbiology and Biotechnology 51 : 730-750.

Nies, D.H., 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. FEMS Microbiology Reviews 27 : 313-339.

Nonnoi, F., Chinnaswamy, A., García de la Torre, V.S., Coba de la Peña, T., Lucas, M.M., Pueyo, J.J., 2012. Metal tolerance of rhizobial strains isolated from nodules of

herbaceous legumes (*Medicago* spp. and *Trifolium* spp.) growing in mercury-contaminated soils. Applied Soil Ecology 61 : 49-59.

Oldroyd, G.E., Murray, J.D., Poole, P.S., Downie, J.A., 2011. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. Annual Review of Genetics 45 : 119-144.

Olsen, G.J., Woese, C.R., 1993. Ribosornal RNA: a key to phylogeny. FASEB 113-123.

Olsen, G.J., Woese, C.R., Overbeek, R., 1994. The Winds of (Evolutionary) Change: Breathing New Life into Microbiology. Journal of Bacteriology 1-6.

Outten, F.W., Outten, C.E., O'Halloran, T., 2000. Metalloregulatory systems at the interface between bacterial metal homeostasis and resistance. In: Storz, G. and Hengge Aronis, R. (Eds). Bacterial stress responses. ASM Press, Washington, DC, pp 29-42.

Pallen, M.J., 1999. Microbial genomes. Molecular Microbiology 32 : 907-912.

Papoyan, A., Pineros, M., Kochian, L.V., 2007. Plant Cd^{2+} and Zn^{2+} status effects on root and shoot heavy metal accumulation in *Thlaspi caerulescens*. New Phytologist 175 : 51-58.

Pence, N.S., Larsen, P.B., Ebbs, S.D., Letham, D.L.D., Lasat, M.M., Garvin, D.F., Eide, D., Kochian, L.V., 2000. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. PNAS 97 : 4956-4960.

Peris, M., Mico, C., Recatala, L., Sanchez, R., Sanchez, J., 2007. Heavy metal contents in horticultural crops of a representative area of the European Mediterranean region. Science of the Total Environment 378 : 42-48.

Perret, X., Staehelin, C., Broughton, W.J., 2000. Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. Microbiology and Molecular Biology Reviews 180-201.

Persello-Cartieaux, F., Nussaume, L., Robaglia, C., 2003. Tales from the underground: molecular plant–rhizobacteria interactions. Plant, Cell and Environment 26 : 189-199.

Peters, N.K., Verma, D.P.S., 1990. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. Molecular Plant-Microbe Interactions 3 : 4-8.

Prasad, M.N.V., 2004. Heavy metal stress in Plants from bio molecules to ecosystems. 2ème Edition. Ed. Springer-Verlag Berlin. pp 17-20.

Qu, C.S., Ma, Z.W., Yang, J., Liu, Y., Bi, J., Huang, L., 2012. Human exposure pathways of heavy metals in a lead-zinc mining area, Jiangsu Province, China. PLOS One 7(11) :1-11.

Raikwar, M.K., Kumar, P., Singh, M., Singh, A., 2008. Toxic effect of heavy metals in livestock health. Veterinary World 1 : 28-30.

Rascio, N., Navari-Izzo, F., 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? Plant Science 180 : 169-181.

Rashed, M.N., 2010. Monitoring of contaminated toxic and heavy metals, from mine tailings through age accumulation, in soil and some wild plants at Southeast Egypt. Journal of Hazardous Materials 178 : 739-746.

Raskin, I., Kumar, N.P.B.A., Dushenkov, S., Salt, D.E., 1994. Bioconcentration of heavy metal by plant. Current Opinion in Biotechnology 5 : 285-290.

Reeves, R.D., Baker, A.J.M., 2000. Metal-Accumulating plants. In : Raskin, I. and Ensley, B.D. (Eds). Phytoremediation of Toxic Metals-Using plants to Clean Up the Environment. John Wiley & Sons, Inc ed, New-York, pp 195.

Rejili, M., Mahdhi, M., Fterich, A., Dhaoui, S., Guefrachi, I., Abdeddayem, R., Mars, M., 2012. Symbiotic nitrogen fixation of wild legumes in Tunisia: Soil fertility dynamics, field nodulation and nodules effectiveness. Agriculture, Ecosystems and Environment 157 : 60-69.

Roane, T.M., Josephson, K.L., Pepper, I.L., 2001. Dual-bioaugmentation strategy to enhance remediation of cocontaminated soil. Applied and Environmental Microbiology 67 : 3208-3215.

Robinson N.J., 1990. Metal tolerance in plants. In : Shaw, A.J. (Ed). Evolutionary Aspects-Metal binding polypeptides in plants. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp 196-197.

Robinson, B.H., Bañuelos, G., Conesa, H.M., Evangelou, M.W.H., Schulin, R., 2009. The Phytomanagement of Trace Elements in Soil. Critical Reviews in Plant Sciences 28 : 240-266.

Robinson, B.H., Leblanc, M., Petit, D., Brooks, R.R., Kirkman, J.H., Gregg, P.E.H., 1998. The potential of *Thlaspi caerulescens* for phytoremediation of contaminated soils. Plant and Soil 203 : 47-56.

Robson, A.D., Bottomley, P.J., 1991. Limitations in the use of legumes in agriculture and forestry, In*:* Dilworth, M.J. and Glenn, A.R. (Eds). Biology and biochemistry of nitrogen fixation. Elsevier Publishers, Amsterdam, The Netherlands. pp 320-349.

Roldan, A., Albadalejo, J., Thornes, J.B., 1996. Aggregate stability changes in a semiarid soil after treatments with different organic amendments. Arid Soil Research and Rehabilitation 10 : 139-148.

Ross, S.M., 1994. Sources and Forms of Potentially Toxic Metals in Soil-Plant Systems. In : Ross, S.M. (Ed). Toxic Metals in Soil-Plant Systems. John Wiley & Sons ed. pp 12.

Ross, S.M., Kaye, K., 1994. The Meaning of Metal Toxicity in Soil-Plant Systems. In : Ross, S.M. (Ed). Toxic Metals in Soil-Plant Systems. John Wiley & Sons ed, New-York. pp 27-35.

Rother, J.A., Millbank, J.W., Thornton, I., 1982. Seasonal fluctuations in nitrogen fixation (acetylene reduction) by free-living bacteria in soils contaminated with cadmium, lead and zinc. European Journal of Soil Science 33 : 101-113.

Ruiz-Diez, B., Quinones, M.A., Fajardo, S., Lopez, M.A., Higueras, P., Fernandez-Pascual, M., 2012. Mercury-resistant rhizobial bacteria isolated from nodules of leguminous plants growing in high Hg-contaminated soils. Applied Microbiology and Biotechnology 96 : 543-554.

Safronova, V.I., Piluzza, G., Belimov, A.A., Bullitta, S., 2004. Phenotypic and genotypic analysis of rhizobia isolated from pasture legumes native of Sardinia and Asinara Island. Antonie van Leeuwenhoek 85 : 115-127.

Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, N.P.B.A., Dushenkov, V., Ensley, B.D., Chet, I., Raskin, I., 1995. Phytoremediation - a Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants. Bio-Technology 13 : 468-474.

Salvati, L., Zitti, M., 2009. Assessing the impact of ecological and economic factors on land degradation vulnerability through multiway analysis. Ecological Indicators 9 : 357-363.

Sánchez-Martín, M.J., García-Delgado, M., Lorenzo, L.F., Rodríguez-Cruz, M.S., Arienzo, M., 2007. Heavy metals in sewage sludge amended soils determined by sequential extractions as a function of incubation time of soils. Geoderma 142 : 262-273.

Sarret, G., Willems, G., Isaure, M.P., Marcus, M.A., Fakra, S.C., Frerot, H., Pairis, S., Geoffroy, N., Manceau, A., Saumitou-Laprade, P., 2009. Zinc distribution and speciation in *Arabidopsis halleri* x *Arabidopsis lyrata* progenies presenting various zinc accumulation capacities. New Phytologist 184 : 581-595.

SAS. 2004. SAS-STAT® 9.1 user's guide. Pages 1731-1846 *In*. SAS Institute Inc, Cary, NC.

Scherr, S.J., Yadav, S., 1997. Dégradation des sols dans le monde en développement : questions et options décisionnelles pour 2020. Vision 2020 pour l'Alimentation, l'Agriculture et l'Environnement.

Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Applied and Environmental Microbiology 75 : 7537-7541.

Schumpp, O., Deakin, W.J., 2010. How inefficient rhizobia prolong their existence within nodules. Trends Plant Science 15 : 189-195.

Seneviratne, G., Jayasinghearachchi, H.S., 2003. Phenolic acids: Possible agents of modifying N2-fixing symbiosis through rhizobial alteration? Plant and Soil 252 : 385-395.

Sharma, P., Dubey, R.S., 2005. Lead toxicity in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology 17 : 35-52.

Shaw, A.J., 1990. Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida. Ed.

Shen, Z.G., Zhao, F.J., McGrath, S.P., 1997. Uptake and transport of zinc in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and the non-hyperaccumulator *Thlaspi ochroleucum*. Plant Cell and Environment 20 : 898-906.

Silver, S., Phung, T., 2005. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 32 : 587-605.

Singh, R.P., Agrawal, M., 2007. Effects of sewage sludge amendment on heavy metal accumulation and consequent responses of Beta vulgaris plants. Chemosphere 67 : 2229-2240.

Slim, S., Ben Jeddi, F., 2011. Protection des sols des zones montagneuses de Tunisie par le sulla du Nord (*Hedysarum coronarium* L.). Secheresse 22.

Slim, S., Ben Jeddi, F., Marouani, A., Bouajila, K., 2012. Caractéristiques herbagères de la culture du Sulla (*Hedysarum coronarium* L.) en régions montagneuses du Nord de la Tunisie. Journal of Animal and Plant Sciences 13 : 1831-1847.

Spain, A., 2003. Implications of Microbial Heavy Metal Tolerance in the Environment. Reviews in Undergraduate Research 2 : 1-6.

Squartini, A., Struffi, P., Doring, H., Selenska-Pobell, S., Tola, E., Giacomini, A., Vendramin, E., Velazquez, E., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E., Dazzo, F.B., Casella, S., Nuti, M.P., 2002. *Rhizobium sullae* sp. nov. (formerly *'Rhizobium hedysari'*), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52 : 1267-1276.

Stepkowski, T., Zak, M., Moulin, L., Kroliczak, J., Golinska, B., Narozna, D., Safronova, V.I., Madrzak, C.J., 2011. *Bradyrhizobium canariense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the two dominant rhizobium species in root nodules of lupin and serradella plants growing in Europe. Systematic and Applied Microbiology 34 : 368-375.

Stougaard, J., 2000. Regulators and Regulation of Legume Root Nodule Development. Plant Physiology 124 : 531–540.

Sturz, A.V., Christie, B.R., Matheson, B.G., Nowak, J., 1997. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. Biology and Fertility of Soils 25 : 13-19.

Sullivan, J.T., Trzebiatowski, J.R., Cruickshank, R.W., Gouzy, J., Brown, S.D., Elliot, R.M., Fleetwood, D.J., McCallum, N.G., Rossbach, U., Stuart, G.S., Weaver, J.E., Webby, R.J., de Bruijn, F.J., Ronson, C.W., 2002. Comparative Sequence Analysis of the Symbiosis Island of *Mesorhizobium loti* Strain R7A. Journal of Bacteriology 184 : 3086-3095.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28 : 2731-2739.

Tang, Y.T., Deng, T.H.B., Wu, Q.H., Qiu, R.L., Wei, Z.B., Guo, X.F., Wu, Q.T., Lei, M., Chen, T.B., Echevarria, G., Sterckeman, T., Simonnot, M.O., Morel, J.L., 2012. Designing cropping systems adapted to metal contaminated sites: a review. Pedosphere 22 : 470-488.

Taylor, S.I., Levy, F., 2002. Responses to soils and a test for preadaptation to serpentine in *Phacelia dubia* (Hydrophyllaceae). New Phytologist 155 : 437-447.

Thompson, D.J., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 25 : 4876-4882.

Tlustoš, P., Száková, J., Kořínek, K., D., P., Hanč, A., Balík, J., 2006. The effect of liming on cadmium, lead, and zinc uptake reduction by spring wheat grown in contaminated soil. Plant, Soil and Environment 52 : 16-24.

Tolrà, R.P., Poschenrieder, C., Barceló, J., 1996. Zinc hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. I. Influence on growth and mineral nutrition. Journal of Plant Nutrition19 : 1531-1540.

Trabelsi, D., Mengoni, A., Aouani, M.E., Bazzicalupo, M., Mhamdi, R., 2010. Genetic diversity and salt tolerance of *Sinorhizobium populations* from two Tunisian soils. Annals of Microbiology 60 : 541-547.

Tu, C., He, T., Liu, C., Lu, X., Lang, Y., 2011. Accumulation of trace elements in agricultural topsoil under different geological background. Plant and Soil 349 : 241-251.

Turner, S.L., Young, P.J.W., 2000. The Glutamine Synthetases of Rhizobia: Phylogenetics and Evolutionary Implications. Molecular Biology and Evolution17 : 309-319.

Van der Ent, A., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Pollard, A.J., Schat, H., 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. Plant and Soil 362 : 319-334.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J., 1996. Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. Microbiological Reviews 407-438.

Vara Prasad, M.N., Freitas, H.M.O., 2003. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. Electronic Journal of Biotechnology 6 : 285-321.

Vazquez, M., Davalos, A., De Las Penas, A., Sánchez, F., Quinto, C., 1991. Novel organization of the common nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains. Journal of Bacteriology 173 : 1250-1258.

Ventura, M., Canchaya, C., van Sinderen, D., Fitzgerald, G.F., Zink, R., 2004. *Bifidobacterium lactis* DSM 10140: Identification of the atp (atpBEFHAGDC) Operon and Analysis of Its Genetic Structure, Characteristics, and Phylogeny. Applied and Environmental Microbiology 70 : 3110-3121.

Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H., 2009. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. New Phytologist 181 : 759-776.

Verma, P., George, K.V., Singh, H.V., Singh, S.K., Juwarkar, A., Singh, R.N., 2006. Modeling rhizofiltration: heavy-metal uptake by plant roots. Environmental Modeling and Assessment 11 : 387-394.

Vidal, C., Chantreuil, C., Berge, O., Maure, L., Escarre, J., Bena, G., Brunel, B., Cleyet-Marel, J.C., 2009. *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metallicolous soil in Languedoc, France. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59 : 850-855.

Vincent, J.M., 1970. A manual for practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Vitousek, P.M., Field, C.B., 1999. Ecosystem constraints to symbiotic nitrogen fixers: a simple model and its implications. Biogeochemistry 46 : 179-202.

Wais, R.J., Keating, D.H., Long, S.R., 2002. Structure-function analysis of nod factor-induced root hair calcium spiking in Rhizobium-legume symbiosis. Plant Physiology 129 : 211-224.

Walley, K.A., Khan, M.S.I., Bradshaw, A.D., 1974. Potential for evolution of heavy-metal tolerance in plants .1. Copper and Zinc tolerance in Agrostis-tenuis. Heredity 32 : 309-319.

Wang, D., Yang, S., Tang, F., Zhu, H., 2012a. Symbiosis specificity in the legume: rhizobial mutualism. Cellular Microbiology 14 : 334-342.

Wang, G., Jiang, H., Xu, Z., Wang, L., Yue, W., 2012b. Evaluating the effect of land use changes on soil erosion and sediment yield using a grid-based distributed modelling approach. Hydrological Processes 26 : 3579-3592.

Wang, K., Zhang, J., Zhu, Z., Huang, H., Li, T., He, Z., Yang, X., Alva, A., 2012c. Pig manure vermicompost (PMVC) can improve phytoremediation of Cd and PAHs co-contaminated soil by *Sedum alfredii*. Journal of Soils and Sediments 12 : 1089-1099.

Wani, P.A., Khan, M.S., Zaidi, A., 2008. Effect of metal-tolerant plant growth-promoting Rhizobium on the performance of pea grown in metal-amended soil. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 55 : 33-42.

Waterman, T.H., 1999. The Evolutionary Challenges of Extreme Environments (Part 1). Journal of Extpher Wiamteenrtmaaln Zoology (Mol Dev Evol) 285 : 326-359.

Wawrik, B., Kerkhof, L., Zylstra, G.J., Kukor, J.J., 2005. Identification of unique type II polyketide synthase genes in soil. Applied and Environmental Microbiology 71 : 2232-2238.

Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P., Trüper, H.G., 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. International Journal of Systematic Bacteriology 37 : 463-464.

Wei, G., Fan, L., Zhu, W., Fu, Y., Yu, J., Tang, M., 2009. Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWRS33-2 isolated from root nodule of *Lespedeza cuneata* in gold mine tailings in China. Journal of Hazardous Materials 162 : 50-56.

Wenzel, W.W., Bunkowski, M., Puschenreiter, M., Horak, O., 2003. Rhizosphere characteristics of indigenously growing nickel hyperaccumulator and excluderplants on serpentine soil. Environmental Pollution 123 : 131-138.

White, J.F.Jr., Torres, M.S., 2010. Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection? Plant Physiology 138 : 440-446.

Winding, A., Hund-Rinke, K., Rutgers, M., 2005. The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts. Ecotoxicology and Environmental Safety 62 : 230-248.

Wojciechowski, M.F., Lavin, M., Sanderson, M.J., 2004. A phylogeny of legumes (*Leguminosae*) based on analysis of the plastid matk gene resolves many well-supported subclades within the family. American Journal of Botany 91 : 1846-1862.

Wong, M.H., 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. Chemosphere 50 : 775-780.

Wu, L., 1990. Colonization and establishment of plants in contaminated sites. In : Shaw, A.J. (Ed). Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. pp 269-284.

Wu, L., Bradshaw, A.D., Thurman, D.A., 1975. Potential for evolution of heavy-metal tolerance in plants .3. Rapid evolution of Copper tolerance in Agrostis stolonifera. Heredity 34 : 165-178.

Wu, L., Cheng, M., Li, Z., Ren, J., Shen, L., Wang, S., Luo, Y., Christie, P., 2012. Major nutrients, heavy metals and PBDEs in soils after long-term sewage sludge application. Journal of Soils and Sediments 12 : 531-541.

Wuana, R.A., Okieimen, F.E., 2011. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. ISRN Ecology 1-20.

Yang, X., Li, T., Yang, J., He, Z., Lu, L., Meng, F., 2006. Zinc compartmentation in root, transport into xylem, and absorption into leaf cells in the hyperaccumulating species of *Sedum alfredii* Hance. Planta 224 : 185-195.

Young, J.E.W., 1996. Phylogeny and taxonomy of rhizobia. Plant and Soil 186 : 45-52.

Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martinez-Romero, E., Kerr, A., Sawada, H., 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium Conn* 1942 and Allorhizobium undicola de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*,

R. undicola and *R. vitis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51 : 89-103.

Zaets, I., Kramarev, S., Kozyrovska, N., 2010. Inoculation with a bacterial consortium alleviates the effect of cadmium overdose in soybean plants. Central European Journal of Biology 5 : 481-490.

Zahran, H.H., 1999. Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. Microbiology and Molecular Biology Reviews 63 : 968-989.

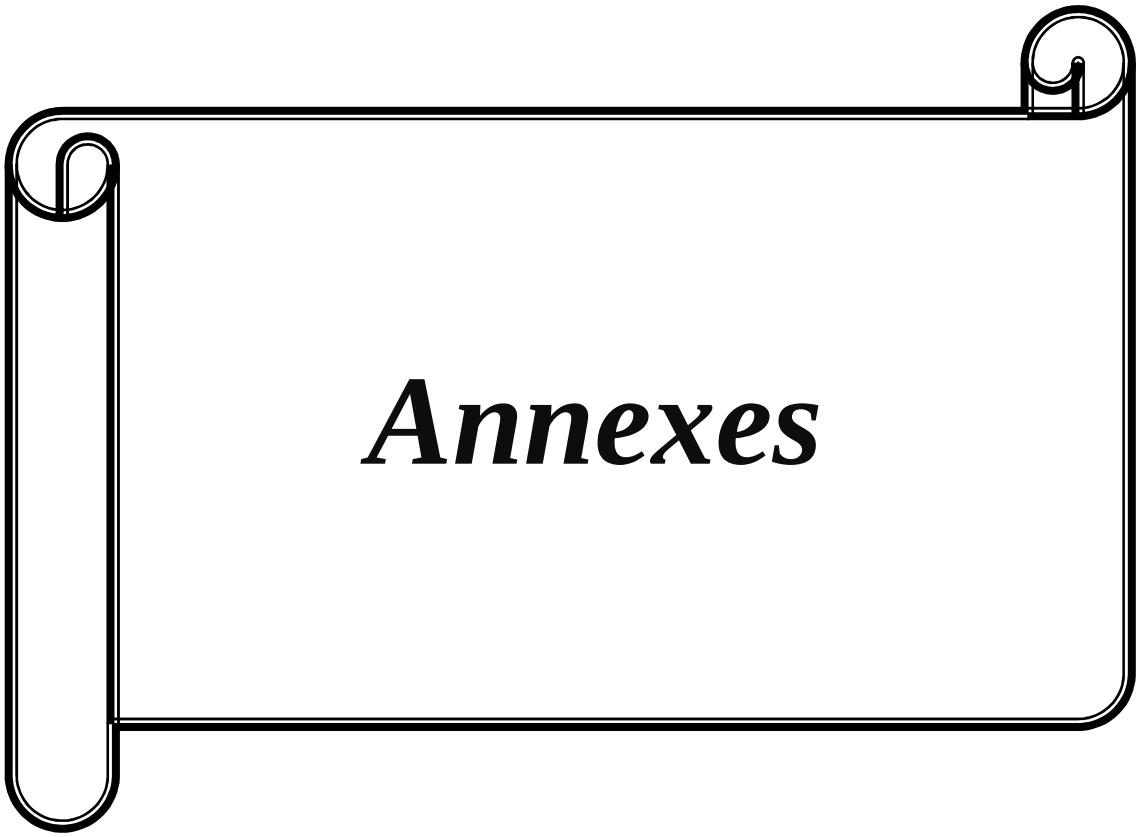
Zakhia, F., de Lajudie, P., 2006. Modern bacterial taxonomy: techniques review-application to bacteria that nodulate leguminous plants (BNL). Canadian Journal of Microbiology 52 : 169-181.

Zhang, J.H., Min, H., 2009. Characterization of a multimetal resistant *Burkholderia fungorum* isolated from an e-waste recycling area for its potential in Cd sequestration. World Journal of Microbiology and Biotechnology 26 : 371-374.

Zhang, J.J., Wang, L.B., Li, C.L., 2010. Humus characteristics after maize residues degradation in soil amended with different copper concentrations. Plant, Soil and Environment. 56 : 120-124.

Zhang, L., Wang, L., Yin, K., Lv, Y., Zhang, D., 2009. Environmental-geochemical characteristics of Cu in the soil and water in copper-rich deposit area of southeastern Hubei Province, along the middle Yangtze River, Central China. Environmental Pollution 157 : 2957-2963.

Zhao, F.J., Lombi, E., Breedon, T., McGrath, S.P., 2000. Zinc hyperaccumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*. Plant Cell and Environment 23 : 507-514.


Annexes

Annexes

Annexe 1 : Tolérance de la luzerne *Medicago orbicularis* à la contamination métallique et influence des bactéries symbiotiques isolées de l'ancien site minier de Fej El Hdoum.

Annexe 2 : Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria.

Annexe 3 : Local Adaptation of Metallicolous and Non-Metallicolous *Anthyllis vulneraria* Populations: Their Utilization in Soil Restoration**.**

Annexe 4 : Composition du milieu Yeast Extract Mannitol (YEM).

Annexe 1

Tolérance de la luzerne *Medicago orbicularis* à la contamination métallique et influence des bactéries symbiotiques isolées de l'ancien site minier de Fej El Hdoum

Tolérance de la luzerne *Medicago orbicularis* à la contamination métallique et influence des bactéries symbiotiques isolées de l'ancien site minier de Fej El Hdoum

Soussou S. [1, 2, 3]*, **Banni M.** [3], **Serra-Wittling C.** [1], **Brunel B.** [2], **Mauré L.** [1], **Boussetta H.** [3], **Cleyet-Marel J.C** [1]

[1] INRA, Montpellier SupAgro, IRD, CIRAD, UM2, UMR113, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, TA A-82/J, 34398 Montpellier cedex 5, France.
[2] Montpellier SupAgro, UMR113, F-34398 Montpellier cedex 5, France
[3] Laboratoire de Biochimie et de Toxicologie environnementale, Institut Supérieur Agronomique de Chott-Mariem, 4042 Chott-Mariem, Sousse, Tunisie.

RÉSUMÉ

Le travail présenté a pour objectif d'étudier la tolérance à de fortes teneurs en métaux dans le substrat de culture d'une luzerne annuelle, *Medicago orbicularis*, présente spontanément sur l'ancien site minier de Fej El Hdoum au nord Ouest de la Tunisie et de tester l'effet de bactéries symbiotiques fixatrices d'azote isolées des nodosités de cette luzerne. *M. orbicularis* ont été cultivée pendant 8 semaines sur trois types de substrats caractérisés par des concentrations variées en zinc, plomb et cadmium. *M. orbicularis* a été cultivée, soit en présence de 3 mM de KNO_3, soit en présence de souches bactériennes. Les résultats obtenus indiquent que *M. orbicularis* est affectée par la présence de métaux mais que la présence des bactéries symbiotiques améliore sensiblement le développement végétatif ainsi que la teneur en chlorophylle de cet écotype de luzerne en milieu contaminé.

Mots clés : *M. orbicularis, bactéries symbiotiques, zinc, plomb, tolérance aux métaux.*

ABSTRACT

The work aims to study the tolerance to heavy metal content in the cultivation substrate of annual alfalfa, *Medicago orbicularis*, spontaneously present on the abandoned mine site of Fej El Hdoum in North West of Tunisia and to test the effect of symbiotic nitrogen-fixing bacteria isolated from nodules of alfalfa. *M. orbicularis* were grown for 8 weeks on three types of substrates characterized by various concentrations of zinc, lead and cadmium. *M. orbicularis* was grown either in the presence of 3 mM KNO_3 or in the presence of bacterial strains. The results indicate that *M. orbicularis* is affected by the presence of metals but the presence of symbiotic bacteria substantially improves the vegetative development and chlorophyll content of this alfalfa ecotype contaminated environment.

Keywords: *M. orbicularis, symbiotic bacteria, zinc, lead, cadmium, metal tolerance.*

Introduction

L'extraction des métaux est l'une des plus importantes activités industrielles pour tous les pays industrialisés ou en développement. Au cours du siècle passé, une grande partie de l'exploitation du cuivre, du plomb et du zinc, nécessaires au développement économique et industriel a été particulièrement intense (Rashed, 2010). Ces activités industrielles ont généré d'importantes quantité de déchets fortement charges en métaux et donc potentiellement dangereux pour l'environnement. La plupart des résidus issus de l'exploitation des filons miniers ou de l'extraction des métaux ont été laissés à l'air libre, sans aucune gestion et la migration de métaux lourds sous l'effet de l'érosion éolienne ou hydrique contribue à la contamination des sols, la pollution des eaux de surface ou souterraines, génère une importante diminution de la diversité biologique et modifie profondément le paysage (Dary et *al.*, 2010; Rashed, 2010).

* Correspondance : **Soussou S,** Laboratoire de Biochimie et de Toxicologie environnementale, Institut Supérieur Agronomique de Chott-Mariem, 4042 Chott-Mariem, Sousse, Tunisie.

Diverses stratégies sont adoptées pour réduire la toxicité des métaux dans le sol et/ou l'eau (Vara Prasad and Freitas, 2003) mais la phytostabilisation est une technologie efficace et peu couteuse qui implique l'utilisation de plantes et de microorganismes tolérants à des métaux pour couvrir les sols pollués, réduire l'érosion et la dispersion des particules métalliques dans l'environnement (Escarré et *al.*, 2010 ; Salt et *al.*, 1998).

Les plantes de la famille des Légumineuses, du fait de leur capacité à s'associer avec des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote du sol (rhizobia) peuvent croître sur des substrats pauvres en matière organique et en azote minéral et leur présence sur des sols fortement pollués est de nature à faciliter l'installation ultérieure et la croissance d'autres espèces végétales (Vitousek and Field 1999; Frérot et *al.*, 2006). Actuellement, encore peu de légumineuses capables de se développer en présence de fortes teneurs en métaux dans le sol ont été identifiées (Rother et *al.*, 1983; Frérot et *al.*, 2006; Mahieu et *al.*, 2011). Des études ont été réalisées sur la luzerne afin d'étudier sa réponse au stress métallique avec notamment l'expression de transporteurs (Lopez-Millan et *al.*, 2004). Cependant, nous ne disposons pas de données précises sur les mécanismes d'adaptation de cette plante aux métaux ainsi que le rôle de la symbiose sur le niveau de tolérance de la luzerne aux métaux.

Dans le bassin méditerranéen, il existe de nombreux anciens sites miniers dont l'exploitation est arrêtée depuis plusieurs dizaines d'années. Parmi ces sites figurent les anciennes mines de zinc et plomb localisées au nord de la Tunisie et au sud de la France. Ces sites sont tous sous la contrainte du climat méditerranéen avec d'abondantes précipitations à l'automne et une sécheresse estivale marquée, ce qui rend très difficile l'implantation d'un couvert végétal capable de phytostabiliser les déblais minier.

Le travail présenté vise à étudier la tolérance d'une luzerne annuelle, *M. orbicularis*, à de fortes concentrations en plomb et zinc et également à tester l'influence de bactéries symbiotiques fixatrices d'azote sur cette tolérance.

Matériel et méthodes

Sols

Trois types de substrats ont été retenus pour l'expérimentation : (1) les stériles miniers de l'ancienne mine de Zn et Pb de Fej El Hdoum (Gouvernorat de Séliana, nord-ouest de la Tunisie), (2) les stériles miniers de l'ancienne mine de Zn au sud de la France (Saint Laurent le Minier « mine des Avinières »), (3) un substrat provenant du site de Col du Vent (Causse du Larzac, marge méridionale du Massif Central, France). Les stériles miniers issus des sites de Fej El Hdoum et de Saint Laurent le Minier présentent de fortes teneurs en zinc, plomb et cadmium tandis que le substrat prélevé au Col du Vent n'est pas contaminé par des métaux. Les concentrations en métaux pour chaque site minier sont présentées dans le Tableau 1.

Tableau 1. *Concentration en métaux totaux et pH dans les échantillons du sol étudiés. Les résultats sont exprimés en mg/kg.*

SITES	AVINIERES	FEJ EL HDOUM	COL VENT
pH_{water}	7,57	8,06	8,4
Cd	56,2	32	1,71
Pb	21600	4200	59,61
Zn	16200	12400	233,54

Matériel biologique

De jeunes plants de *Medicago orbicularis* ont été observés sur les stériles miniers de Fej El Hdoum où ils ont été prélevés avec leur substrat, puis transférés dans une serre. Après 3 mois de culture, les nodosités observées sur les racines des plantes de *M. orbicularis* ont été prélevées et des isolats bactériens ont été obtenus. Parallèlement des gousses de *M. orbicularis* ont été prélevées et les graines viables ont été utilisées pour la multiplication de cette espèce hors site.

Conduite de l'expérimentation

Afin d'étudier la tolérance de *M. orbicularis* à la présence de métaux dans le substrat de culture, les plantes ont été cultivées soit en étant alimentées avec une solution nutritive supplémentée avec 3 mM KNO_3, soit inoculées avec un mélange de trois

souches bactériennes symbiotiques (10^9 UFC par plante) et alimentées avec la solution nutritive contenant seulement 0,5 mM de KNO_3.

L'expérience a été réalisée dans des tubes en verre de 70 ml contenant un mélange de 50% du stérile minier ou de substrat non contaminé + 50% d'attapulgite calcinée (Oil Dri US Special, Damolin, Denmark; http://www.damolin.dk) pour obtenir une meilleure porosité au niveau des tubes. Afin de travailler dans des conditions stériles, tous les tubes ont été stérilisés deux fois à 120° C pendant 20 min à 24 heures d'intervalle.

Les graines préalablement scarifiées et stérilisées ont été disposées sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose (10% d'agar-agar) et ont été maintenues dans une chambre froide à 5 ° C pendant 48 heures, avant d'être transférées à 22°C. Toutes ces étapes ont été faites dans des conditions stériles afin d'éviter toute contamination fongique ou bactérienne.

Une semaine après le semis, les plants ont été transférés dans les tubes contenant les différents substrats et mis dans une chambre de culture (16 heures jour et 8 heures nuit ; T° jour : 22°C ; T° nuit : 18°C ; 60–70% d'humidité relative) pendant deux mois.

Les plantes ont été alimentées avec la solution nutritive utilisée par Bertrand et *al.* (2001), une fois par semaine.

Six plantes ont été récoltées et ont été séparées en feuilles, racines et nodules et mises par la suite dans une étuve à 60°C pendant une semaine pour en déterminer les biomasses. A la récolte, les racines des plantes ont été soigneusement rincées avec de l'eau distillée pour se débarrasser du substrat et de l'attapulgite.

Teneur en chlorophylle

Le jour de la récolte, la teneur en chlorophylle a été déterminée avec un « SPAD-502 chlorophyll Meter » (Minolta Soil-Plant Analyses Development).

Les analyses statistiques

Les analyses statistiques des résultats ont été effectuées avec le logiciel XLSTAT pour la mise en œuvre du test ANOVA avec un risque alpha général à 5%.

Résultats

Biomasse aérienne et racinaire

Au contact des substrats de Fej El Hdoum et des Avinières contaminés par des métaux, *M. orbicularis* a des biomasses des parties aériennes et racinaires très sensiblement réduites. En effet, les matières sèches aériennes des plantes cultivées sur le substrat de Fej El Hdoum et des Avinières représentent respectivement 30.8 % et 35 % de celles des plantes cultivées sur le substrat non contaminé du Col du Vent (Fig. 1a). On ne note pas de différence significative entre les biomasses des parties aériennes des plantes placées au contact des deux substrats contaminés. Par contre, une biomasse racinaire significativement plus élevée a été observée avec les plantes de *M. orbicularis* cultivées sur le sol de Fej El Hdoum par rapport à celles placées au contact du substrat des Avinières (Fig. 1b).

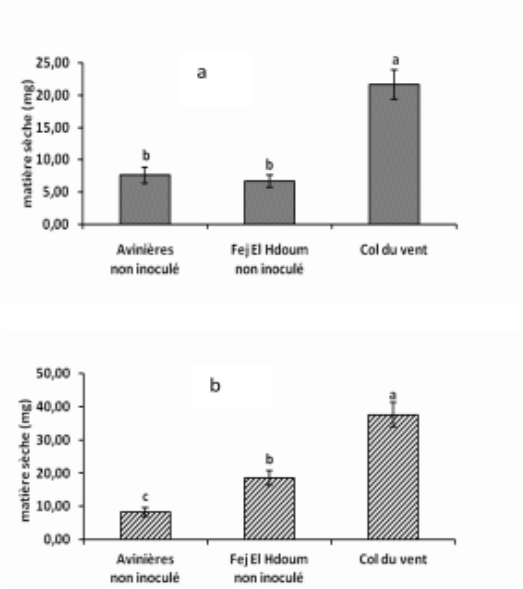


Figure 1. *Biomasse aérienne en mg par plante (a) et biomasse racinaire (b) de Medicago orbicularis cultivée sur trois types de substrats (Avinières, Fej El Hdoum et Col du Vent) en absence de souches symbiotiques et en présence de 3 mM KNO_3.*

Des différences significatives au niveau de 5% sont notées par des lettres différentes. Les traitements qui sont suivies de la même lettre ne présentent pas de différence significative.

L'inoculation des plantes avec les souches symbiotiques fixatrices d'azote n'a pas généré une différence significative de biomasse aérienne et racinaire par rapport à celles supplémentée avec 3 mM de KNO_3. En effet, la légère augmentation de la matière sèche des parties aériennes et des racines générée par l'inoculation avec les souches symbiotiques pour des deux substrats contaminés ne sont pas statistiquement différentes (Fig. 2a &b).

Nombre de nodosités

L'analyse de l'ANOVA du nombre de nodosités a montré un effet significatif entre les deux sols contaminés. Avec le substrat des Avinières, très peu de nodosités ont été observées sur les racines de

M. orbicularis (jamais plus de deux nodosités par plantes) alors qu'un nombre plus élevé a été obtenu avec les plantes cultivées placées au contact du substrat de Fej El Hdoum (Fig. 3).

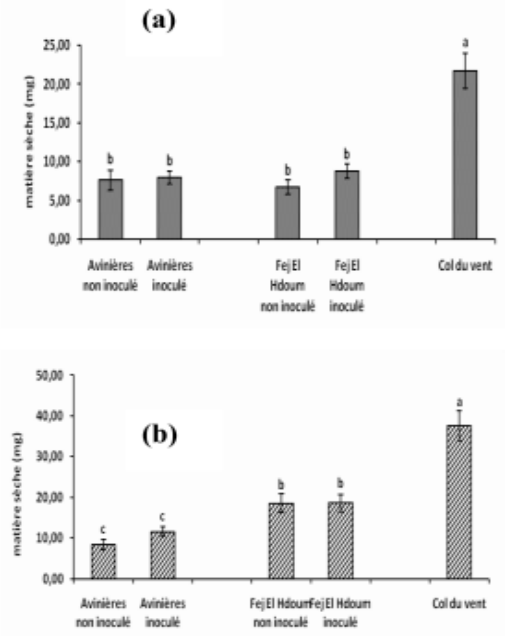


Figure 2. *Biomasse aérienne en mg par plante (a) et la biomasse racinaire (b) de M. orbicularis cultivée sur trois types de substrats (Avinières, Fej El Hdoum et Col du Vent) inoculée avec trois souches symbiotiques.*

Des différences significatives au niveau de 5% sont notées par des lettres différentes. Les traitements qui sont suivies de la même lettre ne présentent pas de différence significative.

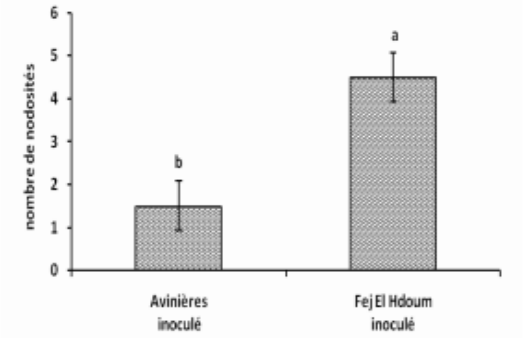


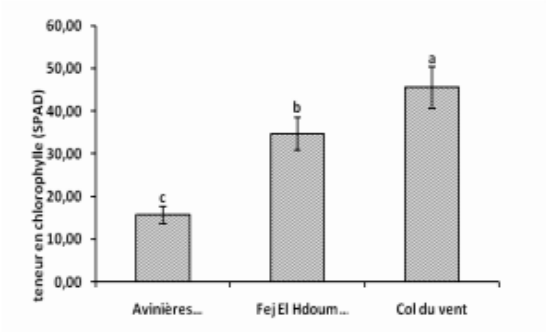
Figure 3. *Nombre de nodosités de M. orbicularis cultivée sur les subsrats des Avinières et de Fej El Hdoum et inoculée avec des souches symbiotiques.*

Des différences significatives au niveau de 5% sont notées par des lettres différentes. Les traitements qui sont suivies de la même lettre ne présentent pas de différence significative.

Teneur en chlorophylle

Seules les plantes cultivées avec le substrat non contaminé du Col du Vent et en présence de 3 mM de KNO_3 présentent une teneur en chlorophylle élevée. La croissance de la luzerne sur les substrats chargés en métaux a engendré une diminution de la teneur de la chlorophylle par rapport au à celle observée avec le substrat non contaminé (fig. 4a). Toutefois, une teneur en chlorophylle plus élevée a été obtenue avec le substrat Fej El Hdoum tandis qu'avec le substrat des Avinières, des symptômes de toxicités très nets sont observés au niveau des feuilles (fig. 5).

L'inoculation des plantes de luzerne avec des souches bactériennes a sensiblement amélioré la teneur en chlorophylle (augmentation de 30%) des plantes de *M. orbicularis* placées au contact du substrat des Avinières. Avec le substrat de Fej El Hdoum, l'augmentation de la teneur en chlorophylle est très faible et la différence n'est pas significative (fig. 4b).



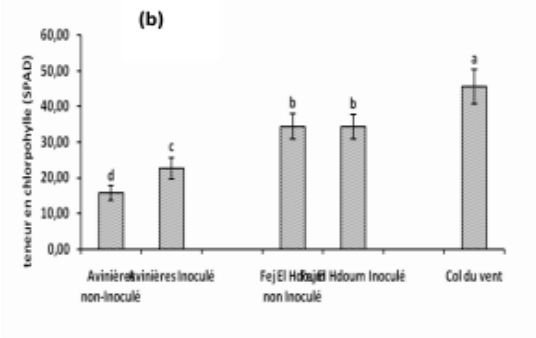


Figure. 4*. Teneur en chlorophylle de M. orbicularis cultivée sur trois types de substrats (Avinières, Fej El Hdoum et Col du Vent) soit en présence de 3 mM KNO_3 (a) ou inoculée avec des souches symbiotiques (b).*

Des différences significatives au niveau de 5% sont notées par des lettres différentes. Les traitements qui sont suivies de la même lettre ne présentent pas de différence significative.

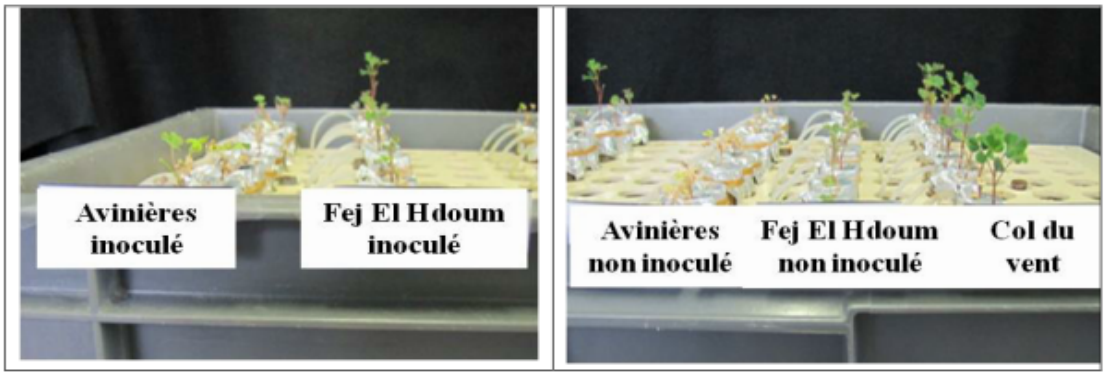


Figure 5. *Medicago orbicularis cultivée sur les trois types de substrats. Les plantes ont été cultivées en présence de 3 mM de KNO3 ou inoculée avec des souches symbiotiques.*

Discussion

La diminution observée pour les biomasses racinaires et aériennes de *Medicago orbicularis* placée au contact des substrats de Fej El Hdoum et des Avinières qui ont de fortes teneurs en zinc et plomb montrent que l'écotype de cette luzerne collectée sur l'ancien site minier de Fej El Hdoum n'est probablement pas très tolérant aux deux métaux cités précédemment. On observe d'ailleurs que la réduction de biomasse des parties aériennes et racinaires est plus importante avec le substrat des Avinières qui est celui présentant les concentrations en métaux les plus élevées. Cette diminution des biomasses peut être due à la toxicité des métaux pour *M. orbicularis* comme cela a été montré par Gyana et Premananda (2003). Ces auteurs ont en effet montré que la présence de concentrations élevées d'éléments comme le zinc dans le milieu de culture des plantes provoquait une inhibition de la croissance racinaire suite à un changement au niveau des noyaux des cellules des racines et une déstructuration des cellules corticales.

La diminution observée pour les biomasses racinaires et aériennes de *M. orbicularis* placée au contact des substrats de Fej El Hdoum et des Avinières est accompagnée par de clairs symptômes de toxicité avec les deux substrats à fortes teneurs en zinc et en plomb lorsque les plantes sont cultivées en présence de 3 mM de KNO_3 (fig. 5). En effet, la teneur en chlorophylle a été clairement affectée pour le substrat le plus contaminé (Avinières). La diminution de la teneur en chlorophylle implique une diminution de l'activité photosynthétique qui est souvent associée à des processus de stimulation de la sénescence (Monnet et *al.*, 2001). La toxicité des métaux lourds est également liée à des dommages oxydatifs induits dans les systèmes vitaux des végétaux (Hattab et *al.*, 2009). Chez le pois, l'application d'une concentration élevée en Cd a provoqué une nette baisse de la teneur en chlorophylle. Cette diminution pourrait être liée à l'augmentation de la concentration cellulaire des dérivés réactifs de l'oxygène en réduisant la capacité antioxydante cellulaire (Hattab et *al.*, 2009).

Bien que *M. orbicularis* soit issue du site minier de Fej El Hdoum, elle n'a pas montré une forte production de la biomasse végétale lorsqu'elle est cultivée sur son substrat d'origine et sur celui des Avinières lorsqu'elle est alimentée par 3 mM de KNO_3. Ceci pourrait être expliqué par le fait qu'au niveau de l'ancien site minier de Fej El Hdoum, les métaux ne sont sans doute pas biodisponibles pour la plante. Cette non biodisponibilité peut être liée au pH basique du substrat (Wang et *al.*, 2006) et *M. orbicularis* n'aurait pas subi une pression de sélection lui permettant d'acquérir une tolérance aux métaux (Antonovics et *al.*, 1971).

L'inoculation avec des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote a induit une modification du comportement de *M. orbicularis* lorsque cette plante est placée au contact des substrats fortement contaminés par le zinc et le plomb. L'amélioration des performances de *M. orbicularis* sont surtout évidentes pour les plantes qui ont été placées au contact du substrat minier des Avinières, notamment au niveau des racines et de la teneur en chlorophylle (fig. 2a & b ; fig.5). Très peu de nodosités ont été observées sur *M. orbicularis* en présence de substrats fortement contaminés en métaux et si la fixation biologique a pu contribuer au reverdissement des plantes, il est aussi très probable que cela soit dû aux bactéries restées libres dans le substrat et au contact des racines dans le rhizoplan.

Des études ont en effet montré que l'interaction entre les plantes et les microorganismes rhizosphériques peut avoir un effet bénéfique pouvant stimuler la production de biomasse et la tolérance des plantes aux métaux (Glick, 2003; Belimov et *al.*, 2005). Les bactéries rhizosphériques,

peuvent réduire et/ou détoxifier le stress induit par les métaux lourds par plusieurs mécanismes. Ces mécanismes comprennent l'efflux d'ions métalliques à l'extérieur de la cellule, la biostimulation, la réduction des métaux et la biosorption (Outten et *al.*, 2000). Plus récemment, Wani et *al.* (2008) ont montré que l'inoculation de *Pisum sativum* avec la souche RP5, a favorisé une diminution de la concentration en Zn et en Ni chez les plantes cultivées en présence de ces deux métaux par rapport aux témoins non inoculés. D'autres travaux ont été réalisés avec les champignons qui entrent en association avec les plantes hôtes (champignons mycorhiziens). Il a été mis en évidence un effet protecteur de ces champignons pour la plante exposée à des fortes concentrations en métaux (Leyval et *al.*, 1995; Chen et *al.*, 2007). Cet effet se traduit par une amélioration de la croissance racinaire des plantes de *Daucus carota* cultivées en présence du cadmium (Janouskova and Vosatka, 2005).
Pour mieux analyser le rôle des bactéries symbiotiques, il serait important à l'avenir, d'examiner l'effet des bactéries sur l'absorption et l'accumulation des métaux dans les plantes de *M. orbicularis*. Ceci permettra notamment de confirmer que les bactéries symbiotiques fixatrices d'azote ont un effet protecteur et peuvent améliorer la croissance de *Medicago orbicularis* en milieu contaminé.

Conclusion

En conclusion, cette étude a montré que la culture de *M. orbicularis* sur des substrats très contaminés par les métaux lourds (concentrations dépassant les normes autorisées pour les boues d'épuration) affecte sérieusement la croissance et la photosynthèse de cette plante. L'inoculation de bactéries symbiotiques au moment du transfert des plantes dans le substrat contaminé en métaux a généré une nette amélioration de la teneur en chlorophylle pour le substrat très contaminé des Avinières et une très légère augmentation de la biomasse de la luzerne lorsqu'elle est cultivée sur son substrat d'origine (Fej El Hdoum). Des études complémentaires devront être réalisées afin déterminer si les concentrations en métaux dans la plante sont affectées par la présence des bactéries. Ainsi, une diminution de la teneur en métaux dans les tissus des végétaux ouvrirait de nouvelles perspectives pour stabiliser les anciens sites miniers en utilisant des espèces végétales et bactériennes locales adaptées aux conditions du milieu. Ainsi, une baisse de la concentration en métaux dans les parties aériennes permettrait de limiter le risque d'entrée des éléments toxiques dans la chaîne alimentaire.

Remerciements

Ce travail a été partiellement financé par le programme AVERROES dans le cadre des échanges scientifiques entre Montpellier SupAgro et l'Université de Sousse (Institut Supérieur Agronomique de Chott Meriam). Nous remercions Monsieur Moncef BEN HAMMOUDA, professeur à l'Ecole Supérieure d'Agriculture du Kef, pour son soutien et son aide tout au long des échantillonnages sur le site de Fej El Hdoum.

Références bibliographiques

Antonovics, J., A. D. Bradshaw, and R. G. Turner (1971). Heavy metal tolerance in plants. *Advances in Ecological Research* 7:1-85.

Belimov A.A., Hontzeas N., Safronova V.I., Demchinskaya S.V., Piluzza G., Bullitta S. & 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.

Bertrand H., Nalin R., Bally R. & Cleyet-Marel J.C. (2001). Isolation and identification of the most efficient plant growth-promoting bacteria associated with canola (*Brassica napus*). *Biol Fertil Soils*, 33:152–156.

Chen B.D., Zhu Y.G., Duan J., Xiao X.Y. & Smith S.E. (2007). Effects of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on growth and metal uptake by four plant species in copper mine tailings. *Environ Pollut*, 147:374-380.

Dary M., Chamber-Perez M.A., Palomares A.J. & Pajuelo E. (2010). "In situ" phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *J Hazard Mater*, 177:323-330.

Escarré J., Lefèbvre C., Raboyeau S., Dossantos A., Gruber W., Cleyet Marel J.C., Frérot H., Noret N., Mahieu S., Collin C. & Oort F. (2010). Heavy Metal Concentration Survey in Soils and Plants of the Les Malines Mining District (Southern France): Implications for Soil Restoration. *Water, Air, & Soil Pollution*, 216:485-504.

Frérot H., Lefèbvre C., Gruber W., Collin C., Santos A.D. & Escarré J. (2006). Specific Interactions between Local Metallicolous Plants Improve the Phytostabilization of Mine Soils. *Plant and Soil*, 282:53-65.

Glick B.R. (2003). Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances*, 21:383-393.

Gyana R.R. et Premananda D. (2003). Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism. *I.Zinc. Agronomie* 23:3-11.

Hattab S., Dridi B., Chouba L., Ben Kheder M. & Bousetta H. (2009). Photosynthesis and growth responses of pea Pisum sativum L. under heavy metals stress. *Journal of Environmental Sciences*, 21:1552-1556.

Janouskova M. & Vosatka M. (2005). Response to cadmium of *Daucus carota* hairy roots dual cultures with *Glomus intraradices* or *Gigaspora margarita*. *Mycorrhiza*, 15:217-224.

Leyval C., Singh B.R. & Joner E.J. (1995). Occurrence and infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in some norwegian soils influenced by heavy metals and soil properties. *Water, Air and Soil Pollution*, 84:203-216.

Lopez-Millan A.F., Ellis D.R. & Grusak M.A. (2004). Identification and characterization of several new members of the ZIP family

of metal ion transporters in *Medicago truncatula*. *Plant Molecular Biology*, 54:583–596.

Mahieu S., Frérot H., Vidal C., Galiana A., Heulin K., Maure L., Brunel B., Lefèbvre C., Escarré J. & Cleyet-Marel J.-C. (2011). *Anthyllis vulneraria/Mesorhizobium metallidurans*, an efficient symbiotic nitrogen fixing association able to grow in mine tailings highly contaminated by Zn, Pb and Cd. *Plant and Soil*, 342:405-417.

Monnet F., Vaillanta N., Hitmia A., Coudreta A. & Sallanonb H. (2001). Endophytic *Neotyphodium lolii* induced tolerance to Zn stress in Lolium perenne. *Physiologia Plantarum*, 113:557–563.

Outten FW, Outten CE, O'Halloran T (2000). Metalloregulatory systems at the interface between bacterial metal homeostasis and resistance. In: Storz G, Hengge Aronis R (eds) Bacterial stress responses. ASM Press, Washington, DC, pp 145-157.

Rashed M.N. (2010). Monitoring of contaminated toxic and heavy metals, from mine tailings through age accumulation, in soil and some wild plants at Southeast Egypt. *J Hazard Mater*, 178:739-746.

Rother J.A.; Millbank J.W.; Thornton I. (1983). Nitrogen fixation by white clover (*Trifolium repens*) in grasslands on soils contaminated with cadmium, led and zinc. *Journal of soil science* 34:127-136.

Salt, D. E., R. D. Smith, and I. Raskin. (1998). Phytoremediation. Annual Review of Plant *Physiology and Plant Molecular Biology* 49:643-668.

Vara Prasad M.N. & Freitas H.M.O. (2003). Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6:285-321.

Vitousek P.M. & Field C.B. (1999). Ecosystem constraints to symbiotic nitrogen fixers: a simple model and its implications. *Biogeochemistry*, 46:179-202.

Wang A.S., Angle J.S., Chaney R.L., Delorme T.A. & Reeves R.D. (2006). Soil pH Effects on Uptake of Cd and Zn by Thlaspi caerulescens. *Plant and Soil*, 281:325-337.

Wani P.A., Khan M.S. & Zaidi A. (2008). Effect of metal-tolerant plant growth-promoting *Rhizobium* on the performance of pea grown in metal-amended soil. *Arch Environ Contam Toxicol*, 55: 33-42.

Annexe 2

Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria

Systematic and Applied Microbiology 35 (2012) 65–72

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Systematic and Applied Microbiology

journal homepage: www.elsevier.de/syapm

Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria☆

Géraldine Maynaud[a], Anne Willems[b], Souhir Soussou[c], Céline Vidal[a], Lucette Mauré[a], Lionel Moulin[d], Jean-Claude Cleyet-Marel[a], Brigitte Brunel[c,*]

[a] *INRA, USC1242, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes IRD/INRA/CIRAD/Montpellier SupAgro/Université Montpellier II, TA A-82/J, F-34398, Montpellier Cedex 5, France*
[b] *Laboratorium voor Microbiologie, Faculteit Wetenschappen, Universiteit Gent, Belgium*
[c] *Montpellier SupAgro, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, IRD/INRA/CIRAD/ Montpellier SupAgro/Université Montpellier II, TA A-82/J, F-34398, Montpellier Cedex 5, France*
[d] *IRD, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, IRD/INRA/CIRAD/Montpellier SupAgro/ Université Montpellier II, TA A-82/J, F-34398, Montpellier Cedex 5, France*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 15 June 2011
Received in revised form
14 November 2011
Accepted 30 November 2011

Keywords:
Mesorhizobium
Heavy-metal tolerance
Multilocus sequence analysis
nodA gene
N_2-fixation

ABSTRACT

Bacterial strains from Zn–Pb mine tailings were isolated by trapping with *Anthyllis vulneraria*, a legume-host suitable for mine substratum phytostabilisation. Sequence analysis of the 16S rRNA gene and three housekeeping genes (*atp*D, *dna*K and *rec*A) showed that they were related to those of the genus *Aminobacter*. DNA–DNA relatedness of representative isolates supported the placement of novel strains in *Aminobacter* as a new species. Phenotypic data emphasize their differentiation from the other related species of *Aminobacter* and *Mesorhizobium*. *Aminobacter* isolates exhibited *nod*A sequences tightly related with *M. loti* as the closest *nod*A relative. By contrast, their *nod*A sequences were highly divergent from those of *M. metallidurans*, another species associated with *A. vulneraria* that carries two complete copies of *nod*A. Therefore, the novel bacterial strains efficient on *A. vulneraria* represented the first occurrence of legume symbionts in the genus *Aminobacter*. They represent a new species for which the name *Aminobacter anthyllidis* sp. nov. is proposed (type strain STM4645^T = LMG26462^T = CFBP7437^T).
© 2011 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Mediterranean and metalliferous mine environments are highly vulnerable to soil erosion responsible for extensive air and water pollution. Re-vegetation or phytostabilisation strategies [18] for erosion control rely in most cases on the establishment of plants adapted to reduced water conditions, heavy metal toxicity and limited soil nutrients. Promising plants for phytostabilisation (*Anthyllis vulneraria*, *Festuca rubra* and *Koelaria pratensis*) were identified in a first study in the South of France [5]. *Anthyllis vulneraria* belongs to the Fabaceae family that is able to capture nitrogen biologically and therefore could facilitate, in N-deficient substratum, the growth of associated and succeeding non-nitrogen fixing plant species, allowing a sustainable vegetation cover to limit mine impacts. *Anthyllis* is known as Mediterranean forage and was identified elsewhere for vegetation recovery in reclamation strategies [17,22] such as mines, as some ecotypes are metal-tolerant. Ecological success of *Anthyllis* on heavy metal wastes relies on compatible rhizobia and a first rhizobial species named *Mesorhizobium metallidurans* efficient on *A. vulneraria* plant-host and resistant to Zn and Cd was characterized [10,24]. In the course of enlarging phytostabilisation strategies based on *Anthyllis*-rhizobium pair for ancient Zn–Pb mines, we obtained root-bacteria that were different from *M. metallidurans* and preliminary data related them to the genera of *Mesorhizobium* or *Aminobacter* (unpublished data).

Mesorhizobium and *Aminobacter* are two closely related genera of the Phyllobacteriaceae family among the *Alphaproteobacteria*. Nowadays, the genus *Mesorhizobium* comprises 22 recognized species (http://www.bacterio.cict.fr) whereas the genus *Aminobacter* comprises 5 species [9,23]: *A. aminovorans*, *A. aganoensis*, *A. niigataensis*, *A. ciceronei* and *A. lissarensis*. The genus

☆ Accession numbers: Nucleotide sequence data reported are available in Genbank under the following accession numbers: (i) 16S rDNA: FR869633 (strain STM4645^T, this sequence is identical to those of isolates STM4640-41, 4643, 4644, 4653, 4646 and 6499), FR869634 (STM6498); (ii) partial *atp*D sequences: FR869648-59 (STM4640-41, 4643-46, 4653, 6498-99, 4662-64 and STM2150^T); (iii) partial *rec*A sequences: FR869637-46 (STM4640-41, 4643-46, 4653, 6498-99, STM2150^T and 3600^T) and HE599786-87 (STM4662 and 4664);(iv) partial *dna*K sequences: FR869660-72 (STM 4640-41, 4643-46, 4653, 6498-99, 4662-64, 2150^T and 3600^T); (v) partial *nod*A sequences: FR869673-83 (STM 4640-41, 4643-46, 4653, 6498-99 and 4662-64), and FN436265-66 for the two copies of STM2683^T and (vi) partial *nod*C gene sequence of STM2683^T: FN436262.

* Corresponding author. Tel.: +33 4 99 61 22 91; fax: +33 4 67 59 38 02.
E-mail address: brunel@supagro.inra.fr (B. Brunel).

0723-2020/$ – see front matter © 2011 Elsevier GmbH. All rights reserved.
doi:10.1016/j.syapm.2011.11.002

Aminobacter comprises aerobic Gram-negative, rod-shaped bacteria that can use ammonia, nitrate, urea, peptone and methylamine as nitrogen sources. No information exists about the capacity of *Aminobacter* species to fix nitrogen or to nodulate legumes. Yet, some isolates originating from *L. tenuis* were detected closer to *Aminobacter aminovorans* [4], suggesting the genus *Aminobacter* could contain legume-nodulating members.

In this study, we define the taxonomical position of new bacterial symbionts of *A. vulneraria* able to grown on heavy-metal mines, propose *Aminobacter anthyllidis* as a new species and demonstrate for the first time that the genus *Aminobacter* harbours legume-nodulating bacteria.

Materials and methods

Isolation of strains, growth conditions

Seeds of *A. vulneraria* subsp. *pyrenaica* were collected from the Eylie mine (France), where natural populations of *A. vulneraria* subsp. *pyrenaica* were growing. Seeds were germinated and plantlets were grown in tubes containing 10 g of mine soil on top of clay granules and 6 weeks later, nodules were recovered and surface-sterilized with 3% Na hypochloride (2 min), thoroughly rinsed and crushed into sterile water [24]. The bacterial suspensions were streaked on Yeast Extract Mannitol (YEM) agar plates and incubated (28 °C). Bacterial colonies were observed after 1–3 weeks and single colonies were checked for purity. In addition, two strains were obtained from root-nodules of *A. vulneraria* subsp. *carpatica* collected on the mine of Breinic (Germany), as described above. *A. vulneraria* subsp. *carpatica* was the only *A. vulneraria* subspecies detected at Breinic mine whereas the subspecies *pyrenaica* was the only one recorded at the Eylie site. Chemical characteristics of both mine soils are given in Table S1. All isolates are listed in Table S2 and were stored in 20% glycerol (v/v) at −80 °C.

DNA extraction, sequencing, phylogenetic analyses

Genomic DNA was extracted according to a standard phenol–chloroform extraction method [3]. Near full-length 16S rRNA genes and partial *rec*A and *atp*D sequences were PCR-amplified as previously described [24]. A *dna*K fragment was amplified with the primers TSdnaK4r/TSdnaK2f [20] and a hybridization step of 56 °C (30 s). Sequencing was completed for housekeeping gene fragments of *A. lissarensis* CIP108660^T (=STM3600^T) and *A. aminovorans* STM2150^T (=LMG2122^T). For *nod*A, DNAs were amplified with the primers nodAF21Meso (TGGARGYTRTGCTGGGAAAA) and nodAR591Meso (TCATAGYTCYGRACCGTTCCG) by using a hybridization of 55 °C (30 s). PCR products were run on 1% agarose gels, the corresponding bands excised, purified with QIAGEN kit and then sequenced by GenoScreen Company (France). For *M. metallidurans* STM2683^T, *nod*A amplified products were cloned before sequencing in pGEM-T Easy vector (Promega). The obtained sequences were aligned using ClustalX 1.83 and optimized manually with GeneDoc 2.7.00. Phylogenetic trees were inferred by the neighbour-joining (NJ) method using Kimura 2 parameters distances with Mega 4 [21] or by the maximum likelihood (ML) method using PhyML (www.phylogeny.fr). Confidence of the nodes was estimated with 1000 (NJ) or 500 (ML) bootstrap replications.

DNA G+C content and DNA–DNA hybridization

The DNA G+C content was determined by HPLC [11]. DNA–DNA hybridizations were carried out by fluorometric method using photobiotin-labelled DNA probes as described before [26]. Hybridizations were performed at 45 °C in 2X SSC in presence of 50% formamide. Five strains showing *recA* and *atpD* sequences with the highest dissimilarities were used. At least four repetitions were done and reciprocal reactions were performed for every DNA pair.

Biochemical characterization

Substrate utilizations were performed on all new isolates and type strains STM2150^T, STM3600^T and STM2683^T, using API20NE, API50CH (BioMerieux) and PM1 MicroPlate (AES Chemunex). The tests were carried out according to manufacturer's instructions and were incubated for 1 week except for API50CH galleries (2 weeks).

Intrinsic antibiotic resistance was examined by measuring growth inhibition zone diameters of cells spread on YEM agar plates with BioMerieux discs containing the following antibiotics (μg): nalidixic acid (30), neomycin (30), ciprofloxacin (5), polymyxin B (300 IU), streptomycin (300), penicillin G (10 IU), rifampicin (30), cefuroxim (30), kanamycin (30), erythromycin (15), gentamicin (10), tetracycline (30), ampicillin (10), chloramphenicol (30) and vancomycin (30). Tolerance to different concentrations of NaCl (1–5%), temperature of growth (28 °C, 37 °C and 42 °C) and pH ranges (4–12) for growth were performed on YEM medium. All bacterial growths were assessed after 1 week.

The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was used to define the lowest concentration of heavy metal that inhibits the visible growth of bacteria [2]. The MIC of Zn and Cd were determined in triplicate, by transferring a single colony to YEM broth, in a microwell plate and using increase concentrations of $ZnSO_4$ (from 0.5 to 24 mM) and $CdCl_2$ (from 0.025 to 3 mM). Growth was measured at 600 nm 1 week after incubation (28 °C, agitation at 450 r.p.m).

Nodulation and fixation tests

Representative isolates and reference strains were tested for nitrogen fixation on *A. vulneraria* subspecies *pyrenaica* and *carpatica*. Seeds, plants and bacteria were prepared as previously described [24]. Seedlings were grown in glass tubes containing sterile clay granules as rooting substrate with a nitrogen-free nutritive solution. Tubes with plants (10 per treatment) were kept in a growth chamber at 22 °C during the day and 18 °C at night, with a 16-h photoperiod and 60–70% relative humidity. Plants were recorded for nodule formation after a 9-week period. N_2-effectiveness was estimated by weighing plant dry matter and by measuring chlorophyll content with a SPAD52 (Minolta Soil-Plant Analyses Development). Uninoculated plants and plants fertilized with $Ca(NO3)_2$ were included as controls. Analyses of variance were performed using XLSTAT 2010.

Results

Isolation of rhizobia, characteristics of growth and metal tolerance

Eleven rhizobial isolates were obtained from nodules of *A. vulneraria* growing on Zn–Pb mine tailings. When grown on YEM agar medium, colonies were 1–3 mm in diameter after 2–3 days incubation (28 °C), except for two isolates that displayed a slower growth (Table S2). *Anthyllis* isolates tolerated Cd (MIC = 0.3–1 mM) while they rather had a low level of Zn resistance (MIC = 1–3 mM), compared to the sensitive strain of *M. tianshanense*^{T} and the resistant strain of *M. metallidurans*^{T} isolated from a Zn–Pb mine [24]. Similar MICs were exhibited by *Aminobacter* isolates and *A. aminobacter*^{T} and *A. lissarensis*^{T} (Table S2).

Table 1
% GC and DNA:DNA hybridization values between four *Aminobacter* strains isolated from *A. vulneraria* and *A. aminovorans* LMG2122^T and *A. lissarensis* CIP 108661^T.

Name	Strain	%GC	STM 4641	STM 4645	STM 4646	STM 6499	CIP 108661^T	LMG 2122^T
Aminobacter anthyllidis sp. nov.	STM 4641	62.7	100	96.5	84.9	81	53.6	55
Aminobacter anthyllidis sp. nov.	STM 4645^T	62.6	96.1	100	80.9	83.7	59.5	59.1
Aminobacter anthyllidis sp. nov.	STM 4646	62.9	81.6	80.2	100	97.2	55.4	64.6
Aminobacter anthyllidis sp. nov.	STM 6499	63.0	87.7	81.2	96.7	100	57.6	59.4
Aminobacter lissarensis	CIP 108661^T	62.6	49.7	53.7	51.6	54.6	100	61.1
Aminobacter aminovorans	LMG 2122^T	63.2	50.8	53.7	60.4	60	53.4	100

Phylogenies of 16S rDNA, recA, dnaK and atpD sequences

The 16S rDNA sequences of all isolates showed two distant clusters (Fig. S1). The first one belongs to the *Aminobacter* group and contains nine isolates showing a unique 16S rDNA sequence (STM4640-41, 4643-46, 4653 and 6499) but one (STM6498) with one base of divergence. The second one (STM4662, 4664) belongs to the *Mesorhizobium* group and displays the same 16S rDNA sequence as *M. gobiense*^{T} and *M. metallidurans*^{T}. The eight *Aminobacter* strains sharing a 100% identity 16S rDNA sequence, were closer to *A. lissarensis*^{T} (8 base mismatches/1457 bases), then to *A. aminovorans*^{T} (10 mismatches), *A. agonoensis*^{T}/*A. niigataensis*^{T} (11 mismatches), and *A. ciceronei*^{T} (9 mismatches/1271 bases).

16S rDNA-based identification was refined with three supplementary housekeeping genes. The position of the two *Mesorhizobium* sp. isolates in the *Mesorhizobium* genus was consolidated by *rec*A, *atp*D and *dna*K (Fig. 1 and S2) phylogenies. Yet their close proximity to *M. metallidurans* or *M. gobiense* was not validated by *atp*D phylogeny. The 16S rDNA phylogenetic position of the nine

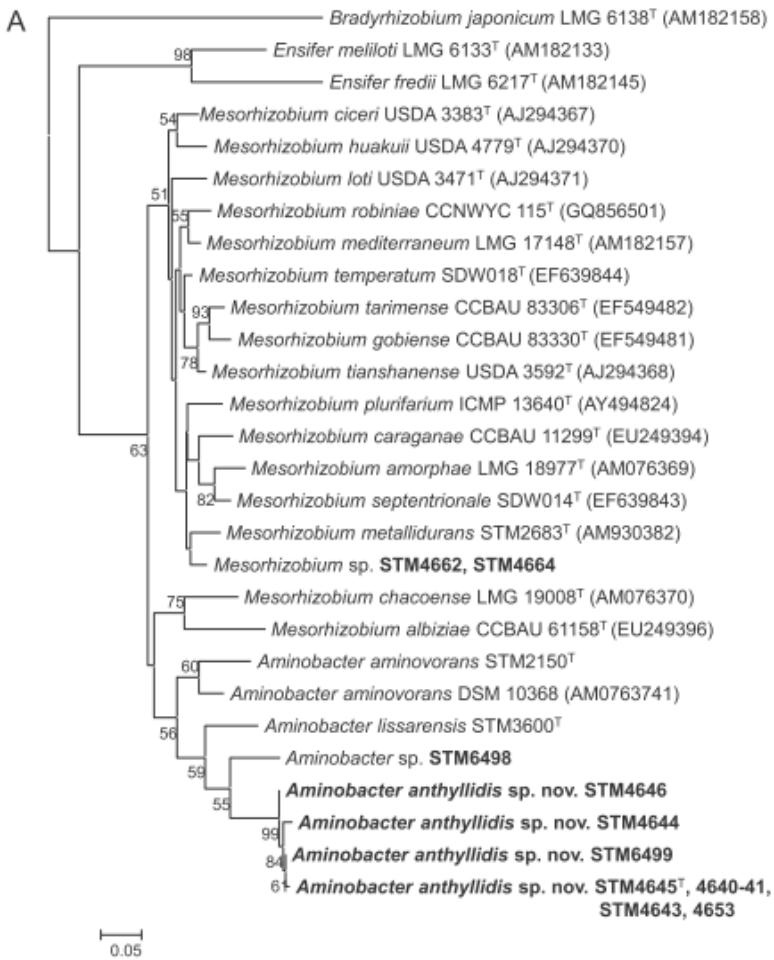


Fig. 1. Maximum-likelihood phylogenetic trees on *rec*A (A) and *atp*D (B) gene sequences showing the relationships between *A. vulneraria* isolates obtained in this study, and reference strains. The analysis was based on 386 nt for *rec*A sequences (A) and 401 nt for *atp*D sequences (B). Genbank accession numbers are given beside the strain numbers and the significance of each branch is indicated by bootstrap value calculated for 500 subsets (above 50%) at the major branch-points. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per 100 nucleotides. New *Anthyllis vulneraria* nodule isolates are shown in bold.

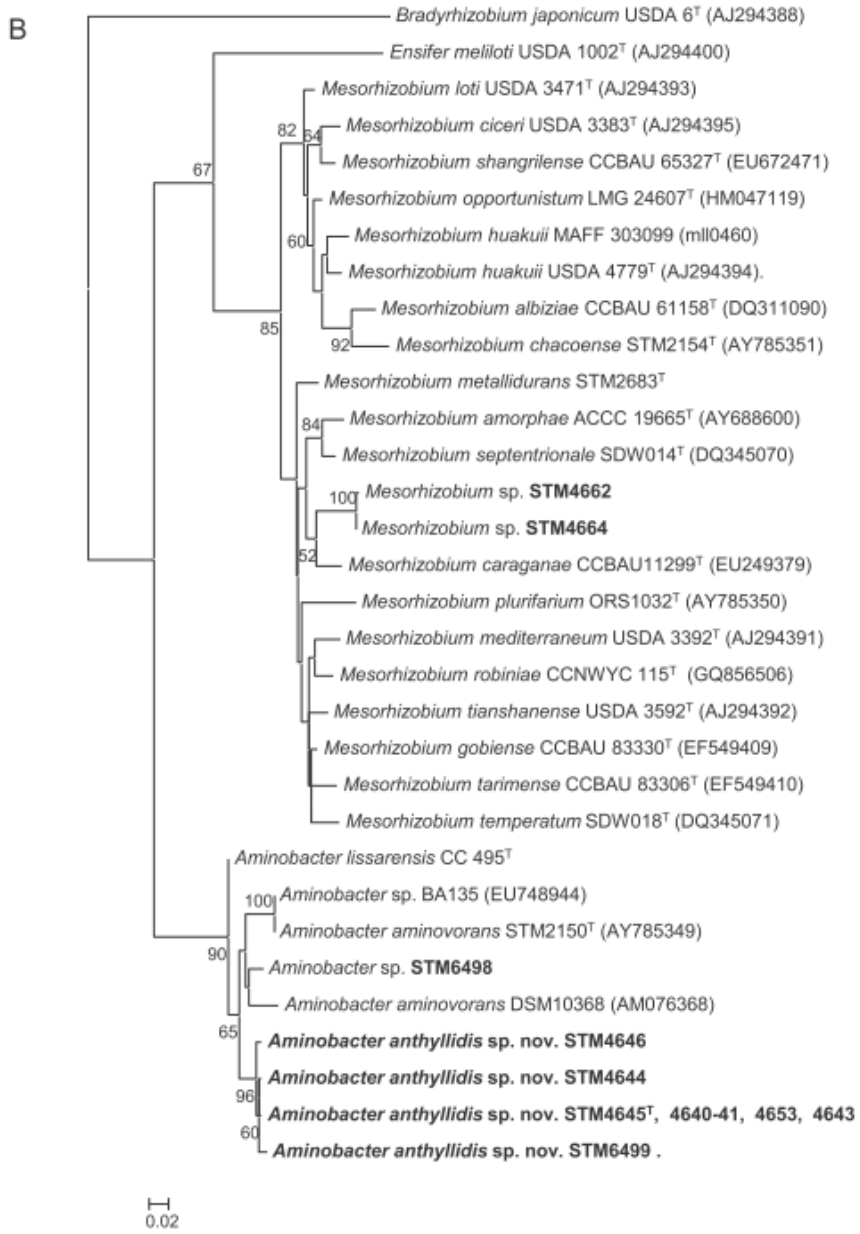


Fig. 1. (*Continued*).

Aminobacter strains from *A. vulneraria* within the genus *Aminobacter* was confirmed by *atp*D, *rec*A and *dna*K analyses (Fig. 1A–B and S2) showing closer relations with the type strains of *A. lissarensis* and *A. aminovorans*. Contrary to the 16S rDNA sequence that was identical for eight *Anthyllis* isolates (STM 4640-41, 4643-46, 4653 and 6499), sequences *of rec*A, *atp*D and *dna*K fragments displayed some variability and altogether allow distinction of four closely related branches (Fig. 1A–B and S2). These eight strains showed a divergence with *A. lissarensis*^{T} (90.8–91.2% similarity for *dna*K fragments; 97.3% for *atp*D; 88.6–89.4% for *rec*A) and with *A. aminovorans*^{T} (88.9–89.3% similarity for *dna*K; 88.4–88.89% for *atp*D; 88.3–88.9% for *rec*A).

GC content and DNA–DNA relatedness

Four representative strains (STM4641, 4645-46 and 6499) were chosen among the eight *Aminobacter* isolates from *A. vulneraria* sharing a common 16S rDNA sequence, to define more precisely their taxonomic position. They were compared to the type strains of *A. lissarensis* and *A. aminovorans*, their closest relatives. Their G + C content of genomic DNA was 62.6–63.0 mol% (Table 1). These values were in the range reported for the recognized *Mesorhizobium* species (59–64 mol%) [8] and *Aminobacter* species (62–63.7 [9]) which supported the fact that *Anthyllis* rhizobia could belong to the genus *Aminobacter*.

Table 2
Differential phenotypic characteristics among *Aminobacter anthyllidis* (STM4645^T, 4640-41, 4643-44, 4646, 4653, 6499), another *Aminobacter* strain isolated from *A. vulneraria* and reference strains. 1, five *Aminobacter* sp. nov. (STM4645^T, 4643, 4640-41, 4653); 2, STM6499; 3, STM4644; 4, STM4646; 5, STM6498; 6, *A. lissarensis* STM3600^T; 7, *A. aminovorans* STM2150^T and 8, *M. metallidurans* STM2683^T.

Characteristics	1	2	3	4	5	6	7	8
Assimilation of [a]								
L-Arabinose	+	+	+	+	–	+	+	+
Malic acid	+	–	+	–	–	–	–	–
Acidification of[a]								
Erythritol	–	–	–	+	–	+	–	–
L-Xylose	–	–	–	–	–	+	–	+
D-Adonitol, D-maltose, D-lactose	–	–	–	–	–	–	–	+
D-Galactose, D-fructose, D-mannitol	+	–	+	+	–	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	–	+
L-Sorbose	–	–	–	–	+	+	–	–
L-Rhamnose	+	+	+	+	–	+	–	+
Inositol	+	+	+	+	–	+	+	+
D-Sorbitol	+	–	–	+	–	+	+	+
D-Tyranose, D-lyxose	–	–	–	–	–	+	–	–
Fucose	w	+	+	+	–	+	+	+
D-Arabitol	w	+	–	+	–	+	+	+
Utilization of								
Potassium nitrate	–	–	–	–	–	+	–	–
4 nitrophenyl beta D-galactopyranoside, dulcitol, L-lactic acid, alpha methyl D-galactonide, alpha D-lactose, lactulose	–	–	–	–	–	–	–	+
L-Aspartic acid	w	–	–	–	+	+	–	–
D-Alanine	–	–	–	–	–	+	–	+
L-Glutamic acid	w	+	+	–	+	–	–	–
D-Galactonic acid gamma lactone	–	–	–	–	–	+	–	–
Thymidine	w	–	+	–	–	–	+	+
L-Asparagine butyric	w	+	–	–	–	–	–	–
D-Glucosamine acid	w	+	+	+	+	+	–	–
Alpha keto acid	w	+	–	–	+	–	–	–
Uridine	+	+	+	–	–	–	+	–
L-Glutamine	–	+	–	–	–	–	–	+
Alpha hydroxy butyric acid	–	+	–	–	+	–	–	–
Beta methyl D-glucoside	w	+	+	+	–	+	+	+
Adonitol	–	–	–	–	+	–	–	+
Propionic acid	–	+	–	–	–	–	–	–
Inosine	w	+	+	–	–	+	+	–
L-Serine	w	–	+	–	–	–	–	–
L-Threonine, L-alanine, L-alanyl glycine	+	+	+	+	+	+	+	–
N acetyl beta D-mannosamine	–	–	+	+	–	+	–	–
Mono methyl succinate, methyl pyruvate	–	–	–	–	–	–	–	+
Glycyl L-proline	+	+	+	+	+	+	+	–
D hydroxy phenyl acetic acid	–	–	–	+	–	–	–	–
L-lyxose	–	–	–	–	–	–	–	+
Pyruvic acid	+	+	+	+	+	+	–	+
2 amino-ethanol	+	+	+	+	–	+	+	–
Antibiotic susceptibility[b]								
Nalidixic acid	S	S	S	S	S	S	S	R
Neomycin	R	R	R	R	R	R	R	I
Ciprofloxacin	v	v	S	S	v	R	R	v
Streptomycin	S	v	S	S	S	v	S	S
Penicillin G	v	v	R	S	S	v	S	I
Kanamycin	R	R	R	R	R	R	R	S
Vancomycin	v	v	R	S	S	v	S	I

[a] +: positive; –: negative and w: weakly positive.
[b] Results of antibiotic tests are indicated as follows: R: resistant (diameter of the inhibition zone: <13 mm for neomycin and streptomycin; <15 mm for nalidixic acid, polymycin B and kanamycin; <16 mm for gentamycin and ampicillin; <17 mm for erythromycin, tetracycline and vancomycin; <18 mm for penicillin G; <19 mm for rifampicin; <22 mm for cefuroxim and ciprofloxacin; <23 mm for chloramphenicol); S: sensitive (diameter of the inhibition zone: ≥14 mm for rifampicin; 15 mm for streptomycin and polymycin B; 17 mm for neomycin, kanamycin and vancomycin; 18 mm for gentamycin; 19 mm for tetracycline and ampicillin; 20 mm for nalidixic acid; 22 mm for cefuroxim, erythromycin; 23 mm for chloramphenicol; 25 mm for ciprofloxacin; 29 mm for penicillin G); I: intermediate; v: variable.

DNA–DNA hybridization data showed a high relatedness of 80.2–97.2% between the four new *Aminobacter* strains isolated from root-nodule of *A. vulneraria*, and lower values of 49.7–64.6% between these latter strains and *A. aminovorans* and *A. lissarensis* (Table 1). Taking into account recommendation of a threshold value of 70% DNA–DNA relatedness for the definition of a species [25], these results indicate that strains (STM4640-41, 4643, 4644-46, 4653, 6499) isolated from root nodule of *A. vulneraria* should be considered as a new species. One strain (STM6498) that shows a higher genetic distance (Fig. 1, S1-2) was not included in the new species and remains designated as *Aminobacter* sp.; a larger sampling containing closely related strains and further taxonomic characterization are needed to resolve its position.

Biochemical and physiological characteristics

The nine *Aminobacter* isolates and reference strains were examined for 164 phenotypic characteristics. All eight isolates of *Aminobacter* sp. nov. presented similar phenotypic properties and could be distinguished from *A. lissarensis* by several characters (substrate assimilation and antibiotic sensitivity) as summarized in Table 2. All isolates and references grew at 28 °C, 37 °C but not

at 42 °C and at pH range of 5–11 but not at pH 4.0 and 12.0. They also grew in YEM broth with 2% NaCl but not at 3% NaCl, except for STM4644, STM6498 and the *A. lissarensis* type strain that grew at 2 and 3% NaCl concentrations.

Analysis of nodA sequences

PCR amplification of *nod*A was successful for all *Aminobacter* isolates whereas *nod*C amplification was not possible in the conditions we used, except for the *M. metallidurans* STM2683^T. All the novel *Aminobacter* and *Mesorhizobium* isolates obtained from *Anthyllis* nodules displayed a *nod*A sequence falling into the cluster containing the *Mesorhizobium* biovar "loti" representatives and shared all together a high similarity of 92% well-supported by bootstrapping. Inside this biovar "loti" cluster, new isolates belonged to four closely related branches (98% identity) (Fig. 2). First, the five isolates (STM4640-41, 4643, 4645, 4653) with identical housekeeping genes, also carry an identical *nod*A gene, confirming their stronger genetic relatedness. The *nod*A of these five similar strains, groups also with that of STM6499 which is differentiated by *atp*D, *rec*A and *dna*K typing. Secondly, STM6498, 4646 and 4662 share an identical *nod*A fragment whereas they are distinguishable by each of the four core genome genes tested. The two last branches comprised a single strain each: *Aminobacter* STM4644 which also differed in *atp*D, *rec*A and *dna*K genes and *Mesorhizobium* STM4664 showing the same housekeeping background as STM4662. Thus the different gene groupings show that the *nod*A phylogeny is not in agreement with that of the housekeeping genes tested.

M. metallidurans STM2683^T surprisingly exhibited two distinct and complete copies of *nod*A sharing a 78.5% DNA identity (73.5% protein identity). One copy was closer to the *nod*A sequences (Fig. 2) of *M. australicum*^{T} (94% identity) and *M. ciceri* WSM1721 (95% identity), both isolated from *Biserrula pelecinus* [12,13] and the second copy was closer first to a *nod*A gene of *M. ciceri* WSM1721 (94% identity) and then to *M. ciceri*/*M. mediterraneum* (81% identity). The *M. metallidurans* type strain displays two divergent sequences of *nod*A genes compared to *nod*A of new *Aminobacter* sp. nov. and *Mesorhizobium* sp. isolates although all these bacterial members are efficient symbionts of the same host *A. vulneraria*.

Infectivity and fixation properties

Representative isolates of the *Aminobacter* sp. nov. were able to nodulate and fix nitrogen on the two subspecies of *A. vulneraria* (subsp *pyrenaica* and *carpatica*) (Table 3). Evidence of N_2-fixation was highly significant by measuring leaf chlorophyll contents on both subspecies. The inoculation effects on dry plant weights were significant only for STM4646 which appears to produce more nodules than the other *Aminobacter* sp. nov. isolates (significant on *pyreneica* subspecies). For the three other *Aminobacter* sp. nov. strains, although the plant weights were higher than the uninoculated control, only the root biomasses were significantly different for STM4643 and 4645 inoculated on subspecies carpatica. Indeed, the variability of the dry plant biomasses was high and this could be explained by natural genetic diversity of wild *A. vulneraria* seeds we collected. *A. lissarensis* and *A. aminovorans* type strains did not nodulate either *A. vulneraria* subspecies and had no effect on plants.

Discussion

We isolated novel strains able to nodulate and fix nitrogen with *A. vulneraria*, a legume of interest for soil vegetalisation in Mediterranean areas. Their characterization based on DNA–DNA relatedness, 16S rDNA, *rec*A, *atp*D and *dna*K sequence analyses and phenotypic tests, supported their classification in a new taxon, and

Table 3
Nodulation and nitrogen fixation parameters (means ± standard deviation (n = 10 plants)) on two *A. vulneraria* subspecies inoculated with *Aminobacter anthyllidis* isolates, reference strains and two nitrogen- or uninoculated controls.

Treatment	*A. vulneraria* subspecies carpatica				*A. vulneraria* subspecies pyreneica			
	Nodule numbers[a] (per plant)	Dry shoot biomass (mg)	Dry root biomass (mg)	Chlorophyll (SPAD units)	Nodule numbers (per plant)	Dry shoot biomass mg	Dry root biomass mg	Chlorophyll (SPAD units)
Aminobacter anthyllidis STM4641	**43.7 ± 19.0^{a,b}**	133 ± 35^{cd}	75 ± 22^{bc}	**53.6 ± 4.8^a**	**27.4 ± 20.3^a**	128 ± 47^c	24 ± 13^{bc}	**22.0 ± 3.5^a**
Aminobacter anthyllidis STM4643	**47.9 ± 16.2^a**	138 ± 43^{cd}	**79 ± 27^b**	**52.1 ± 5.1^a**	**30.3 ± 22.8^a**	131 ± 72^c	22 ± 17^b	**21.1 ± 4.6^a**
Aminobacter anthyllidis STM4645^T	**49.3 ± 16.3^a**	144 ± 41^c	**87 ± 23^b**	**52.3 ± 8.5^a**	**29.9 ± 26.7^a**	97 ± 52^c	21 ± 12^b	**20.5 ± 2.9^a**
Aminobacter anthyllidis STM 4646	**57.8 ± 39.5^a**	**235 ± 98^b**	**117 ± 44^a**	**56.5 ± 8.8^a**	**61.2 ± 35.7^b**	**282 ± 137^b**	**63 ± 35^a**	**30.2 ± 7.0^a**
A. lissarensis^T	0	81 ± 17^d	48 ± 12^c	36.6 ± 5.1^c	0	103 ± 29^c	15 ± 7^c	15.5 ± 3.6^c
A. aminovorans^T	0	91 ± 18^{cd}	50 ± 12^c	43.5 ± 7.1^{bc}	0	88 ± 32^c	12 ± 4^c	15.8 ± 1.2^b
Nitrogen control[b]	0	**291 ± 37^a**	**115 ± 22^a**	**53.1 ± 3.0^a**	0	**522 ± 118^a**	**93 ± 23^a**	**33.8 ± 2.5^a**
Uninoculated control	0	96 ± 17^{cd}	59 ± 12^{bc}	39.6 ± 6.2^{bc}	0	110 ± 52^c	15 ± 7^{bc}	16.1 ± 2.8^{bc}

[a] Means within rows followed by the same superscript letter are not significantly different (Newman and Keuls). Data in bold are significantly higher than the uninoculated control (p < 0.001).

[b] 2.5 or 5 mM of N-Ca$(NO3)_2$ were added for subsp. *carpatica* and *pyrenecia*, respectively.

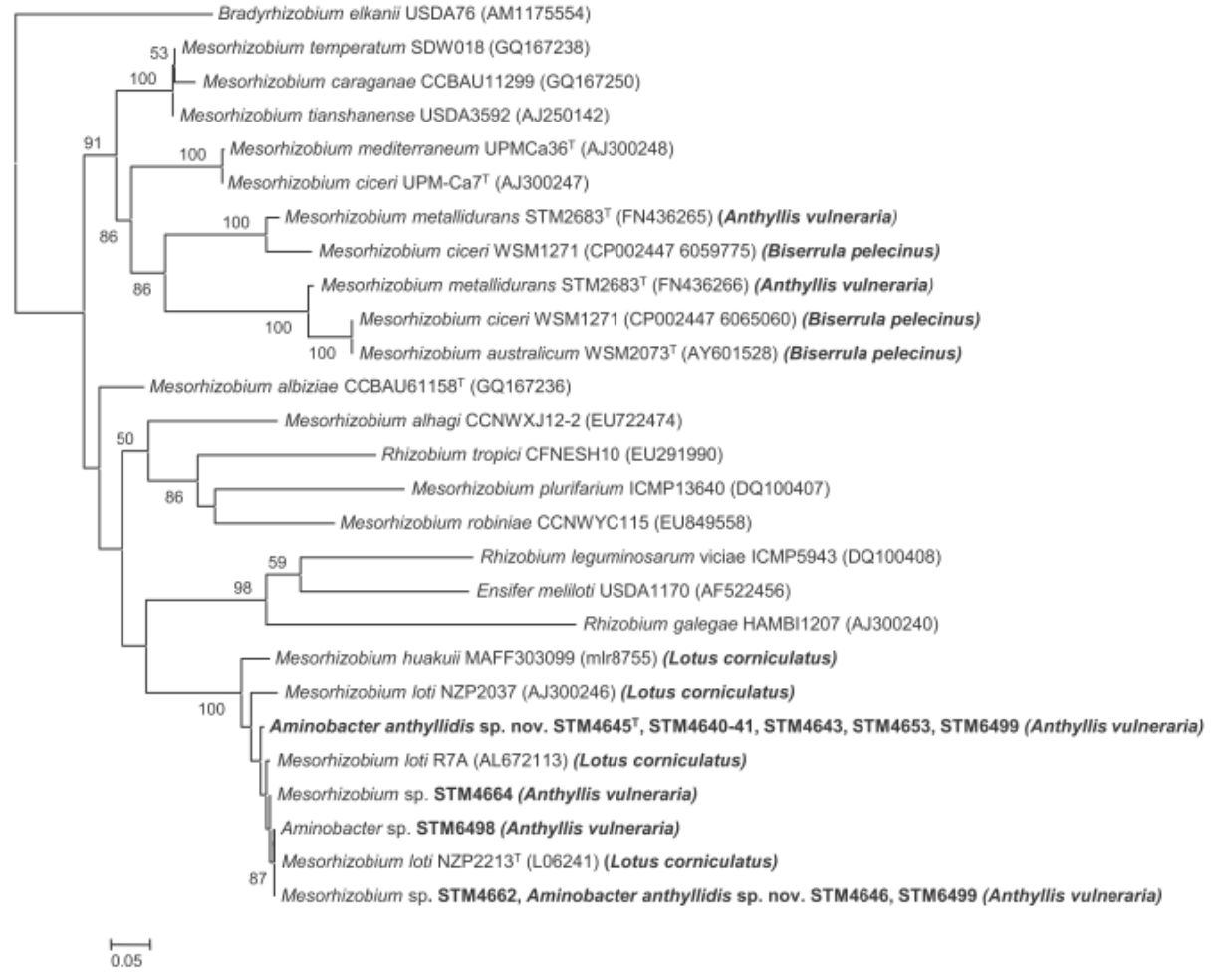


Fig. 2. Maximum-likelihood phylogenetic tree based on *nod*A gene sequences (435 nt) showing the relationships between *A. vulneraria* isolates obtained in this study, and reference strains. Genbank accession numbers are given beside the strain numbers and the significance of each branch is indicated by bootstrap value calculated for 500 subsets (above 50%) at the major branch-points. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per 100 nucleotides. New *Anthyllis vulneraria* nodule isolates are shown in bold.

the name of *Aminobacter anthyllidis* is proposed. This increases the number of genera among *Alphaproteobacteria*, containing species able to nodulate legumes to 11 (*Ensifer*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Methylobacterium*, *Azorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Shinella*, *Phyllobacterium*, *Devosia*, *Aminobacter*) and extends the number of genera and species containing nonrhizobial representatives. The genus *Aminobacter* contains potentially more bacterial species that may be symbionts of legumes such as *Lotus* [4] and *Anthyllis* (strain STM6498) which can be differentiated by their 16S DNA, *atp*D, *rec*A and *dna*K sequences from members of *A. anthyllidis*. Furthermore, we found two new *Mesorhizobium* sp. isolates close to *M. metallidurans* but different based on *rec*A and *atp*D analyses, and therefore they could belong to another new species of *Mesorhizobium*. Symbionts of *Anthyllis* will probably encompass more diversity than has been described so far.

The novel strains associated with *A. vulneraria* subsp. *pyreneica* and *carpatica*, were highly divergent from the ones we previously trapped on the same plant host (subspecies carpatica) and that belonged to *M. metallidurans* species [24]. *M. metallidurans* strains showed a higher resistance to Zn and Cd, compared to *Aminobacter* strains whose metal tolerance was moderate. The Avinières mine soil where *M. metallidurans* was found, is extremely enriched with toxic heavy metals [10] compared to the Eylie mine site (about 2.5× of EDTA-extractible Zn, 6× of extractible Pb and 1.4× of extractible Cd) and these particular conditions could explain the dominance of *M. metallidurans* at the settling basin of the Avinières mine. This hypothesis calls for more studies about the distribution of *Aminobacter* and *Mesorhizobium* populations along heavy metal concentration gradients.

A. lissarensis and *A. aminovorans* type strains revealed an intrinsic Zn and Cd tolerance similar to those of *A. anthyllidis* strains although they did not originate from a known metal-polluted environment. Yet, the genus *Aminobacter* contains species with particular metabolism allowing them to colonize anthropic terrestrial ecosystems containing toxic compounds such as pesticides [9,15,19], trichloroethylene [6] or arsenic [16]. Therefore members of *Aminobacter* species could have phenotypic characters allowing them to colonize mine tailing substratum.

A. anthyllidis and new *Mesorhizobium* sp. isolates from *A. vulneraria* all harbour a *nod*A gene typical of those of the biovar "loti" cluster. This is in agreement with recently found isolates originated from *A. vulneraria* nodules in Sweden, that were able to efficiently

nodulate *Lotus corniculatus* and that showed *nod*A sequences intermingled with reference strains of *Mesorhizobium* nodulating *Lotus* [1]. Previously mentioned plant test data confirmed that strains originated from *Anthyllis* and *Lotus* could belong to the same cross-inoculation group [7,14]. By contrast, the *nod*A copies of *M. metallidurans* symbiont of *Anthyllis* are divergent from the cluster of biovar "loti" revealing more diverse symbiotic genes that could reflect a different host-spectrum among particular *Anthyllis* symbionts. The *nod*A genes of *M. metallidurans* are similar to those to two *M. ciceri* and one *M. australicum* strains all nodulating *Biserrula pelecinus* a legume that phylogenetically belongs to the Galegeae tribe, close to the Loteae tribe containing *Anthyllis* and *Lotus*. The species *M. metallidurans* and *M. ciceri* biovar biserrulae could share the same hosts. In addition, these two latter species exhibits the rare trait to possess two complete copies of *nod*A, a unique feature among rhizobial species examined so far. The different *nod*A genes of *M. metallidurans* may have evolved to optimize the interaction with different host plants by offering diverse Nod factors or diverse flavonoid induction responses.

We show that *A. vulneraria* can establish an effective symbiosis with the new bacterial species *A. anthyllidis* in addition to *M. metallidurans* described earlier. Symbionts display diversity not only at the taxonomic level but also on accessory genes such as *nod* genes and for heavy-metal tolerance. This questions the adaptation of these different bacterial members with regard to *A. vulneraria* uses for vegetalisation in different mine environments.

Description of Aminobacter anthyllidis sp. nov.

Aminobacter anthyllidis (an.thyl'li.dis. L. n. anthyllis -idis, the name of a plant and also a scientific generic name (*Anthyllis*); L. gen. n. anthyllidis, of *Anthyllis*), referring to the symbiosis of bacterial strains of the species with the *Anthyllis vulneraria* legume.

Gram-negative, aerobic and non spore forming rods. Colonies appearing on YEM agar medium within 2–3 days of incubation (28 °C) are circular, opaque, convex, have creamy colour and usually a diameter of 2–3 mm. The maximum temperature for aerobic growth is 37 °C, no growth at 42 °C. The strains tolerate 2% NaCl and grow over a pH range of 5–11. Nodulate the legume *A. vulneraria* subsp. *carpatica* and subsp. *pyrenaica*. Tolerate 1–2 mM of Zn and 0.3–1 mM of Cd in YEM broth after one week. More phenotypic characteristics based on substrate assimilation and antibiotic sensitivity are summarized in Table 2. The G + C content of the genomic DNA is 62.6–63.0 mol%. The type strain is STM4645^T (=LMG26462^T=CFBP7437^T) isolated from Zn–Pb mine (Eylie, France) after trapping with *A. vulneraria* subspecies *pyrenaica*.

Acknowledgements

This work was partly supported by ADEME and the ANR (CES-APTITUDE) from the French Government. G.M., received a Ph-D grant from the Ministère de la Recherche et de l'Education Nationale. We thank Liesbeth Lebbe for excellent technical assistance and Pr. J.P. Euzéby (http://www.bacterio.cict.fr) for bacterial nomenclature. We thank G. Delmot for providing seeds.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.syapm.2011.11.002.

References

[1] Ampomah, O.Y., Huss-Danell, K. (2011) Genetic diversity of root nodule bacteria nodulating *Lotus corniculatus* and *Anthyllis vulneraria* in Sweden. Syst. Appl. Microbiol., doi:10.1016/j.syapm.2011.01.006.

[2] Andrews, J.M. (2001) Determination of minimum inhibitory concentrations. J. Antimicrob. Chemother. 48, 5–16.

[3] Chen, W., Kuo, T. (1993) A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. Nucleic Acids Res. 21, 2260.

[4] Estrella, M.J., Munoz, S., Soto, M.J., Ruiz, O., Sanjuán, J. (2009) Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). Appl. Environ. Microbiol. 75, 1088–1098.

[5] Frérot, H., Lefèbvre, C., Gruber, W., Collin, C., Dos Santos, A., Escarré, J. (2006) Specific interactions between local metallicolous plants improve the phytostabilization of mine soils. Plant Soil 282, 53–65.

[6] Futamata, H., Nagano, Y., Watanabe, K., Hiraishi, A. (2005) Unique kinetic properties of phenol-degrading variovorax strains responsible for efficient trichloroethylene degradation in a chemostat enrichment culture. Appl. Environ. Microbiol. 71, 904–911.

[7] Jarvis, B.D.W., Pankhurst, C.E., Patel, J.J. (1982) *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 32, 378–380.

[8] Jarvis, B.D.W., Van Berkum, P., Chen, W.X., Nour, S.M., Fernandez, M.P., Cleyet-Marel, J.C., Gillis, M. (1997) Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 895–898.

[9] MacDonald, I.R., Kampfer, P., Topp, E., Warner, K.L., Cox, M.J., Hancock, T.L.C., Miller, L.G., Larkin, M.J., Ducrocq, V., Coulter, C., Harper, D.B., Murrell, J.C., Oremland, R.S. (2005) *Aminobacter ciceronei* sp. nov. and *Aminobacter lissarensis* sp. nov., isolated from various terrestrial environments. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 1827–1832.

[10] Mahieu, S., Frérot, H., Vidal, C., Galiana, A., Heulin, K., Maure, L., Brunel, B., Lefèbvre, C., Escarré, J., Cleyet-Marel, J.-C. (2011) *Anthyllis vulneraria/Mesorhizobium metallidurans*, an efficient symbiotic nitrogen fixing association able to grow in mine tailings highly contaminated by Zn, Pb and Cd. Plant Soil 342 (40), 5–417.

[11] Mesbah, M., Premachandran, U., Whitman, W.B. (1989) Precise measurement of the G-C content of deoxyribonucleic acid by high performance liquid chromatography. Int. J. Syst. Bacteriol. 39, 159–167.

[12] Nandasena, K.G., O'Hara, G.W., Tiwari, R.P., Willems, A., Howieson, J.G. (2007) *Mesorhizobium ciceri* biovar biserrulae, a novel biovar nodulating the pasture legume *Biserrula pelecinus* L. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57, 1041–1045.

[13] Nandasena, K.G., O'Hara, G.W., Tiwari, R.P., Willems, A., Howieson, J.G. (2009) *Mesorhizobium australicum* sp. nov. and *Mesorhizobium opportunistum* sp. nov., isolated from *Biserrula pelecinus* L. in Australia. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59, 2140–2147.

[14] Novikova, N., Pavlova, E.A., Limeshchenko, E.V. (1993) Phage sensitivity and host range of *Rhizobium* strains isolated from root nodules of temperate legumes. Plant Soil 1, 45–53.

[15] Osborn, R.K, Haydock, P.P.J., Edwards, S.G. (2010) Isolation and identification of oxamyl-degrading bacteria from UK agricultural soils. Soil Biol. Biochem. 42, 998–1000.

[16] Quemeneur, M., Heinrich-Salmeron, A., Muller, D., Lievremont, D., Jauzein, M., Bertin, P.N., Garrido, F., Joulian, C. (2008) Diversity surveys and evolutionary relationships of *aoxB* genes in aerobic arsenite-oxidizing bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 74, 4567–4573.

[17] Requena, N., Perez-Solis, E., Azcón-Aguilar, C., Jeffries, P., Barea, J.M. (2001) Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified. Appl. Environ. Microbiol. 67, 495–498.

[18] Sheoran, V., Sheoran, A.S., Poonia, P. (2010) Soil reclamation of abandoned mine land by revegetation: a review. Int. J. Soil Sediment. Water 3 (2), Art. 13 ISSN: 1940-3259.

[19] Sjoholm, O.R., Aamand, J., Sorensen, J., Nybroe, O. (2010) Degrader density determines spatial variability of 2,6-dichlorobenzamide mineralisation in soil. Environ. Pollut. 158, 292–298.

[20] Stepkowski, T., Hughes, C.E., Law, I.J., Markiewicz, L., Gurda, D., Chlebicka, A., Moulin, L. (2007) Diversification of lupin *Bradyrhizobium* strains: evidence from nodulation gene trees. Appl. Environ. Microbiol. 73, 3254–3264.

[21] Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4. 0. Mol. Biol. Evol. 24, 1596–1599.

[22] Turnau, K., Ostachowicz, B., Wojtczak, G., Anielska, T., Sobczyk, L. (2010) Metal uptake by xerothermic plants introduced into Zn–Pb industrial wastes. Plant Soil 337, 299–311.

[23] Urakami, T., Araki, H., Oyanagi, H., Suzuki, K. -I., Komagata, K. (1992) Transfer of *Pseudomonas aminovorans* (den Dooren de Jong 1926) to *Aminobacter* gen. nov. as *Aminobacter aminovorans* comb. nov. and description of *Aminobacter aganoensis* sp. nov. and *Aminobacter niigataensis* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 42, 84–92.

[24] Vidal, C., Chantreuil, C., Berge, O., Maure, L., Escarre, J., Bena, G., Brunel, B., Cleyet-Marel, J.-C. (2009) *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metallicolous soil in Languedoc, France. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59, 850–855.

[25] Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P., Trüper, H.G. (1987) Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. Int. J. Syst. Bacteriol. 37, 463–464.

[26] Willems, A., Doignon-Bourcier, F., Goris, J., Coopman, R., de Lajudie, P., De Vos, P., Gillis, M. (2001) DNA–DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 1315–1322.

Annexe 3

Local Adaptation of Metallicolous and Non-Metallicolous *Anthyllis vulneraria* Populations: Their Utilization in Soil Restoration

Restoration Ecology
THE JOURNAL OF THE SOCIETY FOR ECOLOGICAL RESTORATION INTERNATIONAL

RESEARCH ARTICLE

Local Adaptation of Metallicolous and Non-Metallicolous *Anthyllis vulneraria* Populations: Their Utilization in Soil Restoration

Stéphanie Mahieu,[1,2] Souhir Soussou,[3] Jean-Claude Cleyet-Marel,[3] Brigitte Brunel,[4] Lucette Mauré,[3] Claude Lefèbvre,[5] and José Escarré[1]

Abstract

Restoration of metalliferous mine soils requires using plant species tolerant to high metal concentrations and adapted to nutrient-poor soil. Legumes can increase plant productivity through N_2-fixation, but they are often scarce in metalliferous sites. We examined survival, growth, and tolerance of four populations of a legume, *Anthyllis vulneraria*, from two metalliferous (MET) Zn-Pb mine sites, Avinières (AV) ([Zn-EDTA] = 26,000 mg/kg) and Eylie (EY) ([Zn-EDTA] = 4,632 mg/kg), and two non-metalliferous (NMET) sites located in the south of France with the aim to select the most appropriate populations for restoration of mined soils. In a common garden experiment, plants from each population were reciprocally grown in soil from the provenance of each population. The two NMET populations exhibited high mortality and low growth rates in soil from the mined sites. The AV MET exhibited a high growth rate in metalliferous soils, but showed high mortality in non-metalliferous soils. The growth of the EY MET was very low in the AV-contaminated soil, but was the highest of all populations in moderately and non-metalliferous soils. Plants from the AV MET population showed a high growth and survival in metalliferous soil and would be appropriate in the restoration of metal-contaminated sites (>30,000 mg Zn kg^{-1}). The EY MET population would be adapted to the restoration of moderate metal-contaminated soils (<30,000 mg Zn kg^{-1}). Taking into account the broad distribution of *A. vulneraria*, these two populations could be suitable for the restoration of derelict mine sites in mediterranean and temperate regions of Europe and North America.

Key words: legumes, metal-tolerant species, mine tailings, phytostabilization.

Introduction

Soils rich in naturally occurring heavy metals—such as ultramaphic soils—and those contaminated with metals due to human activity—such as mining—can be extremely toxic to animals and plants (Shaw 1990). Phytostabilization is an effective and non-intrusive technology that involves the use of metal-tolerant plants to reduce erosion and dispersal of toxic elements from contaminated soil into the environment (Salt et al. 1998). Because major nutrients (N, P, and K) are frequently in short supply in mine soils (Bradshaw & Chadwick 1980), legumes are used to increase the soil fertility and plant productivity through N_2 fixation (Vitousek and Field 1999).

A general guideline in ecological restoration is to use local species (McKay et al. 2005) because they are assumed to be locally adapted (Leimu & Fischer 2008; Bischoff et al. 2010). However, only a few species within local floras are tolerant enough to colonize metal-contaminated mined sites (Antonovics et al. 1971). Furthermore, legume species are very rare in contaminated soils because metals are often toxic to symbiotic rhizobia (Chaudri et al. 2008). Therefore, using non-local legume species may be needed to phytostabilize and increase the fertility of mine soils.

The symbiotic association between the legume *Anthyllis vulneraria* L. and a new species of rhizobia (*Mesorhizobium metallidurans*) on an abandoned mine at Saint Laurent le Minier (southern France), tolerant of the high soil metal concentrations of Zn, Pb, and Cd (Vidal et al. 2009), has been used for the phytostabilization of mine tailings (Frérot et al. 2006). Mahieu et al. (2011) demonstrated that 80% of total N in *A. vulneraria* originated from atmospheric N_2. This species accumulated Zn in aerial parts (Escarré et al. 2011), which can be toxic to herbivorous animals. Nevertheless, Zn from leaves returning to the soil at plant senescence is negligible in comparison to high soil concentrations. This monocarpic species dies after flowering and releases around 400 kg/ha^{-1}

[1]CEFE, UMR CNRS 5175, Route de Mende 1919, F-34293, Montpellier Cedex 05, France
[2]Address correspondence to S. Mahieu, email stephanie.mahieu@cefe.cnrs.fr
[3]INRA, USC1242, LSTM, Campus International de Baillarguet, F-34398, Montpellier, France
[4]Montpellier SupAgro, LSTM, UMR 113, F-34398, Montpellier, France
[5]Laboratoire d'Ecologie végétale et de Biogéochimie, Université Libre de Bruxelles, Campus de la plaine, C5, CP244, Boulevard du Triomphe, B-1050, Bruxelles, Belgium

© 2012 Society for Ecological Restoration
doi: 10.1111/j.1526-100X.2012.00927.x

of N into the soil through rhizodeposition and decomposition of senesced tissue after 2 years growth (Mahieu unpublished data).

There are other *A. vulneraria* populations on non-metalliferous soils in the region around the two mine sites. If metal tolerance is present in some of these populations, they could potentially be used for phytoremediation of metalliferous land. The species is predominantly selfing and easy to multiply because protandrous flowers prevent cross fertilization. Conservation of these metal-tolerant populations is imperative (Whiting et al. 2004), but it is also essential to investigate the ability of *A. vulneraria* populations to survive and grow under conditions other than those of their native environment.

We performed a reciprocal transplant experiment with four geographically distinct populations of *A. vulneraria* (two metallicolous and two non-metallicolous) to evaluate their survival and growth in metalliferous and in non-metalliferous soils, and to test whether non-metallicolous populations have a constitutive tolerance to metal-contamination. Each population was cultivated in its soil and in the soils of each of the other three populations. Since *A. vulneraria* is a Zn accumulator, the metal concentrations in the above and belowground parts of plants were measured. Given the large distances between the populations and for logistical and ethical reasons, we conducted research under controlled conditions following the "explant" approach (Kawecki & Ebert 2004).

Methods

Anthyllis vulneraria L. is a rosette-forming legume of 15–30 cm height with 24 subspecies in Europa (Tutin et al. 1964–1993). Although predominantly selfing, allogamy is possible because of a low proportion of male sterile individuals (Couderc 1971). The species is present in Europe, Asia, North Africa, and naturalized in North America. *A. vulneraria* prefers the calcareous grasslands and rocky environments, but also grows in metalliferous soils.

Two non-metallicolous (NMET) and metallicolous (MET) populations of *A. vulneraria* were used in the experiment. The first non-metallicolous *A. vulneraria* population belongs to the subspecies *vulneraria* and was collected near St. Chély (SC) on the Causse Mejean (03°23′51″E; 44°18′20″N), a limestone plateau in southern France situated at an altitude of 800–1,250 m. The climate was temperate, with a mean annual rainfall of 920 mm (Meteo France, 1986–2005). Soils were sandy on dolomite bedrock (Cadillon 1970). The second non-metallicolous population belongs to subspecies *praepropera* and was collected near Col du Vent (CV) on the Causse du Larzac plateau (03°27′57″E; 43°45′53″N), an outcrop situated at an altitude of 560–920 m on the southern margin of the Massif Central. Soils were derived from dolomitic bedrock (Cadillon 1970) and the climate has both oceanic and Mediterranean influences, with annual precipitation between 710 and 1730 mm (Meteo France, 1988–2005).

The two metallicolous populations of *A. vulneraria* originated from metal-contaminated soils as a result of old mining activities. The first one belongs to subspecies *carpatica* and was collected from the Avinières (AV) mine, which was abandoned at the beginning of the 20th century. The mine site

Table 1. Chemical characteristics and total and pseudo-total EDTA-extracted concentrations (mg/kg) of Zn, Pb, and Cd determined on the fine earth fraction (<2 mm) of the studied soils.

	Metalliferous soils			*Non-metalliferous soils*	
	Avinières 90[a]	*Eylie 100*[b]	*Eylie 90*[a]	*Col du Vent*	*St. Chély*
pH_{water}	8.2	8	8.5	8.4	8.4
Organic matter status (g/kg)					
Organic matter	33.5	8.6	9.1	53.3	53.5
N total	0.6	0.4	0.7	2.7	2.2
C/N	31.0	17.2	22.1	11.5	14.1
Extractable metal (mg/kg)					
Cd-EDTA	430	16	n.d.	1	4
Pb-EDTA	49,000	4,158	n.d.	20	106
Zn-EDTA	26,000	4,632	4,667	59	114
Total metal concentrations (mg/kg)					
Cd	1,210	51	50	1	4
Pb	34,212	10,014	9,566	59	106
Zn	173,263	6,490	6,236	233	585

n.d., not determined.
[a]10% compost and 90% mine soil.
[b]100% mine soil.

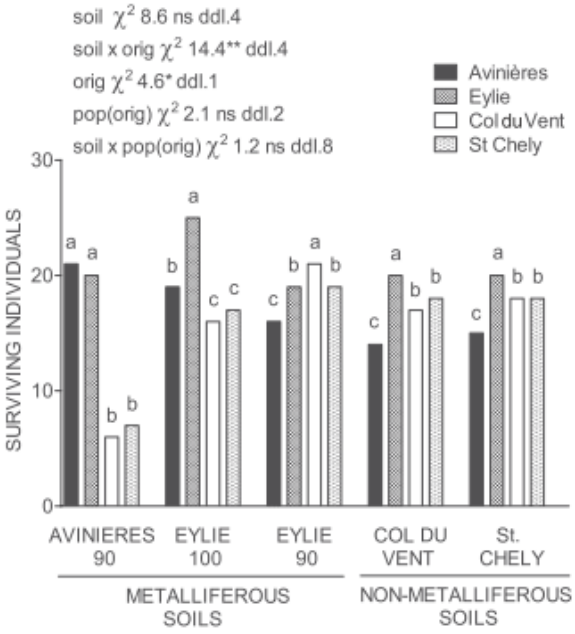


Figure 1. Survival (%) of *Anthyllis vulneraria* individuals from four populations originating in metalliferous soils from Avinières and Eylie, France and non-metalliferous soils from Col du Vent and Saint Chély, France. "Avinières 90" and "Eylie 90" were a mixed 10% compost and 90% mine soil; "Eylie 100" was 100% mine soil. Significant differences ($\alpha = 0.05$) within each of the five soil treatments were denoted by the use of different lowercase letters ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; ns, not significant; *df*, degrees of freedom).

was located at Saint Laurent le Minier, 40 km north-west of Montpellier (03°39′39″E; 43°55′57″N). The population was comprised of greater than 1,000 individuals, but the species was not present in the other mine sites of the region (J. Escarré 2011, CEFE, UMR CNRS 5175, Montpellier, France, personal observation). Average annual rainfall was of 1,504 mm (Meteo France, 1971–2000), with maximum occurring in spring and autumn and minimum occurring in summer. The mine spoil from AV was dominated by dolomitic rock. Soil was collected from the 0–15 cm depth from the tailing ponds located below the mine spoils along the Vis River valley.

The second metallicolous population belongs to subspecies *boscii*. This population was collected from the clay-rich mine waste heaps abandoned since 50 years at Eylie (EY), 95 km south-west of Toulouse (00°56′14″E; 42°50′08″N). Average annual rainfall was 1,027 mm (Meteo France, 1971–2000), evenly distributed throughout the year. Population size is less than 1,000 individuals (J. Escarré 2011, CEFE, UMR CNRS 5175, Montpellier, France, personal observation).

Soil chemical characteristics are given in Table 1.

Soils from all four sites were collected near patches of *A. vulneraria* transported to the laboratory, dried, and sieved (2-mm mesh). Seeds were germinated on moisturized paper in Petri dishes. At the cotyledon stage, seedlings were transferred to vermiculite before being transplanted individually into 2-L containers filled with the soils from the four provenances (two metalliferous and two non-metalliferous). Because the AV soil was extremely toxic and devoid of nutrients, a mixture of 10% compost and 90% toxic soil (AV90) was used.

Soil toxicity of the EY was unknown so two mixtures were tested: (1) 10% compost and 90% mine soil (EY90) and (2) 100% EY mine soil (EY100). Twenty-five plants

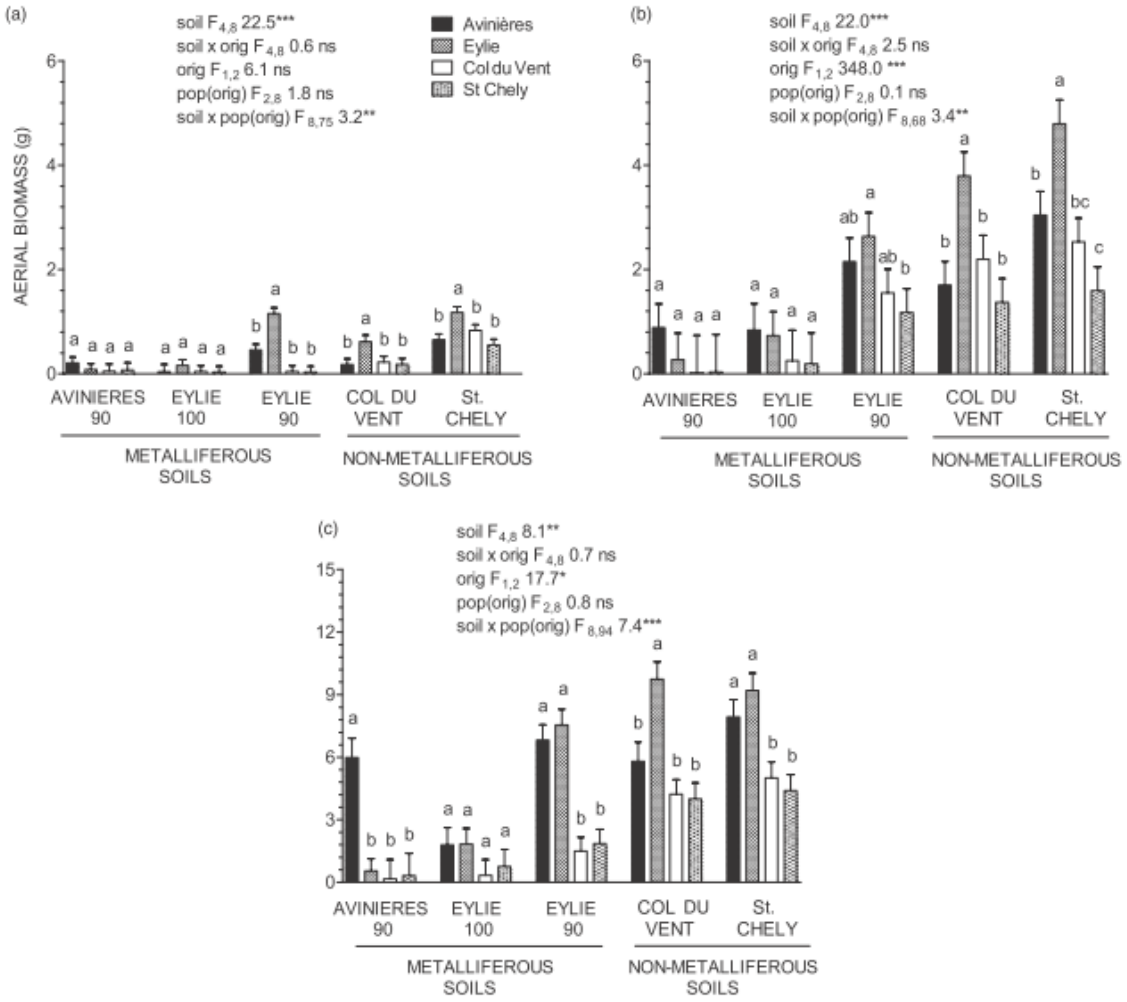


Figure 2. Aerial biomass (mean ± SE) of four populations of *Anthyllis vulneraria* grown in five different soils collected at (a) 130, (b) 170, and (c) 268 days. "Avinières 90" and "Eylie 90" were a mixed 10% compost and 90% mine soil; "Eylie 100" was 100% mine soil. Significant differences ($\alpha = 0.05$) within each of the five treatments were denoted by the use of different lowercase letters (***$p < 0.001$; **$p < 0.01$; *$p < 0.05$).

per population and soil origin combination (five soils × four populations) were tested. Pots were randomized in a non-heated greenhouse and watered with deionized water. Plants that died during the first 2 weeks were replaced.

Three to five plants per treatment (depending of the NMET mortality in toxic soils) and population were harvested after 130 (young plants), 170 (adult rosettes), and 268 days, at which point the experiment was stopped due to the death of non-metallicolous plants in toxic soils. Plant material was separated into aerial parts and roots. Aerial biomass was rinsed in deionized water and roots were washed with a solution of $CaCl_2$ 0.5 mmol/L^{-1} at 4°C for 20 min (Papoyan et al. 2007). After being dried at 60°C for 3 days, plant matter was weighed and Zn concentrations of aerial and subterranean parts were determined by the zincon method (Macnair & Smirnoff 1999) based on UV-visible spectrophotometry (HELIOS spectrophotometer, Thermo Spectronic, Cambridge, England) using zincon as colored Zn-chelating agent. Dead plants were collected and analyzed in the same manner as living plants.

Statistical Analyses

Plant biomass and Zn content were analyzed using nested analysis of variance (ANOVA), with a logarithmic transformation of data to respect the normality assumption if necessary using the software program SAS (2004). Because of complex interactions among dates, soils, populations, and provenances appeared in the analyses (data not shown), we analyzed the data by each of the three dates using nested

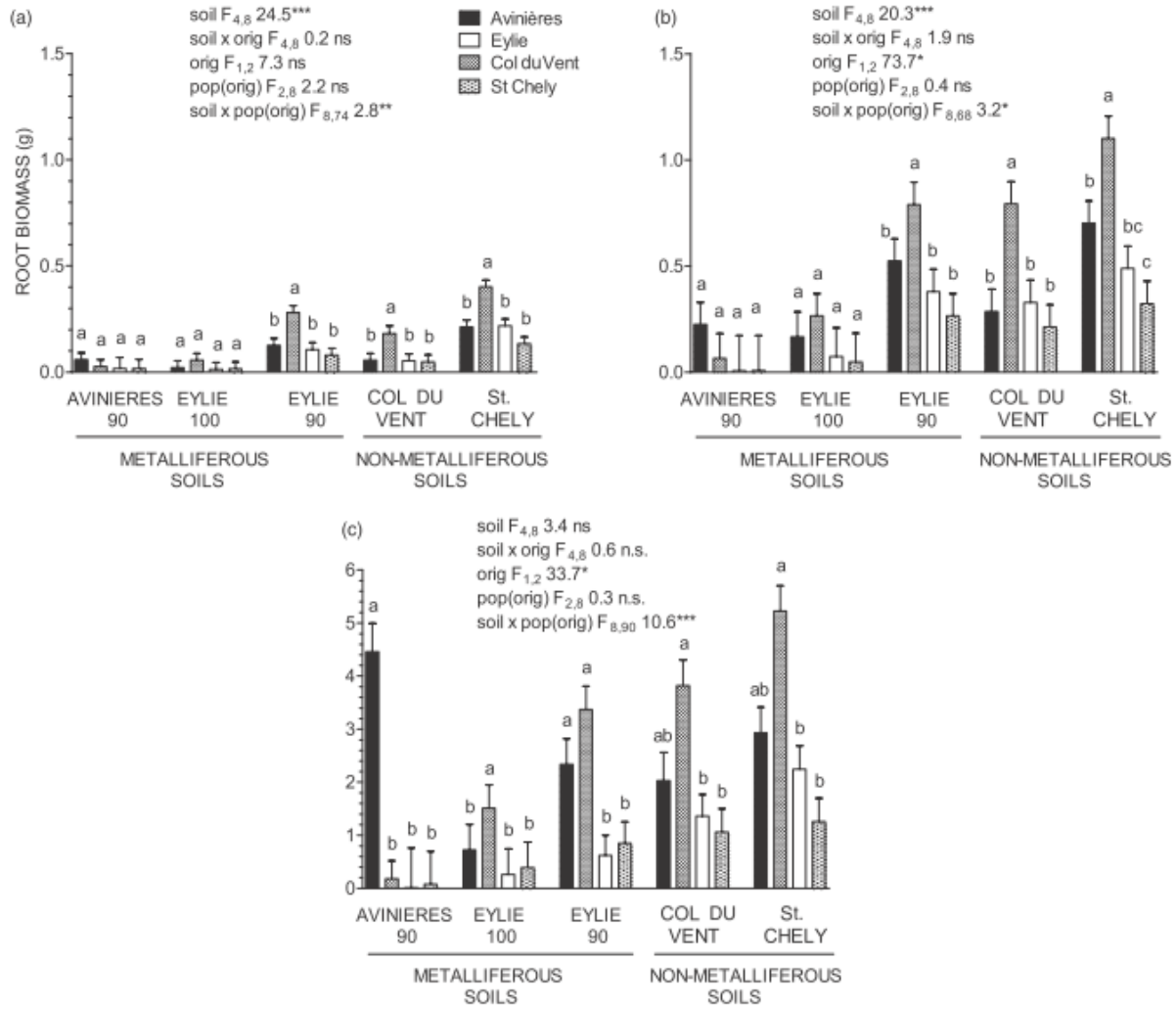


Figure 3. Root biomass (mean ± SE) of four populations of *Anthyllis vulneraria* grown in five different soils collected at (a) 130, (b) 170, and (c) 268 days. "Avinières 90" and "Eylie 90" were a mixed 10% compost and 90% mine soil; "Eylie 100" was 100% mine soil. Significant differences at the 5% level within each of the five treatments were denoted by the use of different lowercase letters (***$p < 0.001$; **$p < 0.01$; *$p < 0.05$. ns, not significant).

ANOVA with the following factors such as soil (five levels), population provenance (MET or NMET), and populations (four levels) nested within the provenance. All factors were considered fixed with the exception of population, which was random. Type III sums of squares were used to estimate F-statistics and degrees of freedom were calculated according to Satterthwaite's approximation. Means were compared with least-squares means tests in SAS (2004). Survival data were analyzed using the GENMOD (SAS 2004) procedure followed by a proportion test for each soil.

Results

Survival rates were significantly different among provenances, near significant ($\chi^2 = 8.6$, $df = 4$, $p < 0.10$) for soil and highly significant for soil × provenance (Fig. 1). Therefore, we analyzed survival differences for each soil. Survival of NMET populations was lower (24–28%) in AV90 relative to the MET populations (80–84%). The EY population had no mortality in its native soil (EY100) and its survival rate was significantly higher than the other populations. Mortality of NMET populations in EY100 soil was less (64–68%) than the mortality on AV90 soil. There were no significant mortality differences among the four populations in both non-metalliferous and EY90 soils. Finally, fewer AV individuals survived in the two non-metalliferous (CV and SC) than in the two most metal-contaminated soils (AV90 & EY100) [58% vs 80%; Fisher Exact test p = 0.03].

Non-metalliferous populations displayed low growth in metalliferous soils, although plant biomass increased between

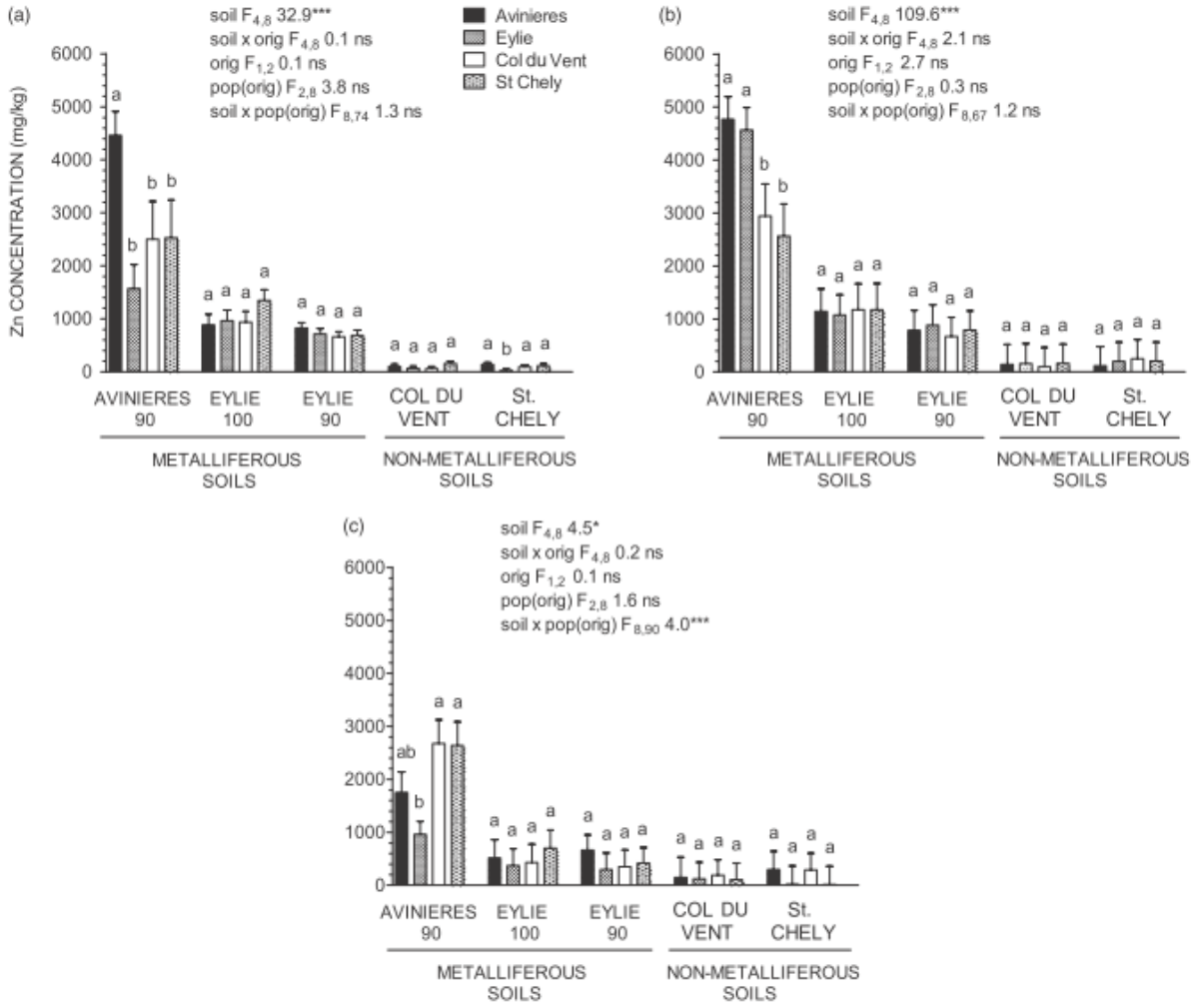


Figure 4. Zinc concentration (mean ± SE) in the shoots of four populations of *Anthyllis vulneraria* grown in five different soils collected at (a) 130, (b) 170, and (c) 268 days. "Avinières 90" and "Eylie 90" were a mixed 10% compost and 90% mine soil; "Eylie 100" was 100% mine soil. Significant differences at the 5% level within each of the five treatments were denoted by the use of different lowercase letters (***$p < 0.001$; **$p < 0.01$; *$p < 0.05$. ns, not significant).

the first and second harvest (Fig. 2a & 2b), but not between the second and third harvest (Fig. 2b & 2c). AV individuals exhibited significantly higher growth at the time of the third harvest compared with that of EY individuals when grown in the former's original (i.e. AV90) soil (Fig. 2c). This difference did not occur in EY100 and EY90 soils where biomass values of the two populations were similar and significantly higher than those of the NMET populations particularly in the third harvest (Fig. 2c). In the two non-metalliferous soils, the EY population had the highest and the NMET populations the lowest biomass values.

The AV population had the highest root biomass in its home soil (Fig. 3b & 3c), whereas the root biomass of the EY population was the greatest in the three less toxic soils (EY90, CV, and SC) and in the EY100 soil at the third harvest (Fig. 3c). The CV and SC populations exhibited the lowest values in their respective soils of provenance (Fig. 3).

Zn aerial concentrations were highest in plants grown in AV90 soil, varying from 1,000 to 5,000 mg Zn kg^{-1} according to the plant subspecies, and were relatively low in the others soils ($\leq$1,000 mg Zn kg^{-1}), including the two from EY (Fig. 4a & 4b). The two MET populations exhibited the highest aerial tissue Zn concentrations at the second harvest, but at the third harvest Zn concentrations had dropped below 2,000 mg kg^{-1}. In contrast, aerial tissue Zn concentrations of NMET populations remained stable at around 2,500 mg kg^{-1} (Fig. 4).

Aerial Zn concentrations in dead plants grown in AV90 soil were extremely high, except for AV (Fig. 5); the latter were characterized by Zn concentrations similar to those of living individuals grown in the same soil (Fig. 4). Dead plants of the three other populations showed high Zn values, with a maximum of 25,000 mg/kg observed in SC individuals. Aerial tissue Zn concentrations of individuals grown in the other soils were similar, although NMET individuals tended to show higher values in the EY100 soil (Fig. 5).

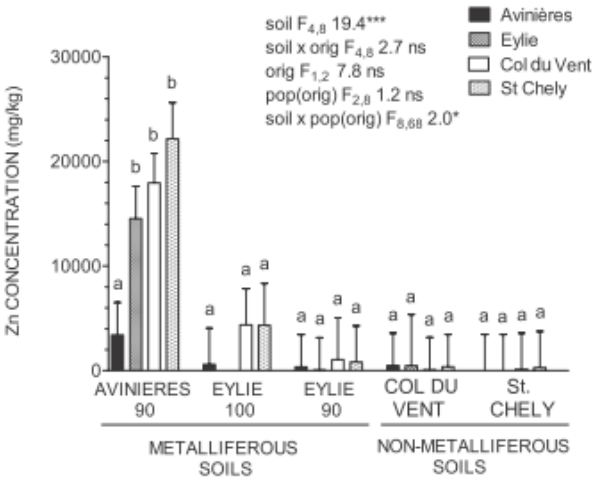


Figure 5. Zinc concentration (mean $\pm$ SE) in the shoots of dead individuals of four populations of *Anthyllis vulneraria* grown in five different soils. "Avinières 90" and "Eylie 90" were a mixed 10% compost and 90% mine soil; "Eylie 100" was 100% mine soil. Significant differences at the 5% level within each of the five treatments were denoted by the use of different lowercase letters (***$p < 0.001$; **$p < 0.01$; *$p < 0.05$. ns, not significant).

Root Zn concentrations increased over time in plants grown in metalliferous soils (Fig. 6) but remained low in those grown in non-metalliferous soils. There were no differences in Zn concentration among populations for the two first harvests but concentrations in AV plants and those from SC grown in AV90 soil were significantly higher at the third harvest (Fig. 6).

Discussion

High soil metal contamination can exert strong selection in plant populations, which can maintain a local adaptation despite substantial gene flow (Antonovics & Bradshaw 1970). This selection is expected to enhance plant performances in response to local environmental conditions, but may generate trade-offs between tolerance to metals and survival or growth of metallicolous populations in non-metalliferous soils (Antonovics et al. 1971). We found strong differentiation in metal tolerance among subspecies from different provenances, which was related to metal concentration in their native soils. The non-metallicolous populations exhibited a high mortality and low growth rates when grown in soil from the AV mine, with the observed mortality rate due to an excessive accumulation of Zn in plant aerial tissues. The soil from EY and the two (AV90 and EY90) soils improved with 10% compost, remained less fertile than the non-metalliferous soils. Non-metallicolous individuals exhibited lower biomass than those originating from mine soils when grown in non-metalliferous soils. This absence of reciprocal local adaptation was unexpected for a short-lived and mostly self-pollinating species, which are generally thought to be more differentiated compared to those of long-lived species (Linhart & Grant 1996). However, Leimu and Fischer (2008) reported that in experiments investigating reciprocal local adaptation, results in which local populations outperform alien ones in their environment of provenance are less frequent (45.3%) than those in which the alien grows more effectively in both environments (51.4%).

Our results did not validate the hypothesis that metabolic trade-offs would occur between growth in favorable conditions and tolerance to environmental constraints (here metals) (Liancourt & Tielborger 2009). No growth trade-offs were found in either the non-metallicolous EY or (to a lesser extent) AV populations that exhibited similar or higher growth in non-metalliferous than metalliferous soils, suggesting no apparent metabolic cost of plant tolerance at the expense of plant growth. This phenomenon has been explained in *Arabidopsis halleri* by Sarret et al. (2002), who showed that the concentration of organic acids involved in the storage of Zn in the leaf, increased with the concentration of metals in the soil, suggesting that the carbon invested in metal tolerance is available for the plant growth in non-metalliferous soil. However, we showed survival trade-offs in the AV population, which exhibited high mortality in non-metalliferous and in mine soil from

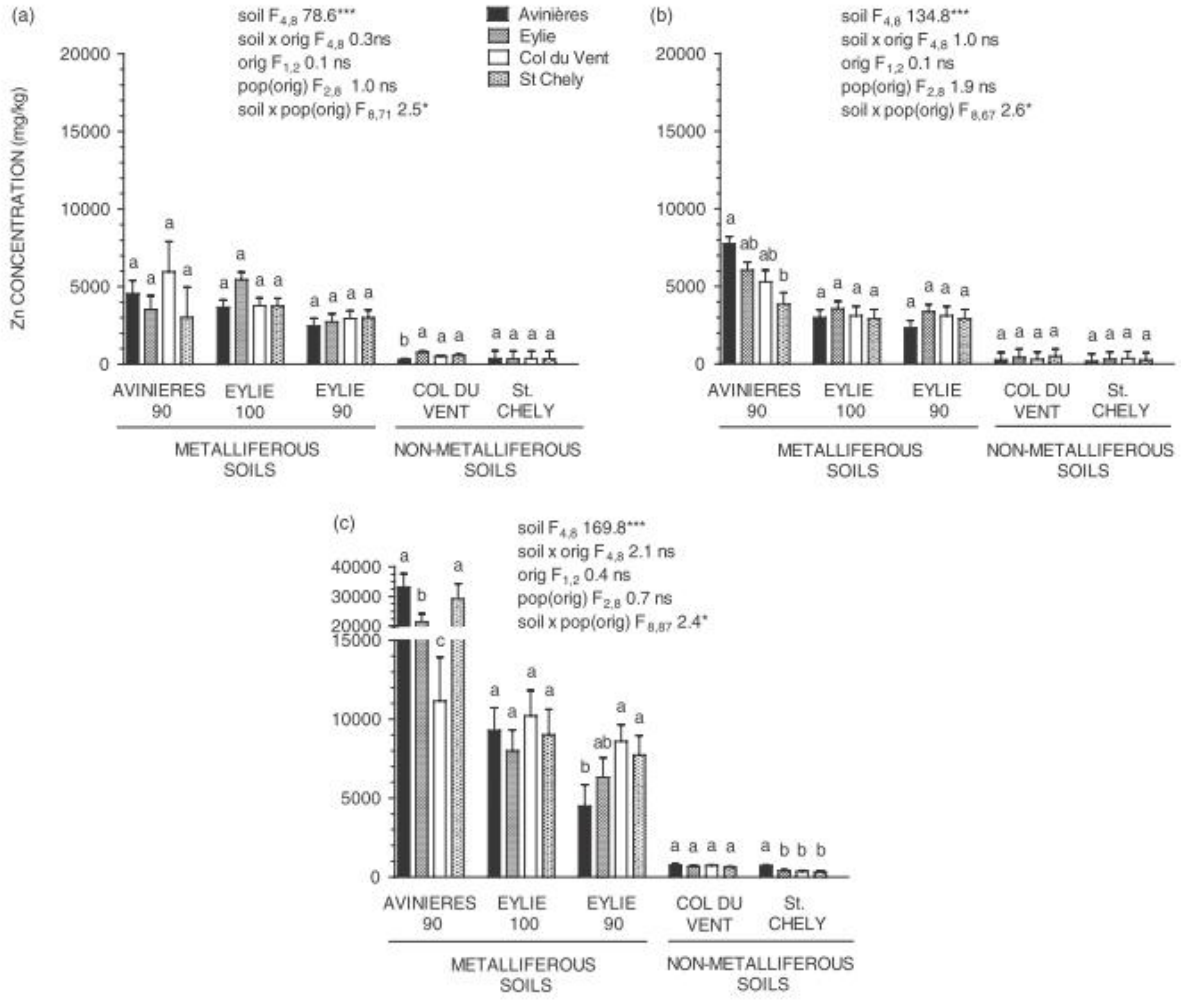


Figure 6. Zinc concentration (mean ± SE) in the roots of four populations of *Anthyllis vulneraria* grown in five different soils collected at (a) 130, (b) 170, and (c) 268 days. "Avinières 90" and "Eylie 90" were a mixed 10% compost and 90% mine soil; "Eylie 100" was 100% mine soil. Significant differences at the 5% level within each of the five treatments were denoted by the use of different lowercase letters (***$p < 0.001$; **$p < 0.01$; *$p < 0.05$. ns, not significant).

EY amended with 10% compost; dead plants had low shoot Zn concentrations, suggesting a potential benefit of metal uptake. Most of these plants showed symptoms of pathogen attack that was not present in plants growing in AV soils, which suggests that metals are involved in plant antifungal response, as observed in *A. halleri* and *Thlaspi caerulescens* (Talke et al. 2006; Van de Mortel et al. 2008). Analysis of binary feeding choices in *Anthyllis vulneraria* has shown metallicolous individuals in non-contaminated soils were consumed by gastropods more often than those of non-metalliferous populations ($t = 2.5$ $p = 0.02$, $n = 20$; J. Escarré unpublished data). If local adaptation to soil heavy metal content is a property of metallicolous populations such as that of AV, plants in non-metalliferous environments could be selectively infected and consumed by pathogens and herbivores, respectively.

In metal-contaminated soils, a restricted number of species called hyperaccumulators are able to accumulate large quantities (>10,000 mg/kg) of metals such as Zn in their aerial parts (Baker & Walker 1990). In this study, we showed that metallicolous *A. vulneraria* was not a Zn hyperaccumulator species because the measured Zn concentrations in aerial tissues were below the hyperaccumulation threshold. We observed high variability in Zn concentration among individuals of the metallicolous EY population and the non-metallicolous populations when grown in the AV soil amended with 10% compost: (1) dead individuals with shoot Zn concentrations above 10,000 mg/kg and (2) living individuals with shoot Zn concentrations below 5,000 mg/kg. Mortality in the metallicolous EY and the non-metallicolous populations occurred suddenly, with leaves changing from green to yellow in few

days followed by senescence and dead, probably due to an excessive accumulation of Zn in their aerial tissues. Molitor et al. (2005) also found a 2-fold variation range in Zn accumulation in a single population of *T. caerulescens*, which is suggestive of substantial genetic variation in terms of plant Zn accumulation. This suggests that tolerance and hyperaccumulation are negatively correlated both in *T. caerulescens* and in the metallicolous *A. vulneraria* population from EY and in the two non-metallicolous populations.

To our knowledge, this is one of the first studies to demonstrate a genetically based adaptation of a legume to an extreme heavy metal-contaminated soil and provides strong evidence for an adaptive response of the two metallicolous populations to their local soil. In addition, an essential feature of these two populations is their uniqueness because legumes are very rare in environments with metalliferous soils. These characteristics should therefore be taken into account for their conservation. These results have important implications for the restoration of contaminated sites because soils are deficient in nutrients and plants from *Fabaceae* family can increase the nitrogen content of soil and facilitate the colonization by other plant species (Frérot et al. 2006; Mahieu et al. 2011). Taking into account the broad global distribution of *A. vulneraria*, the two metallicolous subspecies could be used for the restoration of mine sites in mediterranean and temperate regions of Europe and North America.

Implications for Practice

- Individuals of the *Anthyllis vulneraria* subspecies *carpatica*, from the Avinières mine, have high tolerance to metals, and would be suitable for restoration of sites with high metal contamination ($>30{,}000\,mg\,Zn\,kg^{-1}$).
- The subspecies *boscii*, from Eylie would be better adapted to restoration of moderately contaminated soils ($<30{,}000\,mg\,Zn\ kg^{-1}$), which is probably the most common condition prior to restoration.
- The subspecies *vulneraria* and *praeopera*, from non-metalliferous soils were not tolerant to metals and not suitable for the restoration of mine soils.

Acknowledgments

The authors thank Guy Delmot for his kind hospitality. We also thank Christian Collin, Frédéric Tanguy, and Jérémy Devaux for their technical assistance. This research was fully supported by the "SyMetal" ANR contract.

LITERATURE CITED

Antonovics, J., and A. D. Bradshaw. 1970. Evolution in closely adjacent plant populations 8. Clinical patterns at a mine boundary. Heredity **25:**349–362.

Antonovics, J., A. D. Bradshaw, and R. G. Turner. 1971. Heavy metal tolerance in plants. Advances in Ecological Research **7:**1–85.

Baker, A. J. M., and P. L. Walker. 1990. Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. Pages 155–177 in A. J. Shaw, editor. Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Bischoff, A., T. Steinger, and H. Müller-Schärer. 2010. The importance of plant provenance and genotypic diversity of seed material used for ecological restoration. Restoration Ecology **18:**338–348.

Bradshaw, A. D., and M. J. Chadwick. 1980. The restoration of land. Blackwell Scientific Publications, University of California Press, Berkeley.

Cadillon, M. 1970. Les sols du Causse du Larzac. Ph.D. University of Montpellier, Montpellier, France.

Chaudri, A., S. McGrath, P. Gibbs, B. Chambers, C. Carlton Smith, J. Bacon, C. Campbell, and M. Aitken. 2008. Population size of indigenous Rhizobium leguminosarum biovar trifolii in long-term field experiments with sewage sludge cake, metal-amended liquid sludge or metal salts: effects of zinc, copper and cadmium. Soil Biology and Biochemistry **40:**1670–1680.

Couderc, H. 1971. Etude expérimentale de la reproduction d'Anthyllis vulneraria L. Bulletin Société Botanique de France **118:**359–374.

Escarré, J., C. Lefèbvre, S. Raboyeau, A. Dossantos, W. Gruber, J. C. Cleyet-Marel, et al. 2011. Heavy metal concentration survey in soils and plants of the Les Malines Mining District (Southern France): implications for soil restoration. Water, Air, and Soil Pollution **216:**485–504.

Frérot, H., C. Lefèbvre, W. Gruber, C. Collin, A. Dos Santos, and J. Escarré. 2006. Specific interactions between local metallicolous plants improve the phytostabilization of mine soils. Plant and Soil **282:**53–65.

Kawecki, T. J., and D. Ebert. 2004. Conceptual issues in local adaptation. Ecology Letters **7:**1225–1241.

Leimu, R., and M. Fischer. 2008. A meta-analysis of local adaptation in plants. PLoS One **3:**e4010.

Liancourt, P., and K. Tielborger. 2009. Competition and a short growing season lead to ecotypic differentiation at the two extremes of the ecological range. Functional Ecology **23:**397–404.

Linhart, Y. B., and M. C. Grant. 1996. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. Annual Review of Ecology and Systematics **27:**237–277.

Macnair, M. R., and N. Smirnoff. 1999. Use of zincon to study uptake and accumulation of zinc by zinc tolerant and hyperaccumulating plants. Communications in Soil Science and Plant Analysis **30:**1127–1136.

Mahieu, S., H. Frérot, C. Vidal, A. Galiana, K. Heulin, L. Maure, B. Brunel, C. Lefèbvre, J. Escarré, and J. C. Cleyet-Marel. 2011. Anthyllis vulneraria/Mesorhizobium metallidurans, an efficient symbiotic nitrogen fixing association able to grow in mine tailings highly contaminated by Zn, Pb and Cd. Plant and Soil **342:**405–417.

McKay, J. K., C. E. Christian, S. Harrison, and K. J. Rice. 2005. "How local is local?"-a review of practical and conceptual issues in the genetics of restoration. Restoration Ecology **13:**432–440.

Molitor, M., C. Dechamps, W. Gruber, and P. Meerts. 2005. Thlaspi caerulescens on nonmetalliferous soil in Luxembourg: ecological niche and genetic variation in mineral element composition. The New Phytologist **165:**503–512.

Papoyan, A., M. Pineros, and L. V. Kochian. 2007. Plant Cd2+ and Zn2+ status effects on root and shoot heavy metal accumulation in Thlaspi caerulescens. The New Phytologist **175:**51–58.

Salt, D. E., R. D. Smith, and I. Raskin. 1998. Phytoremediation. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **49:**643–668.

Sarret, G., P. Saumitou Laprade, V. Bert, O. Proux, J. L. Hazemann, A. S. Traverse, M. A. Marcus, and A. Manceau. 2002. Forms of zinc accumulated in the hyperaccumulator Arabidopsis halleri. Plant Physiology **130:**1815–1826.

SAS. 2004. SAS-STAT® 9.1 user's guide. SAS Institute Inc, Cary, North Carolina.

Shaw, A. J., editor. 1990. Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.

Talke, I., M. Hanikenne, and U. Krämer. 2006. Zinc dependent global transcriptional control, transcriptional de-regulation and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator Arabidopsis halleri. Plant Physiology **142:**148–167.

Tutin, T. G., N. A. Burges, A. O. Chater, J. R. Edmondson, V. H. Heywood, D. M. Moore, D. H. Valentine, S. M. Walters, and D. A. Webb. 1964–1993. Flora Europaea. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Van de Mortel, J., H. Schat, P. Moerland, E. Ver Loren van Themaat, S. van der Ent, H. Blankestijn, A. Ghandilyan, S. Tsiatsiani, and M. Aarts. 2008. Expression differences for genes involved in lignin, glutathione and sulphate metabolism in response to cadmium in Arabidopsis thaliana and the related Zn/Cd-hyperaccumulator Thlaspi caerulescens. Plant, Cell & Environment **31:**301–324.

Vidal, C., C. Chantreuil, O. Berge, L. Mauré, J. Escarré, G. Béna, B. Brunel, and J.-C. Cleyet-Marel. 2009. *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a novel metal-resistant symbiont of Anthyllis vulneraria growing on metallicolous soil in Languedoc, France. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **59:**850–855.

Vitousek, P. M., and C. B. Field. 1999. Ecosystem constraints to symbiotic nitrogen fixers: a simple model and its implications. Biogeochemistry **46:**179–202.

Whiting, S. N., R. D. Reeves, D. Richards, M. S. Johnson, J. A. Cooke, F. Malaisse, et al. 2004. Research priorities for conservation of metallophyte biodiversity and their potential for restoration and site remediation. Restoration Ecology **12:**106–116.

Annexe 4

Composition du milieu Yeast Extract Mannitol (YEM); Milieu de culture pour rhizobium

Produit	Quantité pour un litre de milieu
Extrait de Levure	0,4 g
Solution minérale de Bergensen 10X	100 ml
Mannitol	10 g
Gélose (Agar-Agar)	15 g
Solution Minérale de Bergensen (10X)	
KCl	1g
$FeCl_3$	0,02g (ou 0,2 ml liquide)
$CaCl_2$, $2H_2O$	0,53 g
Na_2HPO_4, $12H_2O$	4,5g
$MgSO_4$, $7H_2O$	1 g

Ajuster le pH à 6,8.

Autoclaver 20 min. à 120°C.

Adaptation de la symbiose Fabacées-rhizobium aux sites miniers : Absorption du zinc par *Anthyllis vulneraria* et analyse de la diversité des bactéries symbiotiques d'*Hedysarum coronarium*

Résumé : Les fortes teneurs en éléments traces métalliques (ETMs) présents dans les déblais miniers entraînent généralement une forte réduction de la diversité végétale et microbienne. Selon les caractéristiques physico-chimiques des sols, la nature des métaux, leur concentration et leur spéciation, seules certaines espèces végétales et microbiennes ont développé des mécanismes particuliers et se sont adaptées à la présence d'ETMs. C'est le cas d'*Anthyllis vulneraria* et d'*Hedysarum coronarium*, deux Fabacées qui sont présentes sur d'anciennes mines de Zn/ Pb respectivement au sud de la France et au nord de la Tunisie. L'étude de l'absorption du Zn chez quatre sous-espèces d'*A. vulneraria* a montré que seule la sous-espèce *carpatica* présente sur l'ancienne mine Zn/Pb des Avinières, peut croître en présence de teneurs élevées en Zn et accumule des quantités élevées de ce métal sans montrer de symptômes de toxicité. Les données obtenues ont révélé qu'*A. vulneraria* sous espèce *carpatica* est une plante hypertolérante et accumulatrice de Zn. L'inoculation d'*A. vulneraria* avec ses bactéries symbiotiques fixatrices d'azote, *Mesorhizobium metallidurans* STM2683 (souche métallicole) et *Mesorhizobium* sp. STM2682 (souche non métallicole), a induit une diminution très significative de la teneur en Zn dans la plante. Par contre, seule la souche métallicole a montré un effet protecteur vis-à-vis des sous espèces sensibles d'*A. vulneraria* lorsque celles-ci sont exposées à une concentration modérée en Zn. La diversité phylogénétique et phénotypique des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote associées à *H. coronarium* isolées du substrat de l'ancienne mine de Zn/Pb de Fej El Hdoum et du sol d'une parcelle agricole à El Krib a mis en évidence (i) l'appartenance de tous les isolats étudiés au genre *Rhizobium*, (ii) l'existence de différents niveaux de tolérance au Cd et l'absence de tolérance au Zn pour les isolats issus du substrat de Fej El Hdoum (iii) le lien étroit entre la présence de la plante hôte, *H. coronarium* et de sa bactérie symbiotique fixatrice d'azote sur un site donné. Ainsi, compte tenu des contraintes imposées par la présence des ETMs, l'utilisation de Fabacées en première séquence de végétation pour favoriser l'entrée d'azote et faciliter l'installation d'une couverture végétale stable et pérenne à même de phytostabliser les déblais miniers, rend indispensable la sélection des associations les mieux adaptées aux conditions environnementales locales.

Mots clés : *Anthyllis vulneraria*, zinc, absorption, *Hedysarum coronarium*, *Rhizobium*, diversité, adaptation, phytostabilisation, sites miniers.

Fabaceae-rhizobium symbiosis adaptation to mine sites: Zinc absorption by *Anthyllis vulneraria* and diversity analysis of *Hedysarum coronarium* symbiotic bacteria

Abstract: High contents of trace metals present in waste rock mining causes a significant reduction in plant and microbial diversity. According to soil physico-chemical characteristics, metal nature, concentration and speciation, only some plant and strain species have developed specific mechanisms to cope with trace metal toxicity. This is the case of *Anthyllis vulneraria* and *Hedysarum coronarium*, two *Fabaceae* that are present on Zn / Pb ancient mines respectively in southern France and northern Tunisia. The Zn absorption study in four subspecies of *A. vulneraria* showed that only the *carpatica* subspecies, present on the Zn / Pb ancient mine of Les Avinières, can grow with high Zn concentrations and accumulate high levels of this metal without showing toxicity symptoms. Thus, *A. vulneraria* subsp. *carpatica* should be considered as a Zn-hypertolerant and accumulator plant. Inoculation of *A. vulneraria* with a nitrogen-fixing symbiotic bacterium, *Mesorhizobium metallidurans* STM2683 (metallicolous strain) or *Mesorhizobium* sp. STM2682 (non- metallicolous strain), induced a significant decrease of Zn content in the plant. However, only the metallicolous strain showed a protective effect for sensitive *A. vulneraria* subspecies when symbiotic plants were exposed to a moderate Zn concentration. Phenotypic and phylogenetic diversity of nitrogen-fixing symbiotic bacteria associated with *H. coronarium* isolated from the Zn / Pb ancient mine of Fej El Hdoum and an agricultural parcel of El Krib highlighted (i) that all studied isolates belong to the genus of *Rhizobium*, (ii) the existence of different Cd tolerance levels and the absence of Zn tolerance for isolates from the Fej El Hdoum substrate (iii) the close link between the presence of the host plant, *H. coronarium* and their symbiotic nitrogen-fixing bacteria on a given site. Thus, given the constraints imposed by heavy metals, the use of *Fabaceae* in a first sequence of vegetation to promote nitrogen entrance and facilitate the installation of a sustainable plant cover able to phytostabilise waste rock mining, necessitates the selection of the best adapted associations to local environmental conditions.

Keywords: *Anthyllis vulneraria*, zinc absorption, *Hedysarum coronarium*, *Rhizobium*, diversity, adaptation, phytostabilisation, mining sites.