



HAL
open science

Rapport final du projet METDEP: La biosorption comme outil de dépollution des effluents chargés en éléments traces métalliques.

Valérie Burtet-Sarramegna, Linda Guentas, Pauline Bonaventure, Clarisse Majorel, Alexandre Bourles

► To cite this version:

Valérie Burtet-Sarramegna, Linda Guentas, Pauline Bonaventure, Clarisse Majorel, Alexandre Bourles. Rapport final du projet METDEP: La biosorption comme outil de dépollution des effluents chargés en éléments traces métalliques.. Université de la Nouvelle-Calédonie. 2025. <hal-05508165>

HAL Id: hal-05508165

<https://hal.science/hal-05508165v1>

Submitted on 12 Feb 2026

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons CC BY-NC-SA 4.0 - Attribution - Non-commercial use - ShareAlike - International License

Rapport Scientifique

2025

PROGRAMME METDEP

RAPPORT FINAL PROJET METDEP : LA BIOSORPTION COMME OUTIL DE DEPOLLUTION DES EFFLUENTS CHARGES EN ELEMENTS TRACES METALLIQUES



Étude réalisée dans le cadre des programmes de recherche financés par le CNRT « Nickel & son environnement »

CNRT
NICKEL
& son environnement



« METDEP : LA BIOSORPTION COMME OUTIL DE DÉPOLLUTION DES EFFLUENTS CHARGES EN ÉLÉMENTS TRACES MÉTALLIQUES »

Rapport Final

Juin 2025

Ouvrage collectif coordonné par Valérie BURTET-SARRAMEGNA (Université de la Nouvelle-Calédonie (UNC) – Institut des Sciences Exactes et Appliquées)

Pour le consortium UNC– IRD -IPNC - IFREMER

AUTEURS :

Valérie BURTET-SARRAMEGNA (UNC)

Linda GUENTAS (UNC)

Pauline BONAVENTURE (UNC)

Clarisse MAJOREL (IRD)

Alexandre BOURLES (IPNC)

RÉVISION DU DOCUMENT

Réf.	CSF n° 4PS20-CNRT.UNC/METDEP			
Version	Date	Rédacteur(s)	Qualité du rédacteur(s)	Révision pour CNRT
V1	13/06/2025	Valérie BURTET (UNC), Linda GUENTAS (UNC) & Pauline BONAVENTURE (UNC)	Coordinatrice, Co- coordinatrice du programme ; Doctorante	Médéric SUON (Manager des programmes)

CITATION DU DOCUMENT

Mots clés : Microorganismes ; halophytes, éléments traces métalliques ; bioremédiation ; phytoremédiation ; PGP ; EPS ; biofilms

En bibliographie, ce rapport sera cité de la façon suivante :

Valérie Burtet-Sarramegna, Linda Guentas, Clarisse Majorel, Alexandre Bourles et Pauline Bonaventure (2025) – *Rapport Programme* « METDEP : La biosorption comme outil de dépollution des effluents chargés en éléments traces métalliques ». CNRT "Nickel & son environnement". 86 pages.

TABLE DES MATIÈRES

1. CONTEXTE ET POSITIONNEMENT DU PROJET	8
1.1. CONTEXTUALISATION DE LA PROBLÉMATIQUE POSÉE ET ORGANISATION GLOBALE DU PROJET	8
1.2. LE CONTEXTE NÉOCALÉDONIEN (EN BREF) – REDACTEUR : P. BONAVENTURE	13
1.2.1. <i>Origine et répercussions des contaminations aux ETMs issus des sédiments miniers en Nouvelle-Calédonie</i>	14
1.2.2. <i>Répercussions environnementales de l'activité minière : toxicité potentielle des flux issus de la mine</i>	16
1.3. STRATÉGIES POTENTIELLES DE TRAITEMENT DES ZONES CÔTIÈRES DE NOUVELLE-CALÉDONIE POUR LUTTER OU PREVENIR LES CONTAMINATIONS MÉTALLIQUES (RÉDACTEUR : P. BONAVENTURE).....	21
1.3.1. <i>Contraintes biologiques des ETMs chez les plantes</i>	21
1.3.2. <i>La phytoremédiation</i>	23
2. REVUE DE LA LITTÉRATURE (TACHE 3) : CAPACITÉ DE SORPTION MÉTALLIQUE DE SUBSTRATS INERTES VÉGÉTAUX EN ASSOCIATION AVEC LES MICROORGANISMES SOUS FORME DE BIOFILM LES PLUS INTÉRESSANTS OU LEURS BIOMOLÉCULES (EPS).	34
3. DONNÉES PRELIMINAIRES : SITES D'ETUDES	34
3.1. DÉMARCHE SCIENTIFIQUE : ANALYSES PRÉLIMINAIRES – DONNÉES NON PUBLIÉES.....	34
4. TACHE 1. ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DES MICROORGANISMES CULTIVABLES RÉSISTANTS AU SEL ET AUX ETM À PARTIR D'ESPÈCES HALOPHYTES DES SOLS DE TANNES DE NOUVELLE-CALÉDONIE	37
4.1. INTRODUCTION.....	37
4.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	38
4.2.1. <i>Isolement des microorganismes à partir des racines (Tâche 1.a)</i>	38
4.2.2. <i>Résistance multi-métaux des isolats bactériens et fongiques (Tâche 1.b)</i>	39
4.2.3. <i>Résistance au NaCl (Tâche 1.b)</i>	40
4.2.4. <i>Tests biochimiques des effets PGP in vitro</i>	40
4.2.5. <i>Identification moléculaire des isolats bactériens et fongiques sélectionnés</i>	41
4.2.6. <i>Identification des bactéries par MALDI-TOF</i>	41
4.2.7. <i>Test de production d'exopolysaccharides (EPS)</i>	41
4.2.8. <i>Tests de production de Biofilms</i>	41
4.2.9. <i>Descriptions morphologiques</i>	42
4.3. RESULTATS ET DISCUSSION	43
4.3.1. <i>Bactéries</i>	43
4.3.2. <i>AMF</i>	45
4.3.3. <i>Champignons endophytes</i>	46
4.4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	48
5. TACHE 2. CAPACITÉS DE SORPTION MÉTALLIQUE DES DIFFÉRENTS TYPES DE MICROORGANISMES ET/OU BIOMASSES PRODUITES (TACHE 1C ET TACHE 2 DU PROJET METDEP)	50
5.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES	50
5.1.1. <i>Capacité à produire des EPS</i>	50
5.1.2. <i>capacité à produire du biofilm</i>	51
5.1.3. <i>Détermination de la température</i>	51
5.1.4. <i>Détermination du pH et de la concentration optimale en NaCl</i>	51
5.1.5. <i>Antibiorésistances</i>	51
5.1.6. <i>galerie API</i>	51
5.1.7. <i>Tests de bioaccumulation et de biosorption (adsorption)</i>	51

5.2. RÉSULTATS ET DISCUSSION	52
5.2. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	57
6. ETUDES DES COMMUNAUTES MICROBIENNES TOTALES ASSOCIEES AUX PLANTES HALOPHILES DES TANNES DE NOUVELLE-CALEDONIE PAR DES APPROCHES DE METAGÉNÉTIQUE CIBLÉE (TACHE 4).....	59
7. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GENERALES DU PROJET METDEP.....	61

LISTES DES TABLEAUX ET FIGURES

Note : Les Figures et Tableaux ont été numérotés par chapitre. Ainsi, toutes les Figures se rapportant au Chapitre 1 portent le Numéro 1.x et ainsi de suite.

CHAPITRE 1.

Figure 1.1 : Schéma de l'organisation initiale générale du projet METDEP.

Figure 1.2 : Schéma de l'organisation finale générale du projet METDEP (décidée en septembre 2023).

Figure 1.3 : Processus d'altération des roches ultramafiques en Nouvelle-Calédonie et répartition du Ni, Co, Cr, Mn, Fe, Al et des oxydes de Mg et Si.

Figure 1.4 : Impact de l'érosion et du ruissellement sur les zones en aval.

Figure 1.5 : L'activité minière en Nouvelle-Calédonie : un avantage économique aux dépens de l'environnement.

Figure 1.6 : Facteurs amplifiant le phénomène d'érosion au sein des bassins versants en Nouvelle-Calédonie et répercussions pour les écosystèmes côtiers

Figure 1.7 : Sources anthropogéniques de contaminations aux ETMs dans les zones côtières

Figure 1.8 : Pressions s'exerçant sur les milieux côtiers en Nouvelle-Calédonie

Figure 1.9 : Représentation résumée des effets toxiques des ETMs chez les plantes

Figure 1.10 : Différentes approches de phytoremédiation.

Figure 1.11 : Habitats des milieux côtiers de la Nouvelle-Calédonie.

Figure 1.12 : Les tannes en Nouvelle-Calédonie.

Figure 1.13 : Biodiversité des espèces halophytes sur 92 sites échantillonnés

Figure 1.14 : Répartition géographique des trois principales halophytes de la côte Ouest : *Sarcocornia quinqueflora*, *Suaeda australis*, *Sesuvium portulacastrum*

Figure 1.15 : Sites de l'échantillonnage de 2018 localisés sur l'estuaire de la baie de St Vincent, La Tontouta.

Figure 1.16 : Quelques effets promoteurs de la croissance des plantes chez divers groupes de microorganismes en présence d'une salinité élevée.

CHAPITRE 2.

Ce chapitre sera rédigé sous forme d'une revue, les figures correspondantes seront présentées dans la publication.

CHAPITRE 3.

Figure 3.1 : Localisation et sensibilité à l'érosion des bassins versants de la Baie de St Vincent.

Figure 3.2 : Sites d'étude pour la caractérisation des sols et de l'accumulation des ETMs par les plantes à l'état naturel.

Tableau 3.1 : Moyennes et écartypes des concentrations des ETM (extraits au DTPA et totaux, mg.kg⁻¹) présents dans le sol d'un tanne non impacté (tanne témoin) et d'un tanne impacté par les apports sédimentaires miniers (tanne rouge), en présence ou non des plantes.

Tableau 3.2 : Moyennes des concentrations totales (mg.kg⁻¹) en Co, Cr, Mn et Ni dans les parties aériennes et racinaires de *Sesuvium portulacastrum*, *Sporobolus virginicus*, *Sarcocornia quinqueflora* et *Suaeda australis* sur le tanne rouge, contaminé aux ETMs.

Tableau 3.3 : Conductivité électrique mesurée selon la norme ISO 11265:1994 des sols échantillonnés sur le tanne de la Baie des Cochons, La Tontouta (Novembre 2019)

CHAPITRE 4.

Figure 4.1: Guide d'appréciation du pourcentage global de mycorhization

Figure 4.2 : Critères de descriptions morphologiques des colonies bactériennes.

Figure 4.3 : Schéma de la stratégie générale employée pour les sélections bactériennes.

Figure 4.4: Champignons septés observés dans les racines de (A) et (B), coloré au bleu Trypan (x400).

Tableau 4.1: Concentrations en Ni, Co, Cr et Mn des milieux gélosés pour l'évaluation de la résistance aux ETMs des isolats microbiens.

Tableau 4.2 : Nombre de bactéries cultivables en présence de 40 mg.L⁻¹ de Ni isolées à partir des racines de A, B et C.

Tableau 4.3 : Souches bactériennes cultivables isolées à partir des racines de A et B : identification, résistance aux ETM et tests PGP

Tableau 4.4 : Fréquence et intensité de colonisation des racines fines de A et B par un champignon bleu septé et un champignon brun septé.

Tableau 4.5 : Souches fongiques cultivables isolées à partir des racines de A et B identification, résistance aux ETMs et tests PGP.

CHAPITRE 5.

Tableau 5.1: Tableau récapitulatif des identifications, tests PGP, résistances salines, métalliques, antibiotiques, croissance à différents pH et températures des souches sélectionnées.

Tableau 5.2 : Tests de Biosorption et/ou de bioaccumulation des ETM par les 8 souches de *bactéries* B1 à B8.

Tableau 5.3 : Biosorption versus bioaccumulation : répartition observée des ETM.

CHAPITRE 6.

Ce chapitre sera rédigé sous forme d'une publication scientifique, les figures correspondantes seront présentées dans ce cadre.

LISTE DES SIGLES & ABREVIATIONS

CNRT	Centre National de Recherche Technologique
EPS	Exopolysaccharides
ETM	Eléments Traces métalliques
IFREMER	Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer
IPNC	Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie
IRD	Institut de Recherche pour le Développement
ISEA	Institut des Sciences Exactes et Appliquées
MES	Matières En Suspension
MO	Microorganismes
NC	Nouvelle-Calédonie
PGP	Plant Growth Promoting
UNC	Université de la Nouvelle-Calédonie

RESUME DU PROJET

Certaines espèces végétales vivent et se développent dans des environnements particulièrement hostiles et peu propices à la vie. Pour faire face aux stress environnementaux auxquels elles sont exposées, ces espèces végétales ont développé des stratégies adaptatives particulièrement efficaces, ainsi que des interactions (symbiotiques ou non) avec des microorganismes bénéfiques, eux-mêmes adaptés à ces contraintes environnementales. Parmi ces espèces végétales, on trouve notamment les plantes halophiles, fortement exposées à des concentrations salines élevées. En Nouvelle-Calédonie, ces espèces sont également parfois simultanément exposées à des concentrations en Eléments Traces Métalliques (ETM) importantes, résultant de l'érosion et de contaminations environnementales directes. Nous avons fait l'hypothèse que certaines espèces végétales des écosystèmes côtiers de Nouvelle-Calédonie (tannes), exposées à des stress salins et métalliques, pourraient représenter un réservoir potentiel de microorganismes résistants aux ETM et au sel, et bénéfiques à la croissance des plantes. Nous avons entrepris la caractérisation complète de ces microorganismes par des approches de biologie moléculaire, puis nous avons réalisé leur isolement et leur caractérisation phénotypique, en testant notamment leurs résistances salines et métalliques, ainsi que leurs effets promoteurs de la croissance des plantes (PGP) afin, *in fine*, de pouvoir en tirer des applications dans le domaine de la restauration écologique ou de la décontamination des eaux.

1. CONTEXTE ET POSITIONNEMENT DU PROJET

1.1. CONTEXTUALISATION DE LA PROBLEMATIQUE POSÉE ET ORGANISATION GLOBALE DU PROJET

À l'échelle globale, l'augmentation de la population et de ses besoins a aggravé les problèmes de contamination de l'eau (Nriagu J O 1988; Rehman et al. 2018; Germande et al. 2022). Dans les pays industrialisés, ces contaminations concernent notamment les éléments traces métalliques (ETM) et elles trouvent leur origine à la fois dans les activités anthropiques (industries, mines, rejets domestiques) et dans l'érosion naturelle des reliefs.

En Nouvelle-Calédonie (NC), environ un tiers de la partie continentale est couverte par une nappe ophiolitique principalement composée de roches ultrabasiqes, qui ont donné naissance à des sols naturellement enrichis en ETM (et notamment en nickel, manganèse, cobalt et chrome) et soumis à l'exploitation minière. Ainsi, dans ce territoire, la contamination industrielle et environnementale par les ETM est une préoccupation majeure. Les sites en cours d'exploitation et les mines orphelines non encore revégétalisées restent sources de contaminations régulières des bassins versants. Des écosystèmes protégés (notamment les écosystèmes côtiers et le lagon), sont régulièrement impactés par les ETM, et les risques de contamination de la chaîne alimentaire sont avérés (Bonnet et al. 2014; Briand et al. 2014; Marine J. Briand et al. 2018). De plus, les terrains en aval des mines jouxtent souvent des terres agricoles ou d'élevage (y compris ceux dédiés à la crevetticulture), ainsi que les rivières et lagons. Parfois chargés en ETM, ils peuvent représenter des sources potentielles de contamination pour l'homme, qui les utilise pour ses loisirs et sa subsistance alimentaire.

En raison des impacts multiples des ETM sur les écosystèmes terrestres et marins, ainsi que sur la santé humaine, ces contaminations menacent *in fine* directement la qualité de l'approvisionnement en eau et la santé des populations. En effet, parmi les ETM rencontrés en Nouvelle-Calédonie, certains sont connus pour être modérément ou significativement toxiques pour l'homme et pour l'environnement. C'est notamment le cas du chrome (Cr), du nickel (Ni), du zinc (Zn), du cuivre (Cu), du plomb (Pb), du cadmium (Cd), de l'arsenic (As), du mercure (Hg) ou encore du scandium (Sc).

L'étude METEXPO (2015-2017) financée par le CNRT « Nickel et son Environnement », a montré qu'en dépit d'une certaine variabilité géographique et démographique, les concentrations moyennes en ETM mesurées dans les urines de la population néo-calédonienne sont élevées par rapport aux références internationales, et notamment pour le nickel et le chrome (Nriagu J O 1988; Cordier et al. 2017; St-Jean et al. 2018). Une des trois voies de contamination possible est l'ingestion

d'eau présentant des concentrations significatives en ETM du fait de leur relation avec des sols riches en ETM. Cette étude insiste cependant sur la nécessité d'entreprendre des investigations complémentaires sur (1) la quantification des ETM dans les différents compartiments susceptibles d'agir comme vecteurs de l'exposition (eau, poussières et aliments) et (2) la caractérisation des formes chimiques des ETM dans ces différents compartiments pour permettre une meilleure évaluation des risques pour la santé humaine.

Dans ce contexte, le projet ChroNick, également financé par le CNRT « Nickel et son Environnement », et dans lequel sont impliqués certains membres de notre équipe de recherche (ISEA : Institut des Sciences Exactes et Appliquées) a vu le jour en 2019. Ce projet ChroNick visait à évaluer l'influence de certains forçages sur la dynamique du chrome et du nickel dans les sols et à l'échelle des bassins versants de manière à expliquer les variations temporelles et spatiales des concentrations en ETM au niveau de la ressource en eau (captages AEP : Alimentation en Eau Potable).

La NC est par ailleurs l'un des points chauds de la (micro)biodiversité mondiale, réputée dans le monde entier pour ses écosystèmes uniques. Ces écosystèmes sont fortement soumis à l'érosion, un fait drastiquement accru par le changement climatique, les incendies anthropogéniques et les activités minières locales. Les contaminants métalliques finissent par atteindre les rivières et les écosystèmes environnants (incluant les écosystèmes récifaux et lagonaires), les sédiments et les cours d'eau étant naturellement très concentrés en ETM, notamment en Chrome (Gunkel-Grillon et al. 2014; Boula et al. 2022). Pour gérer durablement les ressources en eau et protéger les écosystèmes et la santé humaine, il semble donc essentiel de réduire efficacement les ETM dans les masses d'eau afin d'assurer un approvisionnement en eau sûr et de préserver les écosystèmes concernés.

Face à ce problème de pollution d'envergure mondiale, et particulièrement présent en NC, les principaux traitements pour la remédiation de l'eau reposent sur des méthodes telles que la coagulation, les précipitations chimiques, l'osmose inverse, l'électrodialyse, la floculation, l'échange d'ions, la nanofiltration, l'ultrafiltration etc (Zuluaga-Gomez et al. 2020). Cependant, bien qu'effectives, ces techniques actuelles d'épuration de l'eau restent peu satisfaisantes. En effet, ces stratégies conventionnelles de remédiation sont chères, lentes ou génèrent, pour certaines, des sous-produits toxiques nuisibles pour l'environnement. De plus, elles ne répondent pas au contexte du territoire néo-calédonien, qui nécessite l'utilisation d'installations légères et adaptées à une échelle très locale (échelle du captage AEP par exemple). Ainsi, il existe un besoin urgent de développer en Nouvelle-Calédonie des alternatives plus sélectives, peu coûteuses et efficaces pour atténuer les concentrations en ETM dans les eaux usées ou de ruissellement, à des niveaux acceptables pour l'environnement et la santé humaine.

Concernant la décontamination des cours d'eaux chargés en ETM, les méthodes actuellement en plein essor sont celles qui reposent sur des procédés de sorption qui regroupent tous les phénomènes permettant l'association des ions métalliques sur des groupements fonctionnels de matériaux sorbants, notamment ceux d'origine végétale ou microbienne. Plus précisément, l'association de biomasse microbienne et de déchets biologiques et agricoles a été décrite comme une alternative aux méthodes conventionnelles d'élimination des métaux pour la détoxification des eaux usées (Sen and Dastidar 2010; Fernández et al. 2018; Paul et al. 2024). Ainsi, la bioremédiation (Sen and Dastidar 2010; Al-Battashi et al. 2016; Verma and Sharma 2017; Fernández et al. 2018; Ayele and Godeto 2021; Paul et al. 2024), qui fait appel à des micro-organismes et à des plantes (solutions fondées sur la nature), pour éliminer les polluants métalliques toxiques, est désormais largement reconnue comme l'une des méthodes écologiques les plus efficaces, durables, peu coûteuses et prometteuses pour gérer les contaminations par les ETM. A noter que les microorganismes peuvent être utilisés directement, ainsi que et les biomolécules qu'ils fabriquent en réponse aux stress environnementaux. Ainsi, les exopolysaccharides ou/et le biofilm peuvent notamment être employés pour capter les ETM.

Ainsi, il serait intéressant pour le territoire d'explorer séparément puis conjointement plusieurs pistes prometteuses permettant *in fine* le développement d'écrans et/ou de filtres biologiques (plantes, biomasses microbiennes vivantes ou mortes, ou leurs bioproduits notamment les exopolysaccharides ou/et le biofilm) pour prévenir la contamination des eaux et/ou dépolluer les effluents en aval des massifs ultrabasiques. La mise au point de telles méthodes implique de nombreuses étapes, et notamment la sélection et la caractérisation des espèces végétales et des microorganismes cultivables adaptés à des contraintes environnementales fortes.

La NC, qui héberge des écosystèmes uniques au monde, notamment au niveau terrestre, pourrait constituer un réservoir potentiel de plantes et d'espèces microbiennes uniques, particulièrement

adaptées au stress métallique et présentant des capacités remarquables d'adaptation aux métaux (Bourles et al. 2020; Gei et al. 2020), potentiellement (et notamment) valorisables dans le cadre de la mise en œuvre de stratégies de bioremédiation des ETM.

Dans cette perspective, notre équipe de recherche s'intéresse depuis de nombreuses années aux espèces végétales et microbiennes de deux types d'écosystèmes : les écosystèmes se développant sur sols ultramafiques (stress polymétallique) et les écosystèmes se développant sur des sols riches en sels et contaminés par des ETM (tannes, stress salin à l'interface terre-mer). Plus spécifiquement, nous avons émis l'hypothèse que certaines des espèces végétales de Nouvelle-Calédonie, adaptées aux ETM et aux fortes concentrations salines, pouvaient représenter des réservoirs de microorganismes d'intérêt, eux-mêmes adaptés aux ETM et au sel et aidant les plantes à se développer dans des conditions de stress environnemental majeur. De tels microorganismes sont dits PGP (pour Plant Growth Promoting) et sont très largement étudiés dans le cadre d'applications en restauration écologique ou de décontamination des environnements chargés en divers polluants, notamment les ETM (Lal et al. 2018; Kumawat et al. 2022).

Dans le cadre du projet METDEP, financé par le CNRT « Nickel et son environnement » ; nous proposons d'étudier de manière systématique les cortèges microbiens associés aux espèces végétales halophiles (plantes adaptées au sel ou halophytes) se développant sur les tannes de Nouvelle-Calédonie. Plus spécifiquement, nous souhaitons explorer les compositions microbiennes d'espèces végétales choisies, les résistances aux ETM de ces microorganismes, leurs effets PGP (Plant Growth Promoting), ainsi que les mécanismes moléculaires associés aux adaptations développées par ces microorganismes face à la contrainte saline et métallique.

HYPOTHESES DE RECHERCHE ET ORGANISATION GENERALE DU PROJET METDEP ET DU PRESENT RAPPORT.

Notre équipe de recherche, qui a longuement travaillé sur les microorganismes des milieux extrêmes (ultramafique, salin) et sur la pollution des bassins versants, proposait ici d'explorer les possibilités de dépolluer les sols et les eaux (et donc les écosystèmes) par des techniques innovantes de biosorption des métaux grâce à des microorganismes autochtones et à leurs exsudats.

Pour cela, nous avons écrit et proposé un projet portant sur l'étude du microbiome total et cultivable des espèces halophytes des sols de tannes de Nouvelle-Calédonie (sous contraintes métalliques ou non) afin de le caractériser et d'en tirer de potentielles applications.

Dans ce cadre, nous avons initialement conçu un projet articulé autour de quatre tâches et prévu pour une durée de deux années. Cependant, au fur et à mesure de l'avancement de ce projet, nous avons, en accord avec le CSI du CNRT, décidé de traiter la Tâche 3 initialement prévue dans le projet METDEP, sous la forme d'une revue de la littérature. Les schémas de l'organisation initiale et finale du projet (en lien avec l'organisation du présent rapport) sont respectivement présentés dans les Figures 1.1 et 1.2 ci-dessous.

Ce projet faisait appel à des techniques cultures indépendantes (métabarcoding) pour la caractérisation des microbiomes complets ou cultures dépendantes (isolement des microorganismes cultivables) à partir des sols de tannes et des différents compartiments des espèces de plantes halophiles qui s'y développent.

Concernant les approches cultures indépendantes (Tâche 4 du projet METDEP), celles-ci sont indispensables afin de nous permettre d'avoir une vision globale de l'ensemble des microorganismes présents dans les écosystèmes que représentent les tannes néo-calédoniennes.

Concernant les approches cultures dépendantes (Tâches 1, 2 et 3 du projet METDEP initial), celles-ci sont indispensables afin de pouvoir disposer d'une collection de microorganismes cultivables, pleinement caractérisés, en vue d'applications potentielles en aval (phytoremédiation bio-augmentée ou développement de biotechnologies innovantes). Ces 3 tâches avaient notamment pour objectif de procéder à l'identification moléculaire des microorganismes isolés, ainsi qu'à la caractérisation de : leurs résistances métalliques et salines ; leurs effets Promoteurs de la Croissance des plantes (PGP) ; et leurs capacités à produire des biomolécules d'intérêt (notamment des exopolysaccharides et/ou du biofilm). Ces deux dernières catégories de biomolécules ont été ciblées car, d'après les données de la littérature (incluant certains de nos travaux précédents), les ETM sous forme particulière ou soluble, peuvent être accumulés par des cellules intactes (vivantes ou non) ou chelétés par leur sous-produits,

tels que les exopolymères qui peuvent soit être libérés dans le milieu environnant, soit constituer la majeure partie de la matrice exopolymérique du biofilm. Le biofilm est une structure qui se forme lors du passage de la bactérie du mode de vie libre dit « planctonique » à un mode vie sédentaire dit « sessile » (attaché à un support). Il est constitué de bactéries adhérentes à un support via l'excrétion d'une matrice exopolymérique. Les microorganismes sont pour certains également capables de produire des exopolymères de types polysaccharidiques en mode planctonique. Ces exopolymères (EPS) matriciels ou excrétés dans l'environnement servent, entre autres, de protection cellulaire contre les stress environnementaux, notamment le stress métallique. C'est notamment la capacité de séquestration des ions métalliques par ces EPS que nous proposons d'investiguer dans cette étude. Toutefois, en raison de contraintes temporelles majeures, cette capacité n'a pas encore pu être explorée. Cependant, afin de traiter leur potentielle utilisation dans le cadre de stratégies de bioremédiation (Tâche initiale 3 du projet), nous avons convenu, en accord avec le CSI du CNRT, de traiter ce point sous la forme d'une revue de la littérature. Cette revue de la littérature viendra compléter notre état de l'art ; elle sera présentée en tant que chapitre 2 du présent rapport dès publication.

Au début du projet METDEP, nous avons déjà isolé au laboratoire des bactéries particulièrement résistantes aux fortes concentrations métalliques et capables de produire des EPS, que nous comptons tester dans le cadre du présent projet. Par ailleurs, l'isolement du microbiome cultivable résistant aux stress salins et/ou métalliques de plantes halophiles avait également été entrepris au sein du laboratoire. Ces travaux nous ont permis de constituer une souchothèque de microorganismes qui a représenté un vivier de microorganismes utilisés dans la présente étude.

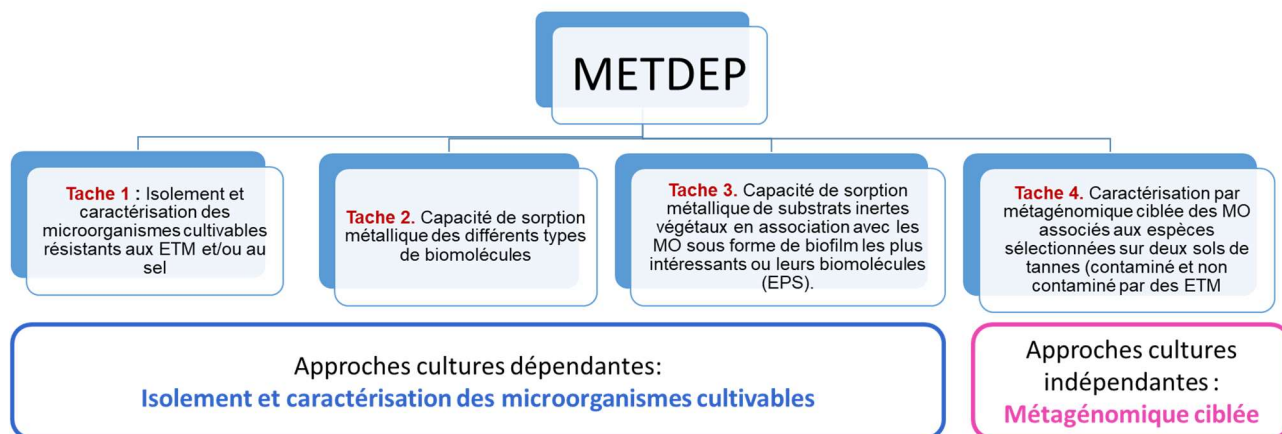


Figure 1.1 : Schéma de l'organisation initiale générale du projet METDEP.

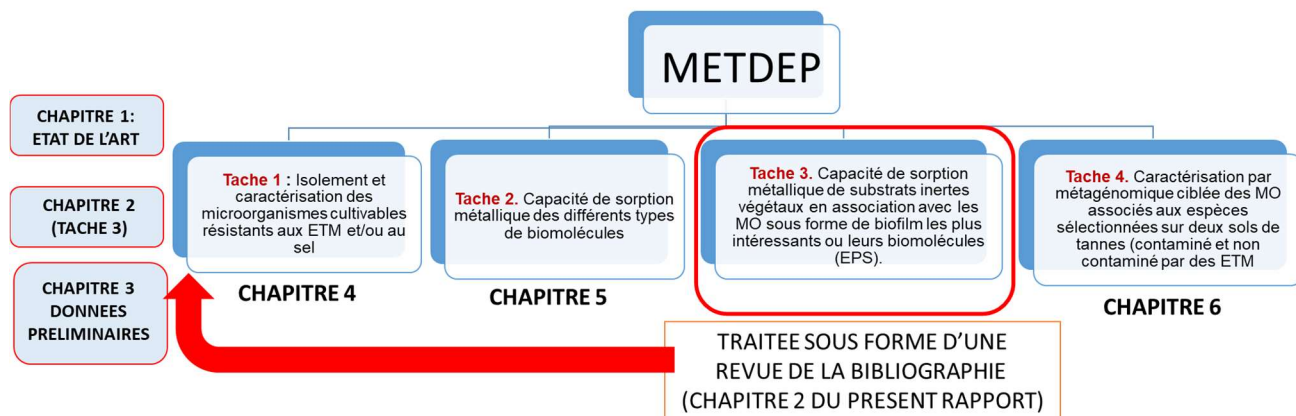


Figure 1.2 : Schéma de l'organisation finale générale du projet METDEP (décidée en septembre 2023).

Principales difficultés rencontrées dans le cadre de la mise en œuvre du projet METDEP.

Comme tout projet de recherche exploratoire, l'avancée du projet METDEP a été influencée par de nombreux faits et paramètres impactant directement son déroulement et ses avancées, et ayant conduit à des modifications de stratégies et de réalisations (et notamment le traitement de la Tâche 3 sous forme d'une revue bibliographique). Les principales difficultés auxquelles nous avons fait face sont listées ci-dessous.

1/ Tout d'abord, le projet METDEP n'avait pas initialement été retenu pour financement par le CNRT lorsque nous l'avions déposé. Des retours que nous avons eus, le projet était jugé très intéressant mais long et complexe à mettre en œuvre et très en amont de toute forme d'applications potentielles en aval. Finalement, en 2021, nous avons été recontactées pour financement de notre projet par le CNRT, ce dont nous sommes très reconnaissantes. Cependant, il s'agissait d'une fin de programmation pour le CNRT, et nous avons initialement convenu que la durée du projet serait d'une année, avec réalisation d'un maximum de Tâches, puis établissement d'un premier bilan. Le calendrier initialement proposé pour le projet avait donc été extrêmement compacté (comme indiqué sur ce dernier au moment de la soumission du projet), afin de rester dans le cadre calendaire initial du CNRT. Ainsi, bien que le projet initial (très ambitieux tel qu'écrit parce que correspondant à l'ensemble de notre sujet de recherche en cours au laboratoire), n'ait pas été réécrit (en accord avec la direction du CNRT), il avait été convenu qu'un focus serait fait, dans le cadre du projet METDEP, sur les écosystèmes des tannes de Nouvelle-Calédonie.

2/ Le projet n'a pas pu démarrer dans les temps du fait d'un confinement strict entre septembre 2021 et octobre 2021, suivi d'un délai de 2 semaines pour la remise en marche des laboratoires de l'UNC ;

3/ Conséquemment au délai de démarrage du projet du fait des raisons évoquées supra, un retard dans le recrutement de l'assistante technicienne prévue pour la réalisation des tâches du projet (et donc le démarrage concret des travaux) ;

4/ Durant tout le projet, nous avons travaillé en situation post-COVID et expérimenté des délais d'acheminement des réactifs considérablement allongés (du fait de l'appauvrissement global des stocks internationaux et de l'augmentation des délais de livraison).

5/ Des délais dans la réalisation d'un certain nombre de dosages sur les plateformes de dosage en Nouvelle-Calédonie : tous les chercheurs ayant subi les mêmes arrêts expérimentaux, ceci a conduit à des accumulations d'échantillons sur les plateformes analytiques, donc à des délais importants d'obtention des résultats ;

6/ Diverses pannes récurrentes des équipements nécessaires au bon déroulement du projet dans l'année écoulée (notamment ceux de la plateforme analytique du LAMA ralentissant la réalisation de tous nos dosages d'ETM).

7/ La non-fonctionnalité du fermenteur mis à notre disposition par notre partenaire IFREMER (que nous remercions chaleureusement) et que nous avons dû remettre en état (avec des délais très longs d'acheminement des pièces et un budget non initialement prévu ; impact considérable sur le déroulement des Tâche 2 et 3) ;

8/ Un certain nombre d'autres impondérables, notamment des problèmes de santé et le décès brutal d'un collègue enseignant-chercheur en janvier 2023, et l'absorption au pied levé de sa charge d'enseignement et de ses responsabilités pédagogiques afin d'assurer la continuité de la formation de nos étudiants sans impacts pour eux. Etant enseignant-chercheur, le temps que nous y avons consacré, en plus de nos propres charges d'enseignements et responsabilités pédagogiques ou administratives, a fortement impacté notre disponibilité pour la recherche. Enfin, les émeutes qui ont secoué la Nouvelle-Calédonie durant l'année 2024, ont également eu un impact particulièrement important sur notre activité de recherche : fermeture brutale du campus, perte des expériences en cours et arrêt de tous les stages, notamment celui de Madame Elisa GONTHIER, pleinement dédié à l'avancement de la Tâche 2 de METDEP.

Accompagnement du CNRT en réponse à l'ensemble des difficultés listés supra :

En dépit de toutes ces difficultés, nous avons avancé sur les travaux prévus dans le cadre du projet METDEP et ceci a notamment été rendu possible grâce à une confiance mutuelle et une communication franche et transparente avec nos interlocuteurs du CNRT, et l'accompagnement qui nous a été offert. Cet accompagnement s'est en particulier traduit par deux prolongations du projet, la première d'une année jusqu'en octobre 2023), la seconde jusqu'à mi-2024 (cependant, en raison des émeutes évoquées supra, cette seconde prolongation n'aura hélas pas été bénéfique).

Cette prolongation nous a permis de rendre plus réaliste la mise en œuvre opérationnelle des quatre tâches de recherche prévues initialement dans le projet. Ceci a notamment été rendu possible via le prolongement du recrutement de l'assistante technicienne impliquée directement dans la réalisation pratique des différentes expérimentations prévues.

Nous tenons donc ici à remercier le CNRT non seulement pour le soutien financier qu'il a apporté à notre activité de recherche, mais aussi pour son accompagnement tout au long de cette aventure.

Personnes impliquées dans la réalisation et la mise en œuvre du projet METDEP.

Outre les chercheurs et enseignants-chercheurs impliqués dans ce projet, la réalisation de l'ensemble des travaux présentés dans le présent rapport a été rendu possible grâce au travail de :

- Madame Pauline BONAVENTURE, doctorante à ISEA de 2019 à 2023 ;
- Madame Alizée LE FLOCH, technicienne de laboratoire recrutée en CDI sur le budget du CNRT METDEP ;
- Madame Jeanne GRILLOT, stagiaire de Master 2 à ISEA en 2022 ;
- Madame Morgane PERINA, stagiaire de Master 2 à ISEA en 2020 et en CUIP en 2021 ;
- Madame Elisa GONTHIER, stagiaire de Master 1 à ISEA en 2024
- Mesdames Valérie MEDEVIELLE, Monica LEMESTRE et Sarah GIGANTE, personnels techniques d'ISEA et qui ont activement et grandement participé à ce projet.
- Madame Julie DIJOUX, doctorante à ISEA de 2021 à 2025 et M. Pierre-Louis Stenger, chef d'entreprise, qui, bien que ne travaillant pas initialement sur ce projet, ont procédé aux analyses bioinformatiques des données générées dans la Tâche 4.

Que toutes ces personnes soient grandement remerciées pour le travail et l'implication qui ont été les leurs à nos côtés pendant toute la durée du projet METDEP.

1.2. LE CONTEXTE NÉOCALÉDONIEN (EN BREF) – REDACTEUR : P. BONAVENTURE

Située dans le sud-est de l'océan Pacifique et au Nord-est de l'Australie, la Nouvelle-Calédonie est un archipel composé de la Grande Terre et de plusieurs îles, entouré de la 2^e plus grande barrière de corail continue au monde. Avec une production annuelle de pêche commerciale d'environ 2500 tonnes en 2021 (ISEE - Agriculture - Pêche - Aquaculture¹: <https://www.isee.nc/economie-entreprises/entreprises-secteurs-d-activites/agriculture-pecheaquaculture/>) et 15%² de la population pratiquant l'autoconsommation de poissons et autres produits associés, ce territoire insulaire est fortement dépendant de la mer. Les écosystèmes marins recèlent d'une grande biodiversité, mais sont hélas

¹ Données disponibles via le fichier "production-maritime.xls", année 2021

² Pourcentage se basant sur les données issues de la Synthèse de l'Enquête N°49 du Budget des Familles 2019-2020 (Buffière, 2021; <https://www.isee.nc/societe/consommation-conditions-de-vie/consommation-et-equipement-desmenages>): 37% de la population calédonienne totale pratiquent l'autoconsommation, et 41 % de ce pourcentage concerne

les produits de la mer soit sur 271 407 personnes, 41 172 personnes sont concernées.

menacés par les contaminations métalliques sévissant aux abords des côtes, liées notamment au phénomène d'érosion des sols, renforcé par l'activité minière.

1.2.1. ORIGINE ET RÉPERCUSSIONS DES CONTAMINATIONS AUX ETMS ISSUS DES SÉDIMENTS MINIERES EN NOUVELLE-CALÉDONIE

1.2.1.1. Pédogenèse des sols miniers et origine des contaminants métalliques présents dans les contaminations d'origine ultramafique en Nouvelle-Calédonie

La Nouvelle-Calédonie tire profit de ses sols riches en ETMs qui se sont formés par des processus géologiques survenus entre -90 et -10 millions d'années, laissant apparaître différents types de gisements de nickel (Laroche 2011; Sevin 2014). Elle se situe dans la ceinture intertropicale et subit un climat tropical, toutefois influencé par des vents tempérés océaniques apparaissant dans cette zone du Pacifique (David et al. 1995; Cavarero et al. 2012). Outre les fortes teneurs en Mg et en Fe présentes dans les roches qui leur valent la qualification d'« ultramafiques », l'altération des roches provoquée par les effets combinés de dépressions tropicales intenses et de l'érosion (Sevin 2014) conduit à l'enrichissement des sols en Ni, Co et autres éléments-trace-métalliques (ETMs) (Trescases 1975; Laroche 2011). En particulier, l'hydratation, l'oxydation et le lessivage en profondeur de ces roches provoquent une hydrolyse de certains minéraux primaires comme l'olivine, facilitant une libération de certains éléments comme le fer et le nickel. Ces mécanismes physico-chimiques donnent naissance à des roches particulières : des saprolites (Audet 2009) puis des latérites (Figure 1.3). C'est dans ces deux types de roches altérées que le minerai de nickel est exploité. Dans ces dernières, des oxyhydroxydes ferriques cristallisent progressivement en goethite, un minéral auquel s'associent certains ETMs comme le Cr, le Ni ou l'Al (Audet 2009; Sevin 2014; Allenbach et al. 2015).

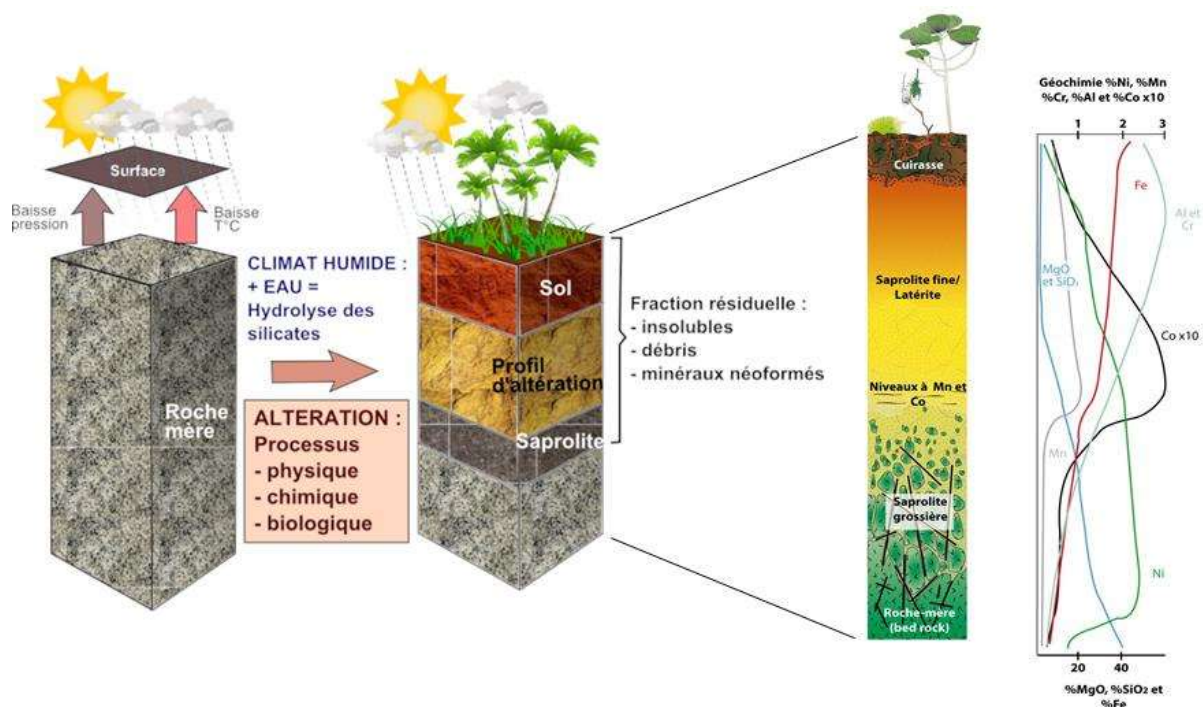


Figure 1.3: Processus d'altération des roches ultramafiques en Nouvelle-Calédonie et répartition du Ni, Co, Cr, Mn, Fe, Al et des oxydes de Mg et Si. Schéma d'après J.-J. Trescases (1975) repris par Sevin (2014) et utilisant l'infographie (https://pairform.imtatlantique.fr/doc/17/138/500/web/co/grain2_3_4.html) (Trescases 1975; Sevin 2014)

Les concentrations et les formes des oxyhydroxydes métalliques peuvent varier en fonction du type de sol. Les sols ferrallitiques, ou encore ferralsols selon les dénominations de la FAO de 1970 et la WRB de 2006 (World Reference Base for soil resources), sont des sols cibles de l'activité minière de nickel (Latham et al. 1978; Baize and Girard 2009). Ces sols sont souvent hydromorphes, caractérisés par une altération très poussée des minéraux, ce qui explique les très fortes teneurs en sesquioxides de Fe, Mn, Ni, Co, Cr (Baize and Girard 2009; Laroche 2011) La faible capacité de rétention d'eau de ces sols, leurs faibles teneurs en argile et les propriétés amphotères des oxydes et oxyhydroxydes métalliques leur confèrent un équilibre chimique très instable et une forte sensibilité à l'érosion (Baize and Girard 2009; Laroche 2011).

Les phénomènes d'érosion présents en Nouvelle-Calédonie sont liés au climat tropical et subtropical océanique caractérisé par des événements pluvieux intenses et répétés (Desclaux et al. 2017). L'érosion des roches ultramafiques émet un flux de particules riches en ETMs lourds qui se retrouvent en suspension dans les cours d'eau et se répandent dans les zones de bassins versants miniers. Les sols de Nouvelle-Calédonie connaissent le phénomène d'érosion depuis le Miocène et le transport de matières en suspension (MES) vers l'aval est donc un phénomène naturel. Cependant, les aménagements du territoire entre autres liés à l'activité minière amplifient le phénomène d'érosion. Pour Latham et al. (1978)(Latham et al. 1978), les zones côtières et les zones de bassins versants en aval des exploitations minières, qu'elles soient anciennes ou en activité, sont menacées par cet apport de sédiments riches en ETMs. Le problème des « eaux rouges » aux abords des estuaires témoigne notamment d'un transfert important de MES riches en ETMs de la mine au lagon (Figure 1.4) (Allenbach et al. 2015)



Figure 1.4: Impact de l'érosion et du ruissellement sur les zones en aval. A. Évènement pluvieux intense sur le site minier de Poro. B. Le ruissellement sur site minier. C. Impact de l'érosion sur une baie (Photos : Auteur inconnu, d'après (Allenbach et al. 2015).

1.2.1.2. Bref historique de l'exploitation minière, impacts et besoin de mesures environnementales

La Nouvelle-Calédonie détient le quart des réserves mondiales de minerais de nickel, ce qui fait d'elle le 7ème producteur mondial (Dumas and Cohen 2014; Gunkel-Grillon et al. 2014). Les premières extractions apparaissent au Mont-Dore, au niveau des régions de Canala, Thio et Houaïlou, après la découverte en 1873, par Jules Garnier, des latérites et saprolites (Laroche 2011). La Nouvelle-Calédonie prend progressivement son essor économique avec la création d'entreprises minières (Figure 1.5, A), dont la SLN en 1880, puis l'activité minière s'intensifie vers les années 1940. Situé à une profondeur de 10 à 30 m, le minerai de nickel se trouve sous le niveau latéritique (Gunkel-Grillon et al. 2014) et l'extraction de minerai à ciel ouvert est donc marquée par le décapage obligatoire du sol, intensifiant ainsi le processus naturel d'érosion, avec des répercussions irréversibles sur l'environnement (Figure 1.5, B) (Latham et al. 1978; Laroche 2011).

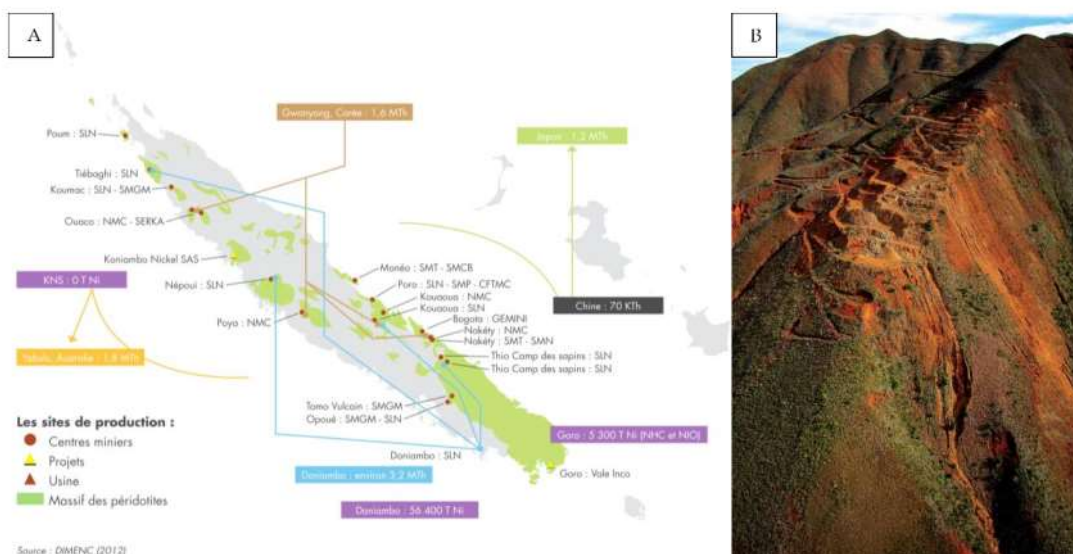


Figure 1.5: L'activité minière en Nouvelle-Calédonie : un avantage économique aux dépends de l'environnement. A. Voies de valorisation du minerai de nickel en 2012 et localisation des sites miniers (d'après <https://sap.gouv.nc/schema-damenagement/nc2025/nc2025-orientations-et-moyens-propositions/>). B. Mine Souza. (Photo : © M. Dossane, Pitoiset, 2016).

Le constat des dégradations est cependant assez tardif puisque les premières réglementations du secteur minier n'apparaissent qu'à la fin du XXème siècle, avec les premiers plans de revégétalisation des sols dégradés vers 1971 pour ceux utilisant des plantes exotiques puis à partir de 1988 avec des plantes locales mieux adaptées aux contraintes édaphiques (Laroche 2011; Allenbach et al. 2015). Entre 1971 et 1995, 7 millions de tonnes de minerai saprolitique avaient déjà été extraites. Laroche (2011)(Laroche 2011) affirme que près de 20 000 ha de sols sont dégradés avec seulement 296 ha de terrains restaurés entre 1971 et 2006.

1.2.2. Répercussions environnementales de l'activité minière : toxicité potentielle des flux issus de la mine

1.2.2.1. Principaux Mécanismes et Facteurs d'érosion hydrique des sols

En Nouvelle-Calédonie, les précipitations se condensent surtout sur la période humide et chaude de mi-novembre à mi-avril (Dumas and Cohen 2014). Entre 2009 et 2013, la pluviométrie annuelle enregistrée varie de 1460 à 2720 mm (Allenbach et al. 2015). Les épisodes pluvieux les plus intenses et les périodes de crues expliquent la majeure partie des quantités de sédiments érodés et transportés (Dumas and Cohen 2014; Allenbach et al. 2015; Desclaux et al. 2017; Juillot F. et al 2019). A titre d'exemple, l'épisode FINA de 2011 représente à lui seul 23 % de la pluviométrie moyenne annuelle avec plus de 500 mm en 40 heures (Allenbach et al. 2015). Plus récemment, on enregistrait une pluviométrie de 400 mm en 48h à Dumbéa dans le sud de la Grande Terre et à Ouvéa lors l'épisode LUCAS de 2021 (<https://www.meteo.nc/45-comprendre-la-meteo/climatologie/saisons-cycloniques-passees>). D'autre part, les nombreux feux de brousse, favorisés par la saison sèche entre mi-septembre et mi-novembre, détruisent le couvert végétal, et contribuent à augmenter le risque d'érosion (Dumas and Cohen 2014; Desclaux et al. 2017). La modification de l'utilisation des terrains, l'extraction de sable dans les lits de rivière sont également des facteurs aggravants (Garcin et al. 2013). Lors des phénomènes d'érosion, les MES sont transportées de la mine au lagon (Figure 1.6) et leurs concentrations, fortement liées à l'intensité et la fréquence des pluies en Nouvelle-Calédonie, augmentent à l'embouchure des rivières (Allenbach et al. 2015).

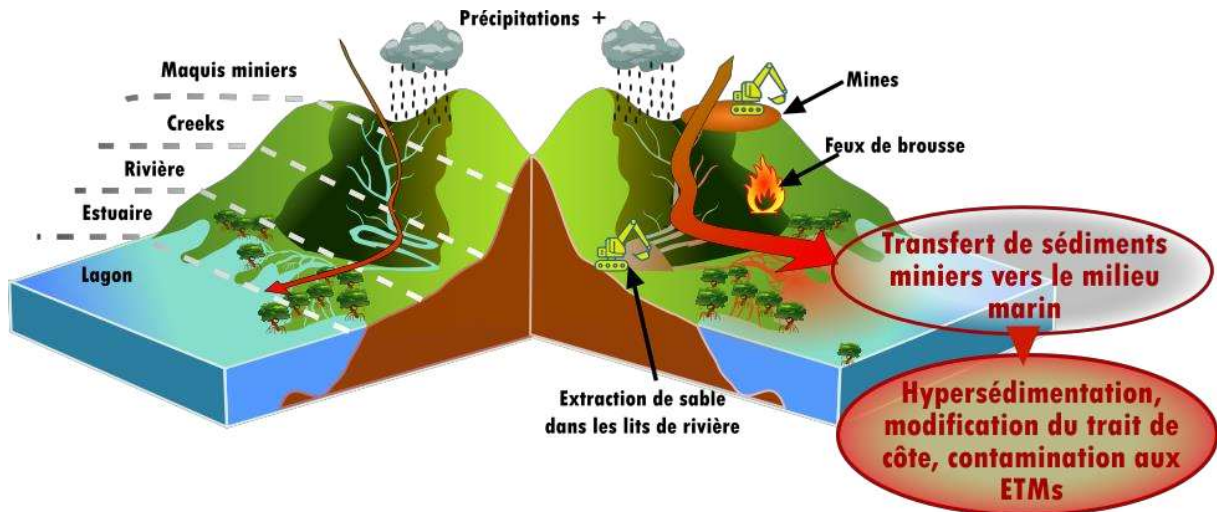


Figure 1.6: Facteurs amplifiant le phénomène d'érosion au sein des bassins versants en Nouvelle-Calédonie et répercussions pour les écosystèmes côtiers (d'après Bonaventure 2023).

Plusieurs études menées en Nouvelle-Calédonie montrent que les mécanismes d'érosion des zones dégradées dépendent également de la composition du sol et de sa compaction (Dumas and Cohen 2014; Allenbach et al. 2015). Le transport de MES vers l'aval modifie de manière importante le réseau hydrographique des bassins versants ainsi que des littoraux (Latham et al. 1978; Danloux and Laganier 1991; Dumas and Cohen 2014). Garcin et al. (2013)(Garcin et al. 2013) montrent en l'occurrence une étroite corrélation entre l'évolution du trait de côte au niveau des estuaires et l'érosion des zones dégradées par l'activité minière. Elles se déposent en particulier sous forme d'alluvions dans les rivières, les embouchures des cours d'eau et les estuaires et finissent par s'accumuler au fond des baies. Ce phénomène d'hyper-sédimentation réduit l'apport lumineux dans l'eau, menant progressivement à l'étouffement des coraux (Desclaux et al. 2017).

La modification de la topographie joue sur le comportement du sol et influence la vitesse et le volume d'écoulement des particules de sol chargées en ETMs (Laroche 2011). Plusieurs facteurs déterminent la façon dont les particules de sol sont mises en suspension et dont les ETMs sont libérés, notamment la présence de matière organique dans le milieu ou encore les charges électrostatiques qui s'exercent à la surface des particules et des minéraux (Allénbach et al. 2015). La solubilisation des ETMs dépend également de la nature des minéraux présents dans ces MES (Quantin et al. 1996) En effet, on trouve dans ces MES divers minéraux de type smectite ou goéthite, naturellement associés au nickel, au chrome et à l'aluminium (Sevin 2014; Allenbach et al. 2015). Les mécanismes de libération des ETMs dans les cours d'eau peuvent s'avérer complexes et par conséquent, la limitation de leur transfert de la mine au lagon fait l'objet de nombreux travaux de recherche en Nouvelle-Calédonie.

1.2.2.2. Equilibres et biodisponibilité des ETMs dans le sol

En majeure partie insolubles, sous forme d'ions adsorbés sur des particules, de précipités, ou encore liés à des molécules organiques, ces ETMs peuvent être libérés en une forme soluble et échangeable dans la solution du sol. Ils deviennent donc biodisponibles (Liu et al. 2018). Cette biodisponibilité des ETMs, c'est-à-dire, la capacité à être assimilés par les organismes vivants, est donc l'état sous lequel ils deviennent toxiques pour ces derniers. Les transitions vers une forme ionique et biodisponible dépendent de l'espèce métallique, de sa concentration et s'opèrent sous l'effet de changements physico-chimiques présents à l'échelle des MES et des particules du sol. De manière générale, la perméabilité du sol, le lessivage profond, le pH du sol, les teneurs en argile, en matière organique et en oxydes de Fe et Mn sont autant de paramètres déterminants dans les réactions de complexation/dissolution des ETMs (Allénbach et al. 2015; Sarwar et al. 2017; L. Liu et al. 2018; Zhao et al. 2021). La complexité des mécanismes de libération des ETMs réside par ailleurs dans le caractère instable des paramètres du sol et de leur interdépendance. Par exemple, l'acidité du sol peut dépendre de sa composition minéralogique(Laroche 2011; Gunkel-Grillon et al. 2014; Sarwar et al. 2017) qui elle-

même est déterminante dans la teneur en ETMs. Ainsi, la goethite peut lier les ETMs ou les libérer par substitution du fer dans le complexe minéral ou par adsorption (Singh et al. 2002; Allenbach et al. 2015). Les plantes et les microorganismes modifient également les propriétés des sols et peuvent donc agir sur la biodisponibilité des ETMs (Sarwar et al. 2017; Ali et al. 2020; Priya et al. 2022).

D'autre part, la teneur des ETMs dans le sol peut varier le long du gradient terre-mer et selon la profondeur du sol. Ceci a été montré dans plusieurs études dont celle de Marchand et al. (2012)(Marchand et al. 2012) qui illustre cette variation avec l'exemple local de la mangrove à l'embouchure de la rivière de Dumbéa, située sur la côte Ouest de la Grande Terre. Dans une autre étude, Zhao et al. (2021) (Zhao et al. 2021) constatent que les concentrations des ETMs étudiés (As, Cd, Cr, Cu, Mn Pb, Zn et Fe) ont tendance à être plus élevées dans les premières couches du sol à l'exception des milieux d'eaux saumâtres, situés à environ à 200 m de la berge nord de la rivière étudiée. La marée, et en particulier le temps et la fréquence d'immersion apparaît aussi comme un paramètre conditionnant la distribution des ETMs dans le sol (Santos-Echeandía et al. 2010; Zhao et al. 2021).

1.2.2.3. Pollutions aux ETMs des écosystèmes côtiers de Nouvelle-Calédonie

Sarwar et al. (2017) (Sarwar et al. 2017) affirment que les pollutions métalliques ont longtemps été ignorées car la dégradation des sols qu'elles engendrent est un processus lent et invisible dans l'instant. Elles sont causées par divers secteurs industriels (mines, fonderies...), mais aussi par l'agriculture intensive (intrants chimiques contenant des ETMs comme As, Fe, Cd) (Figure 1.7).

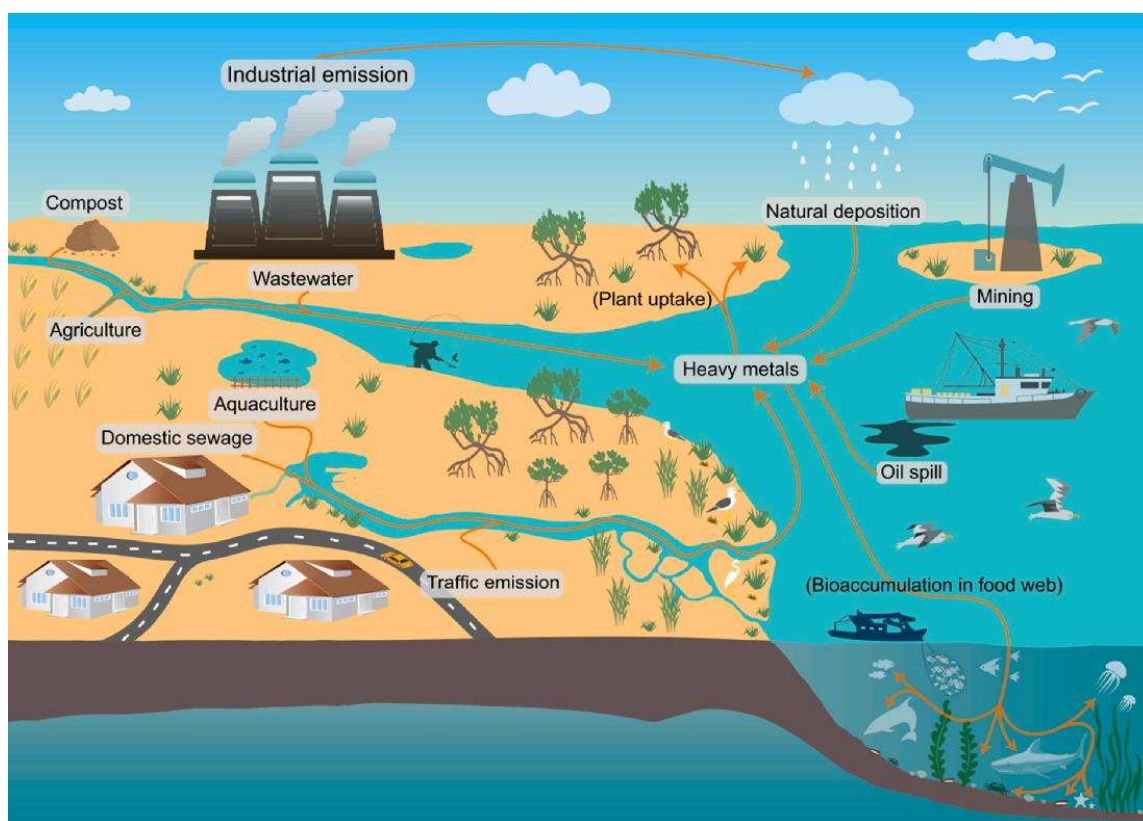


Figure 1.7: Sources anthropogéniques de contaminations aux ETMs dans les zones côtières.

(d'après Li, C. et al., 2022, (Li et al. 2022))

Bien que les milieux côtiers en général abritent une riche biodiversité et soient classés parmi les écosystèmes les plus productifs, ils ont pendant de nombreuses années été considérés comme des zones de peu d'intérêt agricole, notamment du fait de la non-disponibilité de terres non salées propices à l'agriculture conventionnelle (Poljakoff-Mayber and Gale 1975). L'expansion urbaine, mais aussi les actions de dragage, de mise en décharge, de dépôt de déblais et de conversion à l'aquaculture, ou encore de l'extraction de sédiments et l'érosion sont des pressions importantes qui modifient

drastiquement le paysage et impactent la biodiversité (Burke et al. 2001). Concernant le déversement de polluants, notamment des ETMs, ces milieux jouent un rôle de filtration et de rétention des sédiments entre la terre et la mer. Cependant, les niveaux de pollution et les pressions s'exerçant sur ces milieux sont tels qu'on assiste à une dégradation ou altération de presque la totalité de ces zones humides (estuaires, marais, mangroves...).

En Nouvelle-Calédonie, même si les ressources naturelles sont moins exploitées que dans d'autres régions du monde (Marchand et al. 2008), les zones littorales sont souvent utilisées comme dépotoirs. De plus, l'activité minière et le développement de l'aquaculture dans ces milieux contribuent à leur fragilisation (Della Patrona 2016). D'après Gabrie et al. (2008) (Gabrie et al. 2008), l'érosion est l'une des pressions majeures qui s'exerce sur environ 70% du littoral de la Grande Terre. Elle touche en particulier la côte Ouest (Figure 1.8). Le Ni, le Co, le Cr et le Mn sont les principaux ETMs rencontrés dans ces pollutions. La mise à nu des sols des maquis miniers étant la première cause de pollution des bassins versants, de nombreux projets de revégétalisation visant à fixer les sols et limiter l'érosion sont mis en place depuis plusieurs années. Cependant, le rythme de revégétalisation (de 30-40 ha/an), annoncé par (Laroche 2011), serait insuffisant pour freiner significativement le flux des contaminants.

La pollution des rivières, des estuaires et du lagon pose de réels enjeux socio-économiques et écologiques pour la Nouvelle-Calédonie (Latham et al. 1978; Dumas and Cohen 2014). En effet, les zones côtières sont celles où la population néo-calédonienne et les activités économiques se concentrent. De plus, la Nouvelle-Calédonie est un hotspot de biodiversité mondiale, par conséquent, prioritaire en terme de conservation d'espèces (Richer, Forges and Pascal 2008; Dumas and Cohen 2014). Elle détient des ressources marines exceptionnelles, qui lui valent l'admission d'une partie de son lagon au patrimoine mondial de l'UNESCO depuis juillet 2008 (<https://whc.unesco.org/fr/list/1115/documents/>). De plus, la création du parc naturel de la mer de Corail en 2014 permet de protéger officiellement 1,3 millions de km² de zones maritimes (Dumas and Cohen 2014), ce qui implique des mesures de prévention et de surveillance fortes face aux menaces pesant sur ces écosystèmes.

D'après Dumas and Cohen (2014)(Dumas and Cohen 2014), les activités économiques liées au milieu marin (pêche, aquaculture, écotourisme...) seraient vouées à compléter progressivement le « tout nickel », d'où une nécessité urgente de limiter le transfert des contaminants vers la mer (Latham et al. 1978; Garcin et al. 2013; Dumas and Cohen 2014; Gunkel-Grillon et al. 2014; Allenbach et al. 2015).

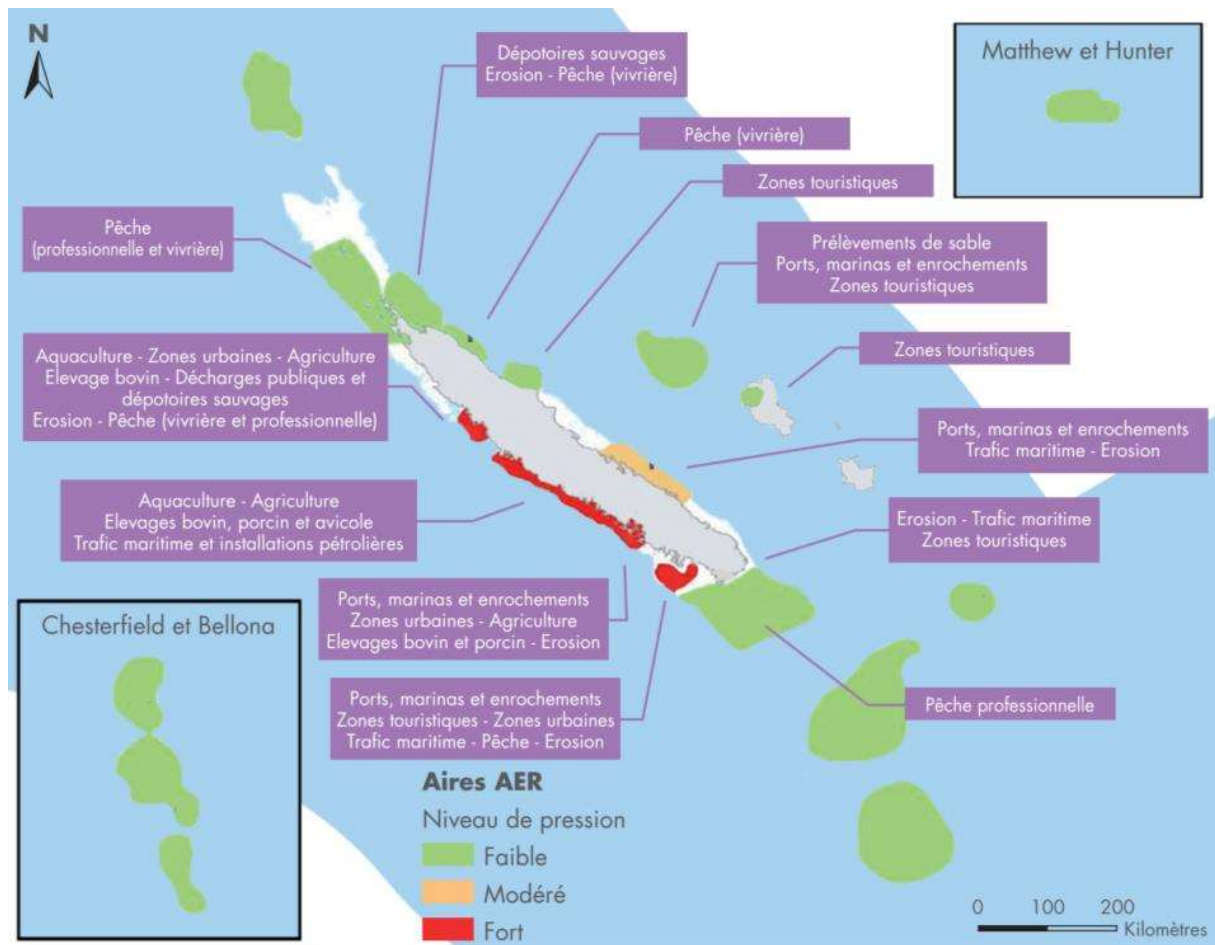


Figure 1.8: Pressions s'exerçant sur les milieux côtiers en Nouvelle-Calédonie. (d'après ((Gabrie et al. 2008) ; Gouvernement de la Nouvelle-Calédonie 2013)

1.2.2.4. Principaux Risques biologiques liés aux pollutions aux ETMs

La mangrove est une zone tampon où s'accumulent les ETMs. Ces derniers peuvent être rapidement libérés par la modification de certains paramètres environnementaux comme la salinité ou la période de sécheresse (Tripathi et al. 2022). Dans le lagon de Nouvelle-Calédonie, et en particulier dans les milieux soumis aux MES provenant des maquis miniers, le Ni, Co, Cr et le Mn se retrouvent dans les différents niveaux trophiques, de la matière organique jusqu'aux prédateurs (Marine J Briand et al. 2018). La survie des organismes vivants dans ces milieux (phytoplancton, animaux marins...) est alors menacée par les effets toxiques des ETMs, mais aussi par la diminution de l'accès à la lumière résultant de l'augmentation de la turbidité de l'eau et l'hypersédimentation engendrée par l'érosion (Tripathi et al. 2022). D'autre part, la hausse des températures de l'eau liée au changement climatique augmente la solubilité des ETMs, ajoutant alors une pression supplémentaire sur ces organismes, et en particulier sur les récifs coralliens dont le blanchiment peut alors être accéléré (Tripathi et al. 2022). Selon les organismes considérés, les ETMs peuvent s'accumuler au fur et à mesure dans différents organes, par ingestion, inhalation ou absorption et peuvent causer diverses maladies (Tripathi et al. 2022). Ces effets sur les écosystèmes et la santé humaine dépendent aussi de l'espèce métallique. En Nouvelle-Calédonie, les ETMs majoritaires des contaminations lagonaires provenant des mines sont : Ni, Co, Cr et Mn. Les effets de ces ETMs sur les organismes et la santé humaine ont été rapportés dans diverses études et sont succinctement présentés ci-après afin de mieux comprendre les potentiels enjeux sanitaires que ces contaminations peuvent représenter.

La solubilisation du **nickel** est contrôlée principalement par les réactions de précipitations avec les oxydes hydratés de Fe et de Mn (Yusuf et al. 2011). Les mécanismes de sa toxicité sont complexes et peu clairs. Néanmoins, sa potentielle cancérogénicité sur les poumons, la gorge, l'estomac, le foie a été rapportée ainsi que sa capacité à causer des mutations. Des effets notables sur les systèmes

immunitaire, hépatique, nerveux, respiratoire, et sur la chute des cheveux sont également relevés (Duda-Chodak and Blaszczyk 2008; Tchounwou et al. 2012; Allenbach et al. 2015). De plus, (Genchi et al. 2020) rapportent des effets épigénétiques du nickel sur le génome humain pouvant conduire à certains cancers.

Le **cobalt** est l'un des ETMs affectant la croissance des coraux en impactant à la fois les zooxanthelles et leurs hôtes (Biscéré et al. 2015). Concernant les effets sur la santé, bien que le corps humain ait besoin d'un certain apport, les effets toxiques du cobalt sur la santé sont connus. (Leyssens et al. 2017) y ont consacré une synthèse bibliographique et relèvent notamment une toxicité à doses sanguines en général supérieures à 300 µg.L⁻¹ chez des individus sains.

Le caractère cancérigène et génotoxique du **chrome** hexavalent a été démontré sur des testicules de rats (Marouani et al. 2012) et sur certains organes de poissons (Tumolo et al.; Mishra and Mohanty 2008). (Ahmed et al. 2013) rapportent également divers effets sur la santé humaine qui dépendent de la façon dont cet élément a été absorbé. Lorsqu'il s'agit d'ingestion d'aliments contaminés, des effets sur le foie, des reins, les systèmes gastro-intestinal et sanguin ont pu être constatés notamment avec l'apparition de cancers liés à son caractère mutagène.

En milieu aquatique, le **manganèse** ionique est présent sous 2 formes : Mn²⁺ et Mn⁴⁺. Ses effets sur les organismes aquatiques ont été recensés dans Howe et al. (2004)(Howe et al. 2004). Globalement, ce métal inhibe la croissance de divers groupes d'organismes (micro- et macroalgues, protozoaires...) et résulte en une perturbation du développement embryonnaire et larvaire de certains poissons et mollusques. Chez l'Humain, ce métal peut être accumulé durablement dans les tissus (8-9 ans) (O'Neal and Zheng 2015). L'exposition au Mn est dangereuse en particulier pour le système nerveux avec des répercussions pouvant être assimilées aux symptômes de la maladie de Parkinson.

En Nouvelle-Calédonie, les rapports de Baudrimont et al. (2019) (Baudrimont et al. 2019) et Germande et al. (2022) (Germande et al. 2022), consacrés en partie à l'évaluation des niveaux de contaminations aux ETM dans la population, montrent des concentrations des quatre ETM élevées dans les urines de certaines personnes, en particulier des enfants. L'étude montre aussi que les sources de contaminations sont multiples, à savoir les poussières, l'eau et l'alimentation.

1.3. STRATÉGIES POTENTIELLES DE TRAITEMENT DES ZONES CÔTIÈRES DE NOUVELLE-CALÉDONIE POUR LUTTER OU PREVENIR LES CONTAMINATIONS MÉTALLIQUES (RÉDACTEUR : P. BONAVENTURE).

1.3.1. CONTRAINTES BIOLOGIQUES DES ETMS CHEZ LES PLANTES

1.3.1.1. Absorption, transport, accumulation des ETMs chez les plantes

Les ETMs représentent une toxicité pour la plupart des organismes, ce qui n'exclue en rien le règne végétal. Cette toxicité dépend de l'espèce métallique, de sa concentration, de ses formes chimiques et également de l'espèce végétale considérée. Leur absorption au niveau des racines peut se faire de manière apoplastique ou symplastique, passive ou active, via certains transporteurs membranaires ou certains canaux (Amari et al. 2017). L'acidité du sol joue un rôle important dans la mobilisation des ETM dans le sol. Un pH acide augmente généralement leur solubilisation dans l'eau interstitielle du sol et donc leur disponibilité pour les racines des plantes (Chibuiké and Obiora 2014). Le calcium peut affecter l'absorption des ETM, positivement ou négativement selon l'espèce, probablement en raison du fait que certains ETM rentrent dans les cellules racinaires en empruntant des canaux à Ca²⁺ ou à K⁺ (Amari et al. 2017). En particulier pour le Ni, l'absorption racinaire peut également être perturbée par d'autres ions avec lesquels il peut rentrer en compétition comme les ions Fe³⁺, Co²⁺, Mg²⁺, NH₄⁺, K⁺ et Na⁺ (Yusuf et

al. 2011). Les ETM peuvent se lier à de nombreuses molécules possédant des groupes fonctionnels divers, et, une fois absorbés au niveau racinaire, leur transport à travers les différents organes des plantes est régulé par différents chélateurs, notamment des acides organiques, certains acides aminés ou encore des peptides. Ils peuvent aussi être chélatés par des métallothionéines (MTs), qui servent à leur transport, leur translocation, et leur accumulation dans les tissus (Amari et al. 2017)

Plusieurs familles de transporteurs membranaires sont connues pour être impliquées dans l'absorption des ETMs et l'homéostasie comme la famille des ZIP (« Zinc/Iron-regulated transporter-like Protein »), ou encore les P1B-ATPases (protéines membranaires qui couplent l'hydrolyse de l'ATP au transport de cations métalliques), les NRAMPs (Natural resistance-associated macrophage proteins), et la famille des CDFs (Cation diffusion facilitators), ou encore les OPTs (Oligopeptide transporters) (Amari et al. 2017). Les protéines transmembranaires ZIP sont connues pour leur rôle dans le transport du Fe, du Zn et du Mn (Guerinot 2000). Les phytochélatines (PCs) sont des polypeptides à faibles poids moléculaires également impliqués dans le transport des ETMs à l'exception de certains comme le nickel d'après Amari et al. (2017) (Amari et al. 2017) et Schat et al. (2002) (Schat et al. 2002).

A un niveau non toxique, certains ETM comme le nickel servent à produire des métalloenzymes utiles pour l'assimilation d'éléments métalliques nécessaires à leur métabolisme. L'absence totale de Ni empêche notamment les plantes de compléter leur cycle de vie (Amari et al. 2017). Concernant ce métal, des concentrations supérieures à 10 mg kg⁻¹ de matière sèche dans les tissus des plantes sensibles, ou 50 mg kg⁻¹ pour les espèces tolérantes entraînent chez la plupart d'entre elles des dégâts à différents niveaux biologiques (Amari et al. 2017).

1.3.1.2. Toxicité des ETMs chez les plantes

A forte dose, les ETMs s'accumulent dans les tissus et induisent une grande variété d'effets toxiques directs et indirects (Figure 1.9).

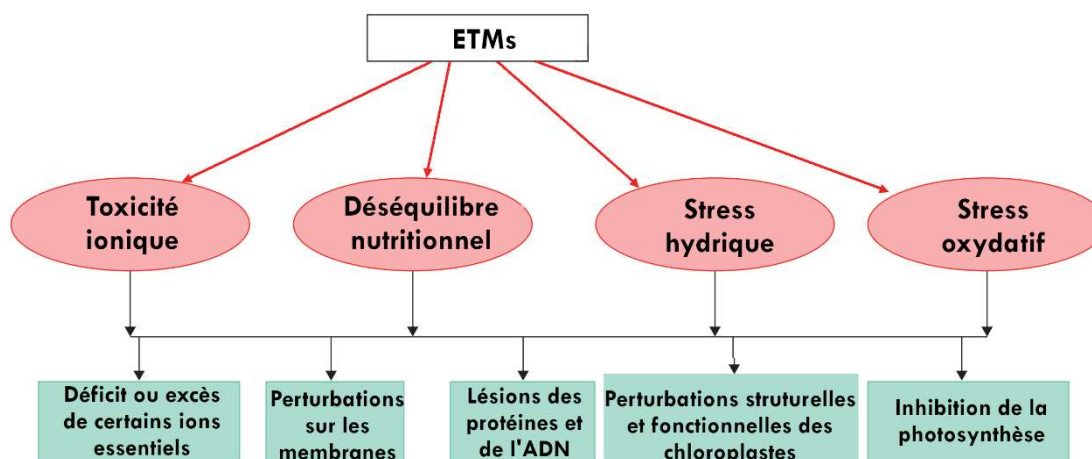


Figure 1.9: Représentation résumée des effets toxiques des ETMs chez les plantes. (d'après Lutts et Lefèvre, 2015 (Lutts and Lefèvre 2015))

La figure 1.9 ci-dessus résume (de manière très simplifiée), les différents effets négatifs des ETM sur les espèces végétales. La description précise de ces effets ne sera pas traitée ici, afin de simplifier la lecture du présent rapport et de se concentrer sur les aspects clés nécessaires au projet METDEP, mais une description plus détaillée peut être retrouvée dans le manuscrit de doctorat de Pauline Bonaventure (Bonaventure 2023).

Pour résumer, il faut retenir que les ETM, à trop fortes concentrations, impactent les plantes qui y sont exposées selon de très nombreuses manières et que leurs effets conduisent progressivement à la

détérioration des fonctions vitales de la plante. Cette dernière sera finalement impactée à différents niveaux et présentera alors divers symptômes, signes de son déclin (réduction de la taille et du nombre des vaisseaux du xylème, réduction de la taille des feuilles, réduction du nombre de stomates et de leur taille, nécrose ou jaunissement des feuilles...) (Amari et al. 2020). Cependant, les plantes luttent pour se défendre contre ces stress métalliques, de multiples façons.

De manière générale, les plantes répondent au stress métallique en activant des systèmes de défense antioxydants coûteux en énergie, en produisant des agents chélateurs, ou encore en déclenchant des mécanismes impliqués dans le maintien des fonctions cellulaires vitales, ce qui empiète sur le métabolisme « normal » de la plante. Chez certaines plantes, ces mécanismes de défense sont particulièrement renforcés et leur confèrent des propriétés de tolérance aux ETM pouvant être utilisées dans les techniques de dépollution (phytoremédiation). Parmi ces mécanismes de défense, on trouve notamment l'association avec des microorganismes bénéfiques à la plante (microorganismes à effets PGP : « Plant Growth Promoting », eux-mêmes adaptés aux ETM et pouvant également être sources d'applications intéressantes (bioremédiation ; phytoremédiation bio-augmentée ; restauration écologique ; agriculture durable - pour n'en citer que quelques-unes).

1.3.2. LA PHYTOREMÉDIATION

1.3.2.1. Concept et définitions

Le terme « remédiation » désigne l'ensemble des techniques d'ingénierie employées pour dépolluer un milieu. Différentes dénominations sont utilisées en fonction du traitement appliqué : la remédiation par filtration, la remédiation électrique, chimique ou électrochimique où les polluants (métalliques par exemple) pourront être précipités, la remédiation thermique, et la remédiation biologique ou plus communément bioremédiation (Lutts et al. 2016; Z. Liu et al. 2018).

Compte tenu de l'étendue des dégradations, l'Union Européenne affirme à travers la Commission du 5 juillet 2023 vouloir renforcer son engagement pour la remise en état de ses sols (European Commission 2023) notamment en soutenant davantage les activités de recherche, de surveillance, de traitements et de restauration des sols. En 2020, la France a dépensé environ 2,3 milliards d'euros dans le secteur de la dépollution des eaux et des sols (Portail de l'information publique environnementale, 2023). Depuis plusieurs années, les scientifiques s'intéressent à la bioremédiation en raison des avantages économiques et écologiques qu'elle offre. Outre le faible coût de mise en application, elle propose des techniques plus durables et plus respectueuses de l'environnement. Le secteur de l'innovation est d'ailleurs de plus en plus encouragé à résoudre les problèmes de pollution en s'inspirant du vivant (Solutions Fondées sur la Nature). A titre d'exemple, Saxena et al. (2019)(Saxena et al. 2019) rapportent plusieurs programmes notamment portés par les États-Unis ou l'Union Européenne visant à préciser la faisabilité de la phytoremédiation afin d'en permettre des applications concrètes à grande échelle (Superfund Innovative Technology Evaluation (SITE) (US), Phytosudoe (UE), Life RiverPhy (UE)).

Les méthodes de bioremédiation utilisent directement des propriétés du vivant en utilisant des matériaux/substrats biologiques capables d'adsorption passive par exemple (écorce, paille, coquille de noix, biochar, microorganismes inactivés...), ou bien des êtres vivants capables de dépolluer activement un milieu (plantes vasculaires, algues, fougères, microorganismes...) (Lutts et al. 2016; Zheng et al. 2018). Pour optimiser la décontamination des sols, les organismes peuvent être vivants et/ou morts, entiers ou bien à l'état de débris. A titre d'exemple, Houzelot et al. (2018) (Houzelot et al. 2018) étudient les propriétés chélatrices des cendres d'une plante hyperaccumulatrice *Alyssum murale*, connue pour accumuler certains ETM. Par ailleurs, Lutts et al. (2016) (Lutts et al. 2016) montrent que les poudres de racines de *Kosteletzkyia pentacarpos*, connue pour ses capacités d'accumulation des ETM, sont efficaces pour chélater et retenir le Zn et le Cd dans une solution aqueuse. Ainsi, malgré la toxicité avérée des ETM pour les plantes, certaines ont développé des adaptations leur permettant de résister ou de tolérer la présence de concentrations élevées en ETM.

La phytoremédiation, qui utilise les capacités accumulatrices de certaines plantes, est un concept apparu il y a déjà plus de 300 ans (Raymond A. Wuana and Okieimen 2011) et a déjà montré des résultats intéressants dans certains pays impactés par les pollutions métalliques. Elle présente également l'avantage de revégétaliser les milieux, d'apporter une meilleure stabilité du sol et de réduire le risque d'érosion (Sepulveda et al. 2020). La phytoremédiation regroupe des techniques de phytoextraction, de phytostabilisation, toutes les deux indiquées pour lutter contre les contaminations du sol, mais aussi de phytovolatilisation, et de phytotransformation, plutôt adaptées aux pollutions des milieux aquatiques (Figure 1.10).

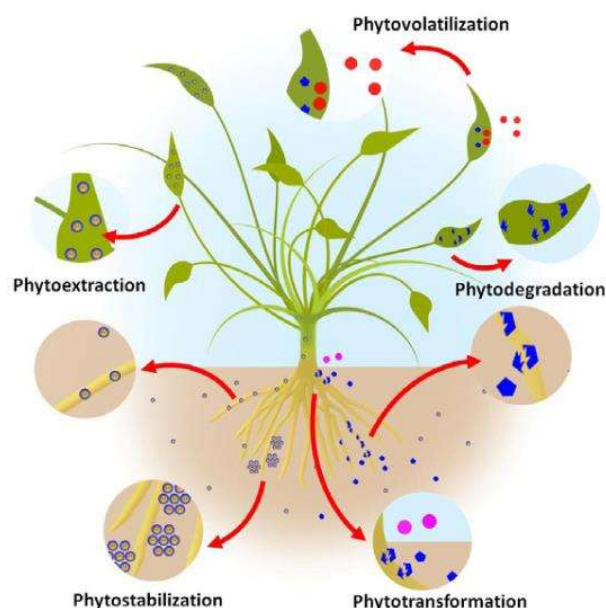


Figure 1.10: Différentes approches de phytoremédiation. d'après (Parmar, S., & Singh 2015)

Nous nous concentrerons ici essentiellement sur la phytoextraction et la phytostabilisation qui sont les deux procédés les plus adaptés à la dépollution des sols contaminés aux ETMs et également les plus investigués dans ce contexte.

La **phytoextraction** des ETM utilise des plantes capables de retirer les contaminants métalliques du sol en les stockant dans leurs parties aériennes. Pour obtenir des résultats significatifs, le choix des espèces végétales doit respecter un certain nombre de critères (Khan et al. 2017; Saxena et al. 2019). Les plantes doivent notamment résister à des concentrations élevées en ETM, avoir une forte aptitude à accumuler le ou les ETM à décontaminer, et plus particulièrement, elles doivent les transloquer dans les parties aériennes de manière importante. Les paramètres de croissance (taux de croissance, biomasse, vigueur du système racinaire, nombre et surface des feuilles...), ainsi que la résistance aux maladies sont pris en compte dans l'élaboration de ce type de bioingénierie (Raymond A. Wuana and Okieimen 2011; Hasanuzzaman et al. 2014). D'après la revue de Sarwar et al. (2017), les plantes dites « multi-cut », c'est-à-dire permettant plusieurs récoltes en une seule période de croissance (Hazrat Ali 2012), sont des plantes particulièrement recherchées pour la phytoextraction, car leur croissance rapide et leur petite taille facilitent la récolte, plusieurs fois par an, des organes accumulateurs aériens.

La **phytostabilisation** ou **phytoimmobilisation** est une des autres techniques intéressantes pour la dépollution des sols contaminés par les ETM. Elle permet d'immobiliser et d'inactiver les ETM dans le sol, d'éviter leur lessivage et leur entrée dans les chaînes trophiques. Par des mécanismes comme la précipitation, l'absorption racinaire ou la complexation à l'intérieur des cellules du cortex racinaire, cette technique vise à réduire la solubilité des ETM et donc leur biodisponibilité (Raymond A. Wuana and Okieimen 2011; Sarwar et al. 2017). Bien que cette méthode présente des limites, en raison de la persistance des ETM dans le sol, elle est plus aisée à mettre en œuvre (Sarwar et al. 2017; Mousavi Kouhi and Moudi 2020). En effet, la phytoextraction exige des critères bien plus stricts dans la mesure où les ETM doivent se trouver en majorité dans les parties aériennes, ce qui est plus stressant pour les plantes. La phytostabilisation, quant à elle, mobilise tout aussi bien des mécanismes de résistance qui

limitent l'absorption des ETM dans les racines et les immobilisent dans le sol, que des mécanismes d'absorption et de bioconcentration des ETM dans les racines (Raymond A Wuana and Okieimen 2011). Ces facultés sont plus largement répandues et les plantes candidates à la phytostabilisation sont donc plus nombreuses.

En utilisant de telles plantes pour dépolluer un milieu, la phytoremédiation présente l'avantage d'améliorer les propriétés du sol, voire des eaux près desquelles elles agissent. La prolifération des racines joue notamment un rôle dans l'agrégation du sol, elle améliore les flux nutritifs et les propriétés hydrauliques grâce à la création de macropores dans le sol. Cette technique permet aussi le recrutement de microorganismes agissant sur la compaction du sol et la simple revégétalisation des terrains limite l'érosion (Hasanuzzaman et al. 2014). La phytoremédiation et les techniques de bioremédiation doivent cependant être élaborées en tenant compte du contexte local. En effet, l'applicabilité de ces techniques dépend non seulement des espèces végétales et de leur tolérance aux ETM ciblés, de leur mode de multiplication, mais également du niveau de contamination du site, du contexte socio-économique, des équipements agricoles disponibles et, de manière générale, des connaissances sur le sol à décontaminer et des usages qu'en font les populations. Parfois, les plantes peuvent être une source de relargage de ETM dans l'environnement, comme observé lors de la senescence de feuilles ayant accumulé des ETM (Burke et al. 2000; Garbisu and Alkorta 2001) et la translocation des ETM vers les feuilles peut alors ne pas être un bon critère (Van Nevel et al. 2007). Il est par conséquent nécessaire de multiplier les études pour développer des opérations de dépollution adaptées et efficaces (Raymond A Wuana and Okieimen 2011). Dans ce dernier cas de figure, certains ingénieurs ont par exemple élaboré des techniques de recyclage des parties accumulatrices où les résidus peuvent être revalorisés dans les industries chimiques (Stanovych et al. 2017; Richards K 2021).

Afin d'augmenter son efficacité, la phytoremédiation peut être combinée à d'autres techniques de remédiation. Ainsi, de nouveaux concepts sont étudiés en combinant différentes techniques comme l'association de plantes accumulatrices à des agents chélateurs chimiques ou organiques facilitant l'absorption et l'accumulation des ETM (acide tétra acétique éthylène diamine (EDTA), acide tétra acétique glycol éthylène (AGTA), acide salicylique...) (Sarwar et al. 2017). Leur utilisation est néanmoins discutable, car outre leur coût souvent élevé, ces composés sont la plupart du temps non biodégradables.

La bio-augmentation ou l'utilisation d'inocula microbiens pour optimiser l'extraction ou la stabilisation des ETM est une autre solution émergente et prometteuse, du fait de son faible coût et de ses avantages écologiques. Cette dernière implique cependant la connaissance et l'utilisation de microorganismes cultivables bénéfiques à la plante en termes de croissance et/ou de résistance aux ETM. Une fois ces microorganismes isolés et caractérisés, leurs effets PGP, leurs résistances aux ETM peuvent être mis à profit pour faire de la phytoremédiation bio-augmentée, de la restauration écologique plus efficace, mais aussi, pour développer des techniques innovantes de décontamination des environnements contaminés aux ETM, notamment les eaux. Ces aspects, correspondant au chapitre 2 du projet METDEP, seront publiés sous la forme d'une revue bibliographique.

1.3.2.2. Phytoremédiation des zones côtières contaminées par les ETM

1.3.2.2.1. Les zones intertidales : définitions générales et état de santé des écosystèmes côtiers

Les milieux de bord de mer représentent 20% de la surface totale des continents (Martínez et al. 2007; Barbier et al. 2011). Les milieux que l'on qualifie de supratidaux, c'est-à-dire au-dessus de la limite de la marée haute, rassemblent les dunes, les falaises, les rivages rocheux et sablonneux et les habitats xéromorphiques côtiers (Burke et al. 2001). Les milieux intertidaux désignent les estuaires, les deltas, les lagunes, vasières, ou encore les marais salants, les salines, et autres zones humides côtières (Burke et al. 2001). La zone intertidale est une zone de balancement des marées. L'alternance des marées induit une fluctuation des durées d'immersion/exondation et donc des conditions d'humidité et d'anoxie,

de salinité et de température, ce qui structure les communautés végétales, animales et microbiennes. Ces paramètres environnementaux apparaissent comme des contraintes auxquelles les organismes de ces milieux se sont adaptés. En milieu tropical et subtropical, les zones intertidales sont caractérisées par la présence de forêts de mangrove plus ou moins hétérogènes dans le couvert végétal. Ces formations représentent 75% des littoraux tropicaux et subtropicaux (Holguin et al. 2001). Les mangroves sont les milieux essentiels à la stabilité des côtes face aux intempéries, car elles les protègent des événements météorologiques destructeurs tels que les cyclones. Elles servent de zone tampon vis-à-vis de la houle et assurent le cycle des nutriments ainsi que la filtration des sédiments et des éléments provenant des zones en amont. Ce sont d'excellents puits de carbone et elles sont donc particulièrement importantes dans le contexte de changement climatique actuel (Marchand et al. 2008; Della Patrona 2016). De plus, elles sont indispensables aux écosystèmes marins et côtiers et donc aux activités économiques liées à la mer (Marchand et al. 2008; Della Patrona 2016). En Nouvelle-Calédonie (Figure 1.11, A), la succession écologique des mangroves est marquée par la primo-colonisation des bords de mer par des palétuviers de type *Rhizophora* puis, au fur et à mesure qu'ils stabilisent les sédiments et contribuent à leur accumulation, ces arbres facilitent l'installation d'autres palétuviers de type *Avicennia* qui les remplacent progressivement sur le transect terre-mer (Figure 1.11, B).

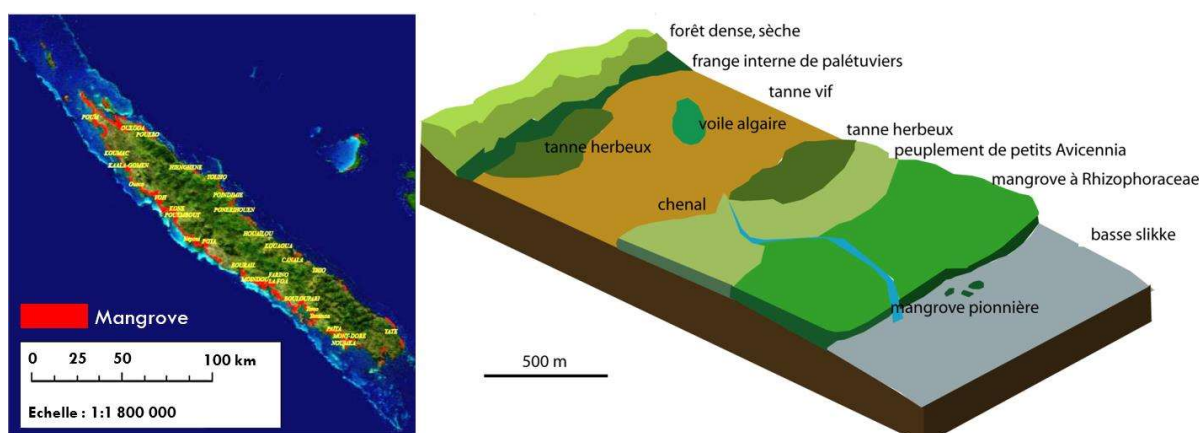


Figure 1.11: Habitats des milieux côtiers de la Nouvelle-Calédonie. Localisation des mangroves en Nouvelle-Calédonie (Virly 2008). B. Succession des habitats côtiers au sein d'un marais à mangrove en Nouvelle-Calédonie (Marchand et al. 2008).

Ces derniers vont à leur tour favoriser l'accumulation de sédiments (Marchand et al. 2008). Au fil du temps, cette zone finira par s'assécher en amont de la mangrove et se transformer en un habitat plus ouvert. Ce dernier est caractérisé par un sol hydromorphe et colonisé par une végétation basse, palustre et buissonnante, plus ou moins clairsemée ou par un sol totalement dénudé (Marchand et al. 2008). Il s'agit d'un **tanne** ou pré-salé d'arrière mangrove (Dumas 2004; Lebigre 2004). Lebigre (2004)(Lebigre 2004) les définit comme étant : « des surfaces nues (tannes vifs) ou couvertes de plantes de petite taille » (tannes herbeux), « formées naturellement aux dépens de la mangrove ». Ces tannes représentent 27% des écosystèmes de mangrove en Province Sud contre 23% en Province Nord (Haouet et al. 2016) et correspondent à un total 9 200 ha (Della Patrona 2016). Les tannes (ou « salt marshes » en anglais) sont soumis à un taux d'évaporation important ce qui augmente la salinité dans le sol. Sur cette zone, les palétuviers ne se développent pas. Les tannes herbeux sont constitués d'une végétation fortement adaptée aux contraintes de salinité (Figure 1.12, B). Sur un tanne dit « vif » (Figure 1.12, A), la végétation peut être très clairsemée voire absente. Sur ces derniers, la surface du sol est recouverte d'un voile de cyanobactéries qui forme une couche épaisse (Marchand et al. 2008).

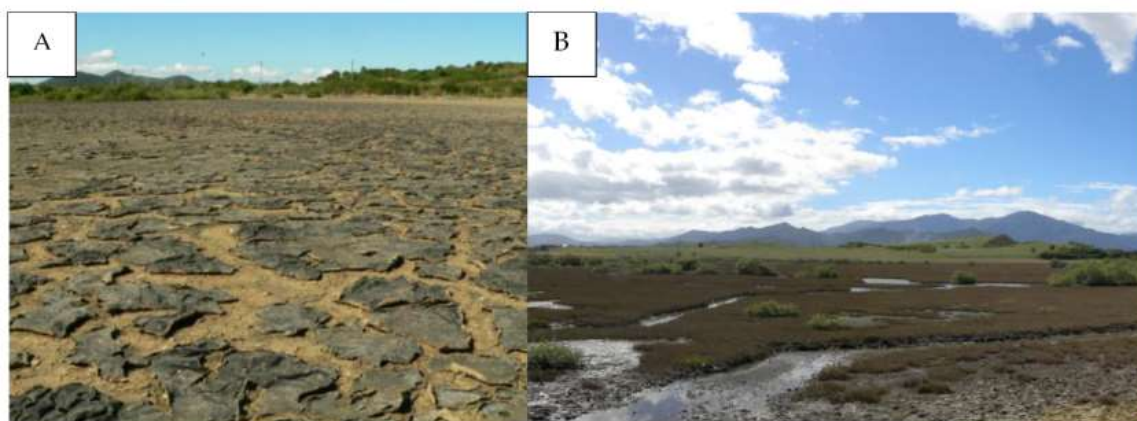


Figure 1.12: Les tannes en Nouvelle-Calédonie. Tanne nu recouvert par des cyanobactéries (Photo : Auteur inconnu, (Marchand et al. 2008). B. Tanne herbeux de la région de Boulouparis (Photo : Auteur inconnu, (Della Patrona 2016).

En raison de sa position géographique et de la présence d'une chaîne montagneuse, la Grande Terre possède deux côtes climatiquement distinctes avec, à l'Est, une zone dite « côte au vent » caractérisée par des pluies plus abondantes et, à l'Ouest, une zone « sous le vent », soumise à une pluviosité plus faible (Marchand et al. 2008). Cette différenciation climatique induit une répartition des zones de mangrove différente entre l'Ouest et l'Est de la Grande Terre (Marchand et al. 2008). En outre, 88% des mangroves sont localisées sur la côte Ouest où la diversité des plantes de bord de mer est plus forte (Figure 1.13) (Della Patrona 2016). La côte Est comprend des plantes de la famille des Cypéracées tandis que la côte Ouest possède d'autres familles avec des plantes plutôt succulentes (Duke et al. 2010).

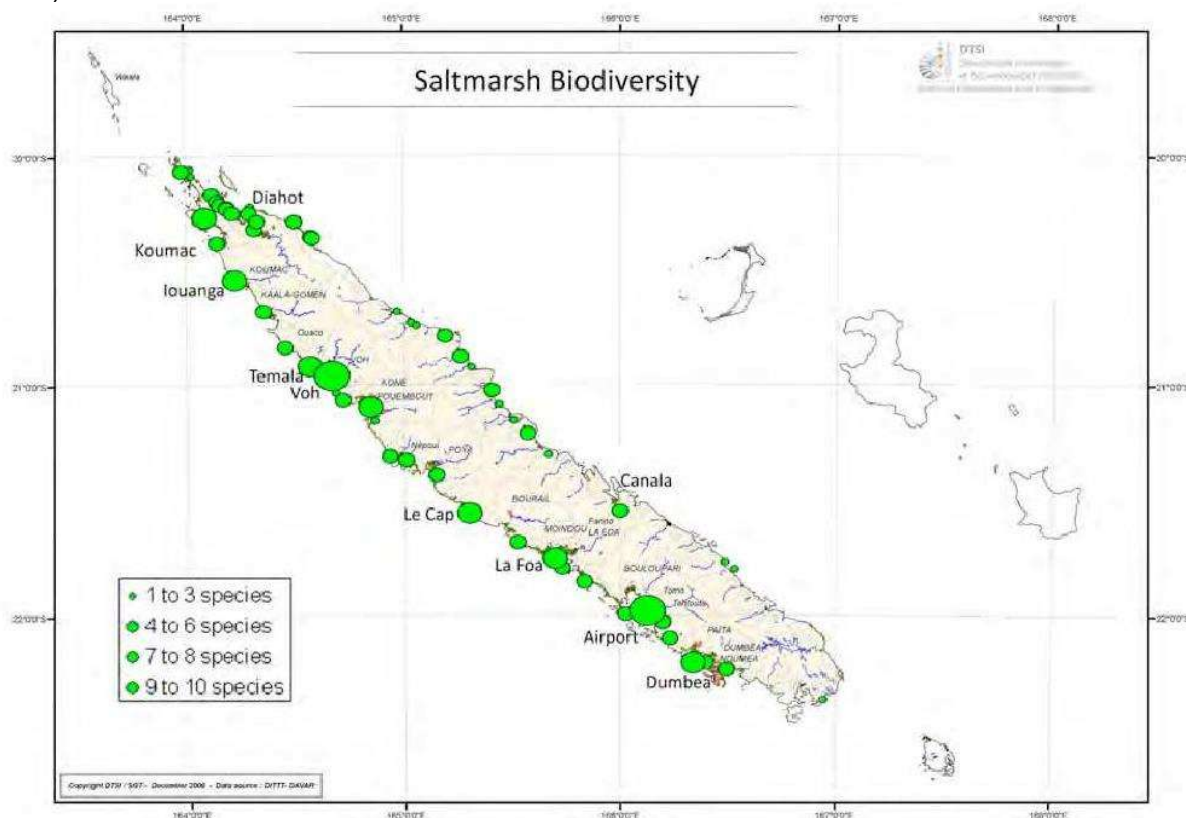


Figure 1.13: Biodiversité des espèces halophytes sur 92 sites échantillonnés (Duke 2010).

Trois grandes strates se répartissent selon le gradient terre-mer, avec une succession de mangrove à *Rhizophora*, puis à *Avicennia*, suivie par des tannes (Della Patrona 2016). C'est dans ces derniers que la phytoremédiation des ETM pourrait être envisagée en Nouvelle-Calédonie pour limiter le transfert des ETM vers le milieu marin.

Della Patrona (2016) a recensé 29 espèces de plantes herbacées à semi-ligneuses, appartenant à 25 genres et 15 familles distinctes, présentes dans les tannes de Nouvelle-Calédonie. L'étude de Duke (2010) montre que les espèces *Sarcocornia quinqueflora* (Amaranthacées), *Suaeda australis* (Amaranthacées), *Sesuvium portulacastrum* (Aizoacées) sont présentes sur respectivement, 18, 15 et 30 % des 82 tannes recensés et dominent les zones intertidales basses. En remontant vers la terre, on retrouve des espèces telles que *Salsola kali*, *Atriplex jubata* et *Limonium tetragonum* (Plumbaginacées) puis des Cypéracées telles que *Sporobolus virginicus* dans les zones supratidales moins soumises au marnage. Cette dernière est présente sur 58 % des tannes étudiés par Duke (2010), et est distribuée sur la côte est et la côte ouest de la Grande Terre. Par ailleurs, d'après Della Patrona (2016), *S. quinqueflora*, *S. portulacastrum* et *S. australis* seraient les espèces de bord de mer majoritaires des tannes de la côte ouest. Les salicornes ne seraient distribuées que dans la partie sud de la Grande Terre tandis que *S. australis* et *S. portulacastrum* sont distribuées du nord au sud en colonisant différents habitats de l'estran selon la latitude (Figure 1.14) (Della Patrona 2016).

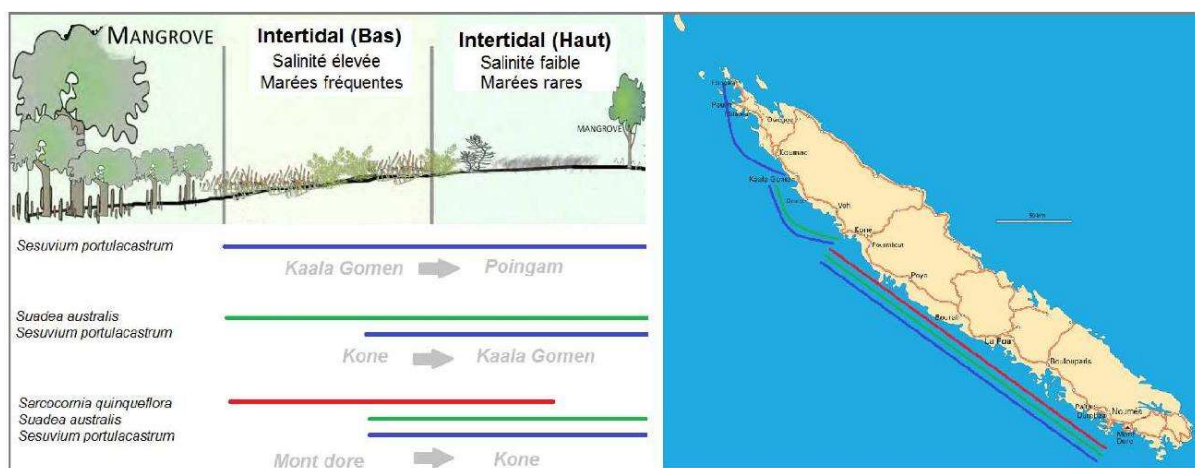


Figure 1.14: Répartition géographique des trois principales halophytes de la côte Ouest : *Sarcocornia quinqueflora*, *Suaeda australis*, *Sesuvium portulacastrum*. A noter l'appauvrissement spécifique Sud Nord et le glissement « tidal » de la répartition des peuplements (d'après Della Patrona 2016).

Certaines de ces espèces ont déjà été étudiées pour leur potentiel dans la phytoremédiation de sols salins pollués par les ETM. *Sesuvium portulacastrum* aurait en particulier des capacités importantes d'accumulation du Ni dans les feuilles, pouvant aller jusqu'à 700 mg.kg⁻¹ (Ghnaya et al. 2007; Wali et al. 2015; Fourati et al. 2016; Fourati et al. 2020). Vårhammar et al. (2019) (Vårhammar et al. 2019) ont également observé une accumulation dans les racines de certains ETM (Zn, Cu, Pb, Cd) chez *Sarcocornia quinqueflora*.

1.3.2.2.2. Communautés végétales des milieux côtiers : les halophytes

Les « halophytes » sont des plantes qui se retrouvent dans les zones de bord de mer et les déserts, et sont capables de compléter leur cycle de vie en présence d'environ 200 mM NaCl (Flowers and Colmer 2008), soit une conductivité électrique du sol d'environ 20 dS.m⁻¹.

Grâce à un système de transport des ions Na⁺/Cl⁻ particulièrement efficace, une forte capacité de séquestration dans des compartiments spécifiques, et un contrôle fin des concentrations osmolytiques, ces halophytes peuvent vivre dans des conditions salines parfois extrêmes. Shabala (2013) (Shabala 2013) rapportent par exemple que *Atriplex nummularia* peut accumuler entre 20 et 40 % de NaCl dans sa matière sèche lorsqu'elle est irriguée avec de l'eau salée. Du fait de ces adaptations très poussées

à l'un des stress les plus communs chez les plantes, les halophytes répondent à un problème majeur de salinisation des terres agricoles, et ont été par conséquent largement étudiées ces dernières années. L'accumulation de connaissances sur ces plantes a fait émerger d'autres propriétés intéressantes dans le domaine médical, de l'énergie verte (Hasanuzzaman et al. 2014), de la revégétalisation (Joshi et al. 2012) et de la dépollution des sols (Naikoo et al. 2020; Aziz and Mujeeb 2022). En effet, ces adaptations leur confèrent des capacités de tolérance aux ETM (Lutts and Lefèvre 2015; Nikalje et al. 2019; Amari et al. 2020; Naikoo et al. 2020; Sepulveda et al. 2020; Alam et al. 2021; Aziz and Mujeeb 2022). Depuis plusieurs décennies, elles sont ainsi étudiées pour leurs capacités à résister à de multiples stress, et notamment à accumuler et stabiliser les ETM dans le sol. Leur potentiel en phytoremédiation des ETMs a été souligné dans de nombreux articles expérimentaux et de synthèse (pour revue voir (Singh et al. 2023)).

Pour l'ensemble de ces raisons, des études préliminaires (voir Chapitre 3 du présent rapport) ont été menées en 2018 par notre équipe de recherche, sur plusieurs espèces d'halophytes présentes en Nouvelle-Calédonie afin d'en explorer les éventuelles possibilités de phytoremédiation sur les estuaires et zones côtières contaminées par les sédiments miniers : *Sesuvium portulacastrum*, *Suaeda australis*, *Sarcocornia quinqueflora* et *Sporobolus virginicus*. Ces plantes avaient été échantillonnées sur deux zones de tannes, l'une vierge de contaminations aux ETM ; l'autre impactée par des sédiments chargés en ETM, et présentant une couleur rouge (Figure 1.15). Les analyses de sols ont confirmé une contamination aux ETM dans le tanne "rouge" (Tableau 3.1) et les analyses des végétaux ont montré d'importantes concentrations en Ni, Co, Cr et Mn dans les parties aériennes et racinaires (Tableau 3.2; Majorel et al., données non publiées).

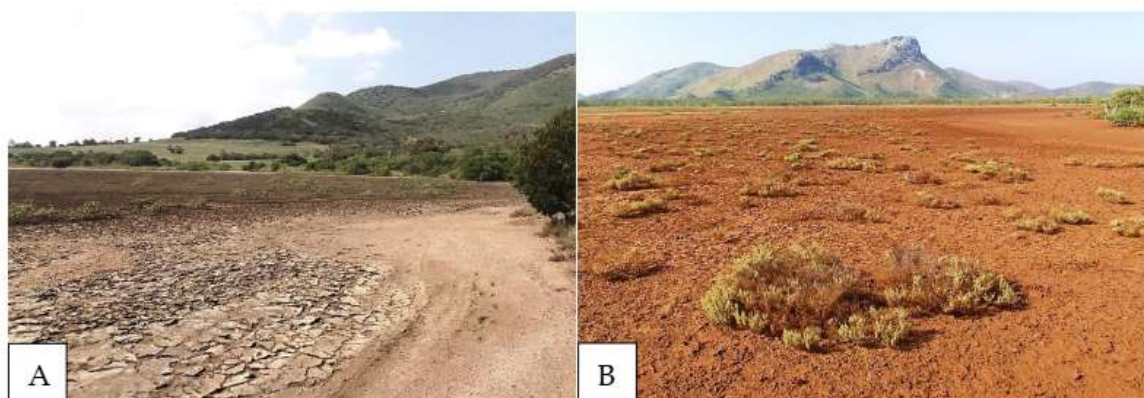


Figure 1.15 : Sites de l'échantillonnage de 2018 localisés sur l'estuaire de la baie de St Vincent, La Tontouta. A. Tanne à priori non ou faiblement impacté par les sédiments miniers (Photo : © C. Majorel). B. Tanne rouge impacté par les sédiments métallifères (Photo : © C. Majorel).

1.3.2.3. Contribution des microorganismes associés aux halophytes à la phytoremédiation des ETM (et autres applications).

Les plantes s'associent naturellement aux microorganismes pouvant leur procurer des avantages nutritionnels ou adaptatifs et notamment les aider à faire face à différents stress. Le terme « holobionte » est utilisé pour décrire l'association d'un hôte (ici une plante) avec son cortège microbien (Vandenkoornhuys et al. 2015).

En raison de la tolérance qu'il peut lui conférer, le microbiome d'une plante est parfois considéré comme « son deuxième génome » (Turner et al. 2013). Dans les milieux salins, Margesin and Schinner (2001) (Margesin and Schinner 2001) ont souligné la richesse des adaptations biologiques que possèdent les microorganismes halophiles. Ces adaptations peuvent alors être exploitées pour développer des biotechnologies et les microorganismes halophiles sont ainsi souvent étudiés à des fins de valorisation industrielle. Définie plus largement par Khan et al. (2020)(Khan et al. 2020) comme étant l'ajout *in situ* ou *ex situ* d'enzymes ou d'organismes ayant des propriétés facilitant la bioremédiation de milieux

pollués, le terme de « bio-augmentation » peut aussi désigner l'utilisation de microorganismes pour assister et améliorer l'efficacité de phytoremédiation (Haferburg and Kothe 2010; Teixeira et al. 2014). En effet, certains microorganismes peuvent diminuer les stress liés à la salinité et aux ETM, améliorer la croissance et induire des mécanismes de tolérance chez les plantes auxquelles ils sont associés. Ces microorganismes dits **promoteurs de la croissance** ou **PGP** (« plant growth promoting ») sont fréquemment étudiés dans ce cadre à travers une grande variété de tests de laboratoire ciblant la détection de certaines phytohormones, de métabolites, de substances chélatrices, en caractérisant l'activité de certaines enzymes antioxydantes, leurs capacités à réguler les gènes des plantes, ou encore en recherchant des aptitudes à faciliter l'accès aux nutriments pour les plantes. De nombreuses études montrent l'intérêt d'utiliser des microorganismes endosphériques non symbiotiques ou encore ceux vivant dans la rhizosphère, à 1 ou 2 mm de la racine (Tkacz and Poole 2021), dans le développement et l'optimisation de techniques de phytoremédiation bioaugmentée. Les microorganismes peuvent coloniser les plantes et leur rhizosphère, sous forme d'associations facultatives avec : des bactéries endophytes, rhizosphériques, des champignons endophytes ou encore des champignons ectomycorhiziens. Elles peuvent également former des symbioses avec des champignons mycorhiziens à arbuscules ou AMF (« arbuscular mycorrhizal fungi ») et déploient des stratégies tout aussi diverses et originales pour faire face aux stress. Les effets des microorganismes symbiotiques et mutualistes sur la croissance des plantes sont bien connus. Leurs bénéfices pour la plante sont multiples (Figure 1.16) dans le cadre de sols salins. En contrepartie, les microorganismes peuvent bénéficier de divers avantages procurés par la plante, comme une protection et une source de carbone via la rhizodéposition (exsudats, mucilage, cellules mortes...) (Jones et al. 2009).

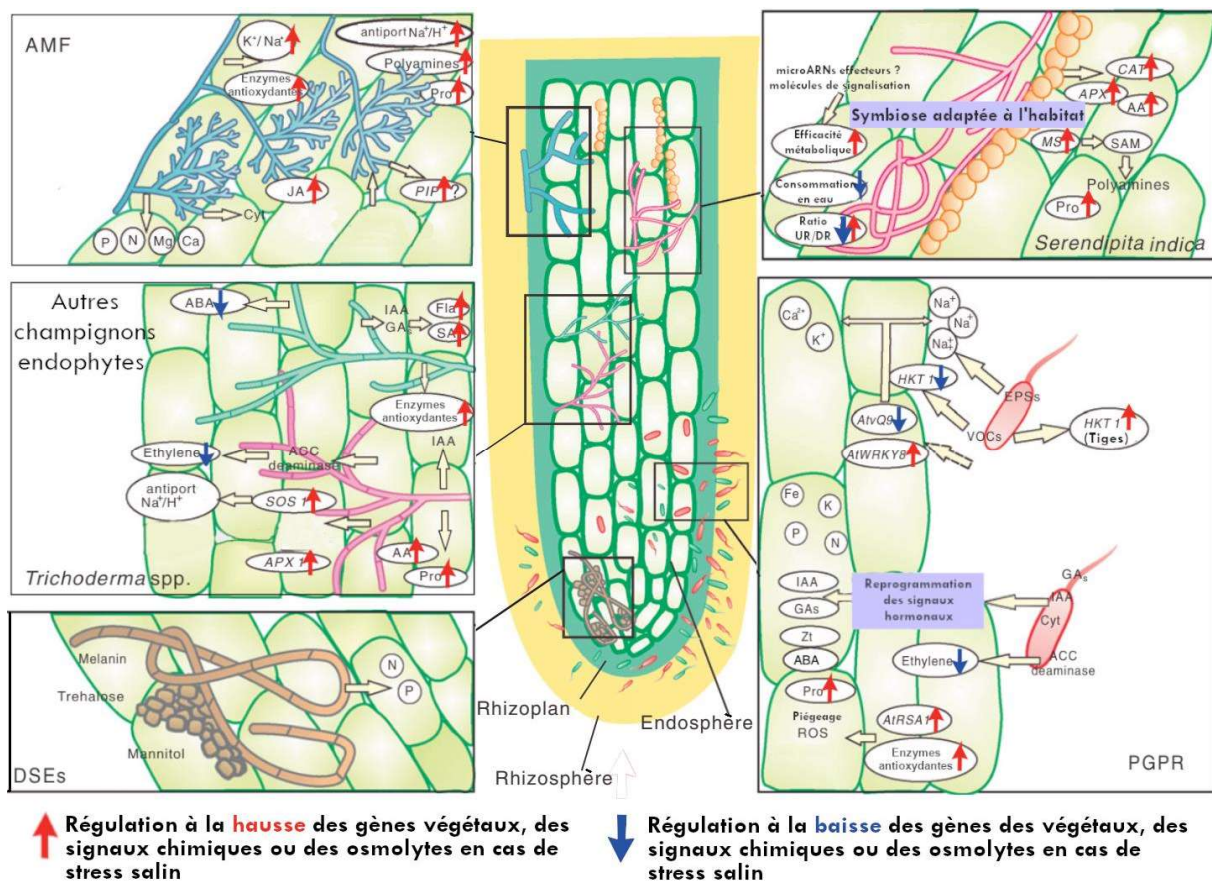


Figure 1.16: Quelques effets promoteurs de la croissance des plantes chez divers groupes de microorganismes en présence d'une salinité élevée. AA : acide ascorbique ; ABA : acide abscissique ; APX : ascorbate peroxydase ; CAT : catalase ; DHAR : déhydroascorbate réductase ; Fla : flavonoïdes ; GAs : acides gibbérélliques ; HKT1 : transporteur de K⁺ à haute affinité ; IAA : acide indole-3-acétique ; MDHAR : monodéhydroascorbate réductase ; MS : méthionine synthase ; Pro : proline ; PIPs : protéines intrinsèques de la membrane plasmique ; SA : acide salicylique ; SAM : S- adénosyl-méthionine ; SOD : superoxyde dismutase ; SOS1 : gène 1 de sensibilité excessive au sel ; gènes UR/DR : rapport entre les gènes régulés à la hausse/ les gènes régulés à la baisse (modifié d'après (Qin et al. 2016a)).

Les halophytes structurent les communautés microbiennes et recrutent des microorganismes leur permettant de mieux s'adapter à des environnements difficiles (Qin et al. 2018; Riva et al. 2019; Wang et al. 2020). Jing et al. (2019) (Jing et al. 2019) ont analysé l'effet de la culture de deux halophytes *Atriplex triangularis* et *Suaeda glauca* sur le recrutement des communautés microbiennes dans le sol brut (sol non accroché aux racines) et dans le sol rhizosphérique (sol accroché aux racines). Ils trouvent une grande diversité de phyla tels que Actinobacteries, Proteobacteries, Bacteroidetes, Chloroflexi et Acidobactéries, dans des proportions plus ou moins importantes selon l'espèce. Dans cette étude, la structure des communautés microbiennes était significativement impactée par la présence des plantes. La richesse et la diversité des espèces bactériennes étaient plus élevées dans la rhizosphère que dans le sol sans plant, ceci pouvant être lié aux exsudats racinaires produits par les plantes. De plus, le sol rhizosphérique d'*A. triangularis* présentait des activités d'uréase et de déshydrogénase plus élevées que le sol brut associé à cette espèce. Dans le contexte de la Nouvelle-Calédonie, une étude récente menée par Colette et al (2023) (Colette et al. 2023b) a montré une diversité des procaryotes spécifiquement et fonctionnellement distincte entre 3 halophytes, *Suaeda australis*, *Sarcocornia quinqueflora* et *Atriplex jubata*, cultivées dans des sédiments issus de bassins aquacoles. Li et al. (2018) (Li et al. 2018) montrent qu'en comparaison avec un sol nu, les communautés microbiennes sont plus diversifiées dans le sol rhizosphérique de 5 halophytes d'un désert de Chine, et cette diversité est d'autant plus importante dans le sol rhizosphérique accroché aux racines que dans le sol libre de la zone racinaire. En comparant les racines, les feuilles, le sol rhizosphérique et le sol brut, Qin et al. (2018) (Qin et al. 2018) montrent également une diversité maximale des communautés halotolérantes dans le sol rhizosphérique, dominée par Protéobactéries et Actinobactéries ; deux groupes bactériens fréquents dans les milieux salins. Par ailleurs, ils sont connus pour coloniser les sols contaminés par les ETM (Pires et al. 2017). Parmi les groupes de champignons candidats à la bio-augmentation, les « dark septate endophytes » (DSE) sont des champignons bruns ascomycètes aux hyphes mélanisés, connus pour leur tolérance à de nombreux stress et pour coloniser des milieux aux conditions abiotiques extrêmes (Jumpponen and Trappe 1998; Berthelot et al. 2019). Les hyphes mélanisés se confondent avec ceux des champignons bruns saprotrophes du sol (Mandyam and Jumpponen 2005). Ils forment des structures s'apparentant à des microsclérotés à l'intérieur des racines (Qin et al. 2016b; Berthelot et al. 2019). Ces microsclérotés ont une fonction de résistance aux stress et de conservation, les aidant à persister dans les environnements difficiles. Dans la revue de Jumpponen and Trappe (1998) (Jumpponen and Trappe 1998), les auteurs discutaient d'ores et déjà des nombreuses adaptations chez les DSE, impliquées dans la résistance à divers stress biotiques et abiotiques (faibles ou fortes températures, sécheresse, pathogènes...). En effet, ces champignons ont déjà montré des capacités de bioremédiation particulièrement intéressantes. L'étude de Zhang et al. (2008) (Zhang et al. 2008) montre, à titre d'exemple, une accumulation intéressante de Cd et de Pb chez une souche d'un DSE (*Exophiala pisciphila*) dans des quantités égales à 5 et 20 % respectivement de sa masse sèche. Ces champignons produisent en général peu de structures reproductrices (Mandyam and Jumpponen 2005; Qin et al. 2016b). Les DSE sont capables d'augmenter la teneur en azote et en phosphore dans les plantes. Ils peuvent ainsi augmenter la biomasse des plantes. Pereira et al. (2021) (Pereira et al. 2021) montrent que *Periconia macrospinoso* induit une augmentation significative de la biomasse racinaire et foliaire en conditions salines et non salines, sans cependant réduire la teneur de Na dans les plantes. D'autres champignons endophytes sont connus pour leurs effets PGP en conditions de stress salins ou métalliques. *Piriformospora indica*, un champignon basidiomycète est une espèce largement documentée concernant le stress salin chez les plantes (Peškan-Berghöfer et al. 2004; Becker et al. 2005; Baltruschat et al. 2008; Franken 2012; Varma et al. 2012), qui a aussi montré des effets positifs vis-à-vis du stress métallique (Oelmüller et al. 2009).

Les champignons mycorhiziens à arbuscule ou AMF sont des symbiotes majeurs dans la vie des plantes. Plusieurs études de la fin de 20^{ème} siècle (Hirrel et al. 1978; Juniper and Abbott 1993) affirment que les AMF se retrouvent peu dans les milieux salins. Becerra et al. (2014) (Becerra et al. 2014) ont caractérisé la diversité des AMF dans 4 halophytes de la famille des Amaranthacées (*Allenrolfea patagonica*, *Atriplex argentina*, *Heterostachys ritteriana* et *Suaeda divaricate*) sur des sols salins. Ils observent une distribution verticale (entre 0 et 50 cm de profondeur) des AMF dans le sol rhizosphérique des 4 halophytes (Becerra et al. 2014). De plus, les racines sont faiblement colonisées, avec des taux

de colonisation n'excédant pas 50%. Ils ne trouvent par ailleurs aucun arbuscule dans les racines malgré la présence de nombreuses spores dans les différentes couches du sol. Cette absence d'arbuscule a aussi été constatée dans l'étude de Cofré et al. (2012) (Cofré et al. 2012). Plenchette et Duponnois (2005) (Plenchette and Duponnois 2005) affirment que le type de mycorhizes formées par les AMF dépend fortement de la plante hôte et émettent l'hypothèse de l'existence d'un type mycorhizien dépourvu d'arbuscules chez les Chénopodiacées. Aucune étude ne permet de valider cette hypothèse à ce jour. Une méta-analyse de Pan et al. (2020) (Pan et al. 2020) menée sur 916 cas d'études provenant d'un total de 182 publications montre que les halophytes sont moins dépendantes des AMF que les glycophytes face au stress salin et la contribution des AMF dans la croissance des halophytes est surtout liée à une amélioration de la régulation osmotique induite par des osmolytes organiques et des ions inorganiques (K^+ et Ca^{2+}), tandis que chez les glycophytes, elle est plutôt liée aux actions combinées de l'accumulation de sucres solubles, l'amélioration de la nutrition, la réduction de l'accumulation de Na, l'amélioration de l'activité de la SOD et l'augmentation de la teneur en pigments chlorophylliens. L'utilisation de ce type de champignons peut s'avérer très avantageux du fait de leur dépendance à leur hôte. Les AMF peuvent protéger la plante du stress en l'aidant à maintenir un ratio K^+/Na^+ stable, car ils favorisent l'absorption de K^+ et Ca^{2+} en conditions salines, tout en empêchant l'absorption et la translocation des ions Na^+ (Evelin et al. 2009; Hammer et al. 2011). L'étude de Plenchette et Duponnois (2005) (Plenchette and Duponnois 2005) montre un effet positif sur la croissance de l'halophyte *Atriplex nummularia* inoculé avec *Glomus intraradices* dans une expérience en serre, effet que les auteurs attribuent principalement à l'amélioration de la biodisponibilité du phosphore. Yang et al. (2016) (Yang et al. 2016) ont étudié l'effet de *Glomus etunicatum* et *Glomus mosseae* sur une autre espèce d'Amaranthacées, *Suaeda physophora*. Ces champignons amélioraient l'absorption de phosphore et diminuaient le stress oxydatif qui s'exerce sur les membranes (diminution significative des teneurs en MDA) en augmentant l'activité de la SOD et de la POD impliquées dans la réponse au stress salin. Ainsi, ils amélioraient significativement la croissance de l'halophyte et le nombre de graines produites. La sélection de souches intéressantes est complexe, car leurs effets peuvent être affectés par divers facteurs. Par exemple, la présence d'ETM influence fortement les communautés microbiennes, selon l'espèce métallique, la forme chimique et la concentration de métal biodisponible, elle-même résultant de l'interaction complexe en différents facteurs du sol (Yi et al. 2021). De plus, les effets sur la plante dépendent aussi des interactions microbe-microbe. L'évaluation des effets synergiques (interactions bénéfiques mutuellement maximisées entre les différents microorganismes) et des interactions antagonistes (compatibilité) sont cruciaux dans la sélection de souches pertinentes. L'association artificielle de plusieurs souches ne prétend pas refléter la complexité des interactions microbiennes s'opérant naturellement au sein du microbiome des plantes visées, mais peut parfois s'avérer utile du fait que les souches sélectionnées peuvent parfois optimiser de manière synergique leurs effets bénéfiques sur les plantes.

Qu'il soit bactérien ou fongique, le microbiome des halophytes leur confère de très nombreux avantages en termes de croissance (effets PGP), résistance aux fortes concentrations salines, résistances métalliques (la plupart du temps, tous ces effets étant étroitement liés les uns aux autres). Ainsi, de nombreuses études ont montré une richesse microbienne notable des halophytes, les bénéfiques qu'ils apportent à la plante hôte à laquelle ils sont associés, ainsi que les adaptations dont ils font eux-mêmes preuve face aux contraintes environnementales auxquelles ils sont exposés. Ces propriétés, ainsi que leur relative facilité de culture et leurs faibles coûts, en font des candidats idéaux dans le cadre du développement d'applications en phytoremédiation bio-augmentée, comme nous l'avons récemment mis en évidence dans l'une de nos revues (Bonaventure 2023).

Conclusions de l'état de l'Art

En Nouvelle-Calédonie, l'érosion des roches ultramafiques conduit à une contamination en ETM (principalement Ni, Co, Cr, et Mn) des littoraux et du lagon. L'activité minière, l'agriculture et les feux de brousse amplifient ce phénomène si bien que les ETM atteignent différents niveaux de la chaîne alimentaire et menacent alors la population insulaire, fortement dépendante des ressources côtières. Les effets des ETM sur les écosystèmes et la santé sont délétères et de nombreux travaux de recherche s'attèlent à explorer les solutions de remédiation des milieux contaminés par ces éléments. La phytoremédiation est une technique innovante et écologique ayant déjà porté ses fruits dans des projets

récents et de nombreux travaux de recherche. En contexte salin, les halophytes présentent des adaptations aux stress environnementaux avantageuses vis-à-vis des ETM et ont un fort potentiel dans la phytoremédiation des milieux côtiers contaminés. Elles disposent notamment d'un système antioxydant très efficace pour neutraliser les ROS générées tant par un excès de sel qu'en présence d'ETM. Leurs adaptations à la salinité telles que leur forte aptitude à produire des métabolites impliqués dans le maintien de l'équilibre osmotique, le potentiel redox, et la chélation des ions toxiques leur confèrent de grandes capacités de bioconcentration des ETM dans les racines et dans les parties aériennes. L'exposition au NaCl apparaît comme un facteur préparateur et protecteur contre le stress lié aux ETM et tend à réduire leur translocation. En vue d'optimiser les capacités de fixation et de remédiation des ETM, l'utilisation de microorganismes promoteurs de la croissance des plantes et associés aux halophytes, est une solution prometteuse du fait que ces milieux stressants recèlent une grande richesse de bactéries et de champignons endophytes et rhizosphériques ayant acquis des adaptations fortes de tolérance à la salinité et aux stress en général. La stabilisation extracellulaire des ETM par les bactéries et les champignons halotolérants est possible, notamment en raison des propriétés particulières de leurs parois, et de leur forte aptitude à produire des substances plus ou moins complexes captant les ETM, filtrant l'absorption des nutriments, améliorant l'apport et la rétention d'eau, et en chélatant aussi les ETM. Ils peuvent réguler les niveaux de phytohormones, et agissent sur l'expression des gènes de la plante, la production de protéines et de métabolites et peuvent améliorer la tolérance aux ETM des plantes. Les plantes peuvent aussi bénéficier d'un apport en nutriments augmenté par les microorganismes associés, et ainsi contribuer au développement des racines et des tiges, ainsi qu'à l'accumulation et l'extraction des ETM.

Le potentiel des microorganismes associés aux halophytes de Nouvelle-Calédonie n'avait, à ce jour, jamais été exploré et pourrait être une opportunité intéressante de phytoremédiation des estuaires contaminés par les ETM et/ou le développement de stratégies innovantes de décontamination des ETM dans les eaux et les écosystèmes.

2. REVUE DE LA LITTÉRATURE (TACHE 3) : CAPACITÉ DE SORPTION MÉTALLIQUE DE SUBSTRATS INERTES VÉGÉTAUX EN ASSOCIATION AVEC LES MICROORGANISMES SOUS FORME DE BIOFILM LES PLUS INTÉRESSANTS OU LEURS BIOMOLÉCULES (EPS).

L'objectif de ce chapitre étant de publier cette partie du travail dans une revue scientifique spécialisée, celle-ci sera communiquée une fois acceptée pour publication.

3. DONNÉES PRELIMINAIRES : SITES D'ETUDES

La genèse du projet METDEP résulte d'une étude exploratoire ayant pour but la caractérisation des capacités d'accumulation des ETM de quelques espèces halophytes de Nouvelle-Calédonie, menée par notre équipe de recherche en 2018.

3.1. DÉMARCHE SCIENTIFIQUE : ANALYSES PRÉLIMINAIRES – DONNÉES NON PUBLIÉES

3.1.1. Caractérisation de la contamination d'une tanne de l'estuaire de la Baie de Saint-Vincent
La zone d'étude ciblée pour ce travail se situe à environ 82 km au nord de Nouméa (21°59'02.8"S 166°09'32.0"E), proche de l'aéroport de la Tontouta. Il s'agit d'un tanne vif (Virly 2008) présentant peu de végétation, impacté par la mine et localisé sur l'estuaire de la Tontouta (Figure 3.1).

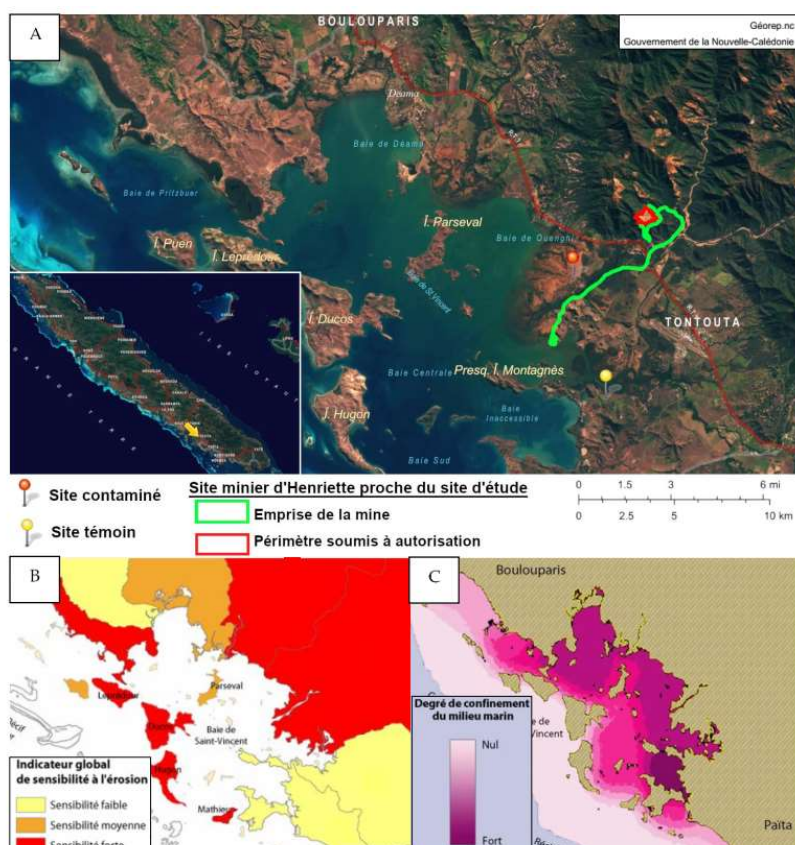


Figure 3.1: Localisation et sensibilité à l'érosion des bassins versants de la Baie de St Vincent.

A. Localisation des sites étudiés : impacté par les ETM et témoin (source : georep.nc avec superposition d'une carte issue de la demande d'autorisation d'exploitation minière du site d'Henriette. https://www.provincesud.nc/sites/default/files/1828039PIECE%20C_021_16_EtudeImpactHenriette_VF.compressed.pdf). B. Indicateur pondéré de sensibilité à l'érosion des bassins versants sur la zone de Boulouparis et de La Tontouta (Dumas 2004). Gradient de confinement du lagon de la côte à la barrière récifale, relatif à l'impact de l'érosion et à la sensibilité du milieu marin à la sédimentation terrigène (Dumas 2004).

D'après Certain (2021) (Certain 2021), plusieurs échantillons prélevés dans cette zone, en l'occurrence au niveau du sol rhizosphérique de *Suaeda* et *Sarcocornia sp.* sur plusieurs sites, dont la Tontouta et d'autres sites aux alentours, seraient caractérisés par une texture fine (dominée par la fraction limoneuse), des conditions modérément réductrices (lorsqu'ils ne sont pas inondés), un pH neutre (6,5-7,5) à basique (7,5-8,7) et une salinité modérée à élevée, allant de 2-4 dS.m⁻¹ (25°C) à ≥ 15 dS.m⁻¹ (25°C). A partir de ces caractéristiques, ces milieux sont qualifiés de « salt pans » (ou de saline en français). Pendant l'été, ces zones peuvent s'assécher et voir leur salinité augmenter à tel point qu'une croûte de sel se forme à la surface. Les quantités en Mg, Na et K biodisponibles mesurées dans les marais salants sont parmi les plus élevées de tous les sites étudiés. L'augmentation de la conductivité électrique (EC, « electrical conductivity ») et donc de la salinité s'observe notamment pendant les périodes particulièrement chaudes et sèches avec l'apparition d'une croûte de sel visible à la surface du sol. Le sol du site contaminé possède une couleur rouge (Figure 3.2), probablement en raison de la présence des oxydes de fer. Certain C. (2021) (Certain 2021) a d'ailleurs caractérisé 24 sites de tannes de Nouvelle-Calédonie et noté des concentrations en ETM biodisponibles plus élevées dans les zones de Dumbéa et de la Tontouta que dans les autres sites d'échantillonnage. Le niveau de contamination aux ETM, Ni, Co, Cr et Mn de ce site a été préalablement caractérisé notamment par l'analyse des concentrations en ETM totales et extractibles au DTPA. De plus, ces résultats ont été comparés à un site non loin mais a priori non contaminé (« site témoin ») (Figures 3.1 et Figure 3.2). Les résultats sont présentés dans Les Tableaux 3.1 et 3.2 ci-dessous.



Figure 3.2: Sites d'étude pour la caractérisation des sols et de l'accumulation des ETMs par les plantes à l'état naturel. (Photos : © C. Majorel)

Tableau 3.1 : Moyennes et écarts types des concentrations des ETM (extraits au DTPA et totaux, mg.kg⁻¹) présents dans le sol d'un tanne non impacté (tanne témoin) et d'un tanne impacté par les apports sédimentaires miniers (tanne rouge), en présence ou non des plantes.

		Co	Cr	Mn	Ni
Concentrations des ETM extraits au DTPA (mg.kg-1)					
Tanne rouge	avec plants	4,611 ± 2,429	0,105 ± 0,033	54,790 ± 41,202	32,485 ± 8,231
	sans plant	5,450 ± 2,685	0,113 ± 0,005	58,638 ± 18,747	33,188 ± 5,919
Tanne témoin	avec plants	2,168 ± 0,933	0,202 ± 0,089	49,902 ± 32,763	11,667 ± 4,434
	sans plant	2,313 ± 0,337	0,127 ± 0,029	42,763 ± 28,470	7,970 ± 2,782
Concentrations totales des ETM (mg.kg-1)					
Tanne rouge	avec plants	207,1 ± 25,9	1517,9 ± 126,4	1493,8 ± 165,6	3365,0 ± 317,4
	sans plant	238,2 ± 44,4	1708,4 ± 234,3	1651,1 ± 423,8	3781,6 ± 850,8
Tanne témoin	avec plants	22,3 ± 15,3	175,0 ± 82,9	226,9 ± 186,4	200,5 ± 166,5
	sans plant	20,0 ± 8,1	133,4 ± 41,5	209,3 ± 142,6	150,8 ± 92,9

Tableau 3.2: Moyennes des concentrations totales (mg.kg⁻¹) en Co, Cr, Mn et Ni dans les parties aériennes et racinaires de *Sesuvium portulacastrum*, *Sporobolus virginicus*, *Sarcocornia quinqueflora* et *Suaeda australis* prélevés sur le tanne rouge, contaminé aux ETMs.

Les 2 moyennes les plus élevées sont en gras (C. Majorel, données non publiées).

Parties de la plante	Espèces	Ni	Co	Cr	Mn	Total ¹
Parties aériennes	<i>Sarcocornia quinqueflora</i>	325	16,4	134	160	635,4
	<i>Suaeda australis</i>	421	21,5	166	254	862,5
	<i>Sesuvium portulacastrum</i>	529	40	317	500	1386
	<i>Sporobolus virginicus</i>	203	8,4	118,3	85	414,7
Parties racinaires	<i>Sarcocornia quinqueflora</i>	178	6,5	159	280	623,5
	<i>Suaeda australis</i>	491	26,2	503	356	1376,2
	<i>Sesuvium portulacastrum</i>	670	50,3	274	540	1534,3
	<i>Sporobolus virginicus</i>	770	42	336	243	1391

¹ total : Ni + Co + Cr + Mn

Tableau 3.3: Conductivité électrique mesurée selon la norme ISO 11265:1994 des sols échantillonnés sur le tanne de la Baie des Cochons, La Tontouta (Novembre 2019)

N° d'échantillon	01	02	03	04	05	06	Moyenne
<i>S. portulacastrum</i>	18,6	28,3	21	28,2	21,2	30,4	24,62
<i>S. australis</i>	17,9	15,5	19,8	20,4	17,1	NA	18,14

Ces analyses préliminaires nous ont permis de montrer que les espèces de plantes halophiles présentes sur des tannes contaminés par des ETM étaient capables de s'y développer et d'accumuler, notamment au niveau racinaire, des ETM environnementaux. Nous avons ensuite cherché à savoir si ces adaptations reflétaient des associations microbiennes spécifiques.

4. TACHE 1. ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DES MICROORGANISMES CULTIVABLES RÉSISTANTS AU SEL ET AUX ETM À PARTIR D'ESPÈCES HALOPHYTES DES SOLS DE TANNES DE NOUVELLE-CALÉDONIE.

4.1. INTRODUCTION.

La recherche de microorganismes résistants aux ETM et promoteurs de la croissance des plantes (PGP) trouve des applications dans le domaine de l'agriculture, de la restauration écologique ou encore de la bioremédiation des sols et eaux pollués. La démarche consiste le plus souvent en un isolement puis une identification des souches cultivables, suivie d'une caractérisation en conditions *in vitro* de leurs propriétés de résistances métalliques et de promotion de la croissance (PGP).

De nombreuses études procédant selon cette méthodologie, ont abouti à l'identification de souches d'intérêt, tant pour la bioremédiation des ETM par des microorganismes dans divers environnements, que pour la bio-augmentation d'une technique de phytoremédiation des ETM, notamment en contexte salin (pour revue, voir (Bonaventure et al. 2023)). Les bactéries et les champignons, endophytes ou vivants dans la rhizosphère des halophytes, symbiotes obligatoires ou facultatifs, sont largement explorés pour leurs aptitudes de résistance au stress, de bioaccumulation des ions toxiques et leurs mécanismes de neutralisation extracellulaire des ETM. Très souvent, ces microorganismes sont doués de deux types de propriétés fondamentales : ils sont d'une part résistants/adaptés aux ETM et ils

présentent, d'autre part, de nombreux effets PGP. De nombreuses méthodes, certaines simples et d'autres plus complexes, existent pour détecter une grande diversité d'effets PGP (Bashan et al. 2014; Kaminsky et al. 2019).

Nous avons donc entrepris d'isoler puis de sélectionner des bactéries et champignons cultivables associés aux racines des trois espèces d'halophytes sélectionnées dans le cadre de notre étude préliminaire (espèces nommées A, B et C) sur la base de leur résistance au NaCl et aux 4 ETM les plus fréquemment rencontrés en Nouvelle-Calédonie (Ni, Co, Cr et Mn). Nous avons ensuite évalué quelques propriétés PGP, dont les méthodes de test *in vitro* sont maîtrisées au sein de notre laboratoire. Ainsi, leurs capacités à produire de l'acide indol-3-acétique (AIA), à solubiliser du phosphore et à fixer le N₂ ont été testées. Enfin, pour les **bactéries** les plus intéressantes (c'est à dire à la fois résistantes à un mélange multi-métallique et présentant plusieurs des effets PGP testés), nous avons testé leur capacité à produire des exopolysaccharides (EPS) et/ou à former du biofilm.

En effet, d'après les données de la littérature, les ETM sous forme particulaire ou soluble, peuvent être accumulés par des cellules intactes (vivantes ou non) ou leur sous-produits, tels que les exopolymères (et notamment les exopolysaccharides ou EPS), qui constituent la majeure partie de la matrice exopolymérique du biofilm. Le biofilm est une structure qui se forme lors du passage de la bactérie du mode de vie libre dit « planctonique » à un mode vie sédentaire dit « sessile » (attaché à un support). Il est donc constitué de bactéries adhérentes à un support via l'excrétion d'une matrice exopolymérique. La formation de biofilms bactériens fortement chélateurs de métaux, sur des supports naturels faciles d'accès et abondants en Nouvelle-Calédonie (fibres végétales ou calcomagnésiens) pourrait ainsi représenter une piste prometteuse de limitation des contaminations aux ETM dans l'environnement ou/et de dépollution des écosystèmes contaminés. Par ailleurs, les microorganismes sont pour certains également capables de produire des exopolymères de type polysaccharidique en mode planctonique. Ces exopolymères (EPS³), qu'ils soient matriciels ou excrétés dans l'environnement, servent, entre autres, de protection cellulaire contre les stress environnementaux et notamment le stress métallique (Gupta and Diwan 2017; Etesami 2018). C'est pourquoi il est pertinent, une fois des bactéries résistantes aux ETM sélectionnées, de tester également leur capacité de production d'EPS, puis la capacité de séquestration des ions métalliques par ces EPS. C'est l'ensemble de cette démarche que nous avons réalisée dans la Tâche 1 du projet METDEP présentée ci-dessous.

4.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cette partie a été synthétisée et les protocoles complets ont été transférés en annexe confidentielle : Annexes Partie 4. Tâche 1 : Annexe 1.

4.2.1. ISOLEMENT DES MICROORGANISMES À PARTIR DES RACINES (TÂCHE 1.A).

4.2.1.1. Bactéries associées aux racines

Les racines et le sol rhizosphérique de 5 plants par espèce, ont été prélevés le 20/11/2019 sur le tanne impacté par les ETM. Les bactéries ont été isolées des racines broyées et du sol rhizosphérique accroché aux racines. Après dilution en série du broyat racinaire ou de l'extrait aqueux du sol, les suspensions bactériennes ont été étalées en duplicat sur milieux gélosés salins, additionnés d'un antifongique et supplémentés ou non par du nickel (40 ppm) sous forme de NiSO₄ hydraté. Les géloses ont été incubées à 28°C et l'apparition des colonies bactériennes a été suivie de façon journalière. Cet ETM (Ni) a été spécifiquement choisi pour cette première sélection en raison de la connaissance approfondie qu'a notre laboratoire sur celui-ci, ainsi que de sa présence systématique comme l'un des ETM majeur contaminant les environnements néo-calédoniens. Chaque colonie a été purifiée par isolements successifs. A l'issue de cette démarche, **107 bactéries** ont pu être conservées en souchier

³ EPS : Exopolysaccharides

à -80°C et ont été soumises à différents tests de résistance aux ETM et au NaCl, ainsi qu'à des tests de détection de quelques propriétés PGP.

4.2.1.2. Recherche des AMF

L'extraction des spores d'AMF a été effectuée selon la technique de tamisage humide (Gerdemann and Nicolson 1963) suivie d'une centrifugation sur un gradient de saccharose (Giovannetti et al. 1991; Warda and Fortas 2019) Elle a été réalisée sur 2 prélèvements, réalisés à 6 mois d'intervalle (novembre 2019 et juin 2020). La moyenne des résultats de comptage a été calculée et rapportée à 10 mL (x100) puis à 100 g de sol sec. L'abondance des spores a été exprimée en nombre de spores d'AMF par 100g de sol.

La préparation des lames de microscopie de racines pour l'évaluation des paramètres de mycorhization (fréquence et intensité de mycorhization) a été réalisée selon la méthode de Warda et Fortas (2018) (Warda and Fortas 2018). Dix fragments de racine de 1 cm par lame ont été observés au microscope optique (Olympus BX 50) aux grossissements x100 et x400 et photographiés. La fréquence de mycorhization (F (%)) et l'intensité globale de la mycorhization (M(%)) ont été déterminées selon le guide d'appréciation du pourcentage global de mycorhization (Trouvelot, A., Kough, J.L. and Gianinazzi-Pearson 1986).

Dans le cas des autres endophytes présents, la fréquence d'apparition du mycélium dans les racines est estimée de la même manière que celle utilisée pour la présence d'AMF.

4.2.1.3. Isolement des champignons endophytes racinaires

L'isolement des endophytes fongiques des racines de deux halophytes a été réalisé en utilisant la procédure de désinfection des racines selon la méthode de Cranenbrouck et al. (2005) (Cranenbrouck et al. 2005) indiquée pour les AMF. Les morphotypes fongiques ont ensuite été purifiés puis conservés à 4°C pour les tests : (i) PGP, (ii) de résistance aux ETM et (iii) de résistance au NaCl. Les premiers tests de conservation longue durée à -80°C, de ces souches ont montré des résultats satisfaisants avec la méthode de Lecellier (2013) (Lecellier 2013). Les souches sont capables de croître à nouveau sur milieu PDA⁴ après 1 an de conservation.

4.2.2. RÉSISTANCE MULTI-MÉTAUX DES ISOLATS BACTÉRIENS ET FONGIQUES (TÂCHE 1.B)

Les bactéries et les champignons isolés ont été testés pour leur résistance aux ETMs sur milieu gélosé (LB agar ou PDA) contenant les mélanges d'ETMs (Ni, Co, Cr et Mn) présentés dans le Tableau 4.1 (annexé). A l'exception du Cr pour lequel les concentrations ont été augmentées par un facteur 10 en raison du caractère épisodique des fortes contaminations au Cr (un phénomène bien connu en Nouvelle-Calédonie), les concentrations des niveaux [ETM]1 et [ETM]2 en Ni, Co et Mn ont été sélectionnées sur la base des analyses initiales de C. Majorel (Chapitre 3; données non publiées). Ainsi, en tenant compte d'une teneur massique en eau du sol de tanne d'environ 51% de son poids sec, le niveau [ETM]1 reflète les valeurs minimales de ces analyses (tanne « témoin ») tandis que le niveau [ETM]2 reflète les valeurs maximales (tanne contaminé par les ETM ou tanne rouge). En ce qui concerne le niveau [ETM]3, nous avons choisi de doubler les concentrations du niveau [ETM]2. Pour ce chapitre, la résistance maximale correspond au niveau de [ETM] avant lequel on observe une inhibition totale du développement bactérien ou fongique.

⁴ PDA : *Potato Dextrose Agar*

4.2.3. RÉSISTANCE AU NaCl (TÂCHE 1.B)

La résistance au NaCl des bactéries et des champignons isolés a été évaluée respectivement sur LB agar et PDA avec les concentrations en NaCl totales comprises entre 0 et 3000 mM de NaCl. La concentration saline maximale correspond à la dernière concentration avant celle engendrant une inhibition totale du développement bactérien ou fongique.

4.2.4. TESTS BIOCHIMIQUES DES EFFETS PGP IN VITRO

4.2.4.1. Evaluation de la production d'AIA

L'évaluation de la capacité de production d'acide indole-3-acétique (AIA) par les bactéries et les champignons sélectionnés a été réalisée à l'aide de la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Salkowski (FeCl_3 à 0,5M et acide perchlorique à 35%). Pour les bactéries, une colonie de chaque souche étudiée a été mise en culture liquide en milieu salin additionné de L-Tryptophane (Paredes-Páliz et al. 2016). Pour chaque souche, 1 mL de surnageant de culture a été mis en contact avec le réactif de Salkowski additionné d'acide phosphorique (Gordon and Weber 1951). L'absorbance a été mesurée après une vingtaine de minutes à 530 nm.

Pour les champignons endophytes, la méthode est sensiblement la même et s'est inspirée de la méthode de Bilal et al. (2018) (Bilal et al. 2018). Pour chaque souche, un carré de gélose contenant du mycélium a été transféré dans le milieu liquide Czapek additionné de L-tryptophane puis incubé à 28°C pendant 7 jours sous agitation rotative. Pour chaque souche, 1 mL de surnageant a été mis en contact avec le réactif de Salkowski additionné d'acide phosphorique. L'absorbance a été mesurée après 30 minutes à 530 nm.

4.2.4.2. Fixation du N_2

La fixation du N_2 a été évaluée chez les bactéries sur un milieu minimum salin avec et sans apport azoté via NH_4Cl . Les tests sont effectués en déposant en triplicat sur les milieux gélosés, 5 μL d'une suspension bactérienne ($A_{600\text{nm}}=0,1$) dans du NaCl 0,9%. Un témoin positif est réalisé avec une souche de *Rhizobium sp.* et un témoin négatif avec une souche de *Micrococcus sp.*

4.2.4.3. Solubilisation du phosphate

La méthode employée pour les bactéries consiste en un premier test sur un milieu gélosé NBRIP (milieu National Botanical Research Institute's phosphate ; 3 répliques/bactérie) selon le protocole de Paredes-Páliz et al. (2016). Les bactéries sont ensuite incubées à 28°C. Les boîtes sont contrôlées chaque jour : la formation d'un halo autour du puits indique un résultat positif, donc des bactéries solubilisatrices de phosphore (Paredes-Páliz et al. 2016). Les souches positives à ce test sont ensuite soumises à un deuxième test similaire, mais en milieu liquide Pikovskaya. Ce test permet de valider (ou non) le test effectué sur milieu gélosé.

Pour les champignons, un carré de gélose contenant le champignon cultivé a été transféré sur un milieu gélosé Pikovskaya (PVK+ agar), puis incubé à 28°C pendant 7 jours. De la même manière que pour les bactéries, les champignons formant un halo transparent autour de leur mycélium sont considérés comme capables de solubiliser les phosphates.

4.2.5. IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES ISOLATS BACTÉRIENS ET FONGIQUES SÉLECTIONNÉS

4.2.5.1. Identification moléculaire des bactéries

L'extraction de l'ADN des bactéries a été réalisée à l'aide du kit commercial E.Z.N.A® Bacterial DNA Kit en suivant les instructions du fabricant, avec toutefois une modification pour aider la lyse : l'utilisation de billes de verre. Le surnageant de lyse a été récupéré et l'amplification du gène codant pour l'ARN 16S a été réalisée en utilisant des amorces universelles FD1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') et 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'), permettant d'amplifier le gène codant pour l'ARN 16S sur les régions variables de V1 à V9. Le gène *ADNr 16S* purifié sur SEPHADEX G50 a été séquencé en utilisant ces mêmes amorces. Les produits de la réaction de séquençage ont été analysés sur SeqStudio (Applied Biosystem). Les séquences obtenues ont été comparées aux séquences nucléotidiques présentes dans GenBank à l'aide du programme BLASTn (NCBI Data Base).

4.2.5.2. Identification moléculaire des champignons

L'extraction de l'ADN des champignons a été réalisée à l'aide du kit commercial DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) en suivant les instructions du fabricant. L'amplification de l'ITS a été réalisée avec les amorces ITS1-f (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3') et ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3').

Pour la réaction de séquençage, l'ITS amplifié a été purifié des sels et des amorces à l'aide du SEPHADEX G50 (Sigma-Aldrich) conformément aux instructions du fabricant. Le séquençage de l'ITS amplifié a été effectué avec les amorces ITS1F et ITS4. Les produits de la réaction de séquençage ont été analysés sur SeqStudio (Applied Biosystem). Les séquences ITS obtenues ont été comparées aux séquences de nucléotides présentes dans GenBank à l'aide du programme BLASTn (NCBI Data Base).

4.2.6. IDENTIFICATION DES BACTÉRIES PAR MALDI-TOF.

Une colonie bactérienne fraîche a été inoculée dans de l'eau déionisée puis lavée deux fois à l'éthanol pur par agitation au vortex puis centrifugation. Le culot séché sous vide a été extrait par un mélange d'acide formique à 70 % et d'acétonitrile. Après centrifugation, le surnageant a été mélangé sur la plaque à la matrice α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA)⁵.

4.2.7. TEST DE PRODUCTION D'EXOPOLYSACCHARIDES (EPS)

La mise en évidence de la production d'exopolysaccharides a été réalisée en milieu gélosé salin supplémenté en glucose selon Guezennec (2004) (Guezennec 2004). Le résultat de ce test est qualitatif. Si les colonies qui se développent présentent un aspect particulièrement visqueux (à la vue et au toucher), le résultat est considéré comme positif.

4.2.8. TESTS DE PRODUCTION DE BIOFILMS.

L'évaluation de la production de biofilm a été réalisée en microplaque selon le protocole mis en place au laboratoire par Bourles et al. (2019) (Bourles et al. 2019). Les cultures bactériennes ont été soumises (ou non) à un stress métallique de niveau [ETM]². Après 72h d'incubation statique, le biofilm a été

⁵ Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight

nettoyé des cellules non adhérentes et coloré au cristal violet (CV). La quantité de CV ayant pénétré dans les cellules du biofilm a été re-suspendue dans de l'éthanol. Après 10 min d'agitation, le contenu de chaque puits a été transféré dans une nouvelle microplaque et l' $A_{590\text{ nm}}$ a été lue.

Conformément aux travaux de Brian-Jaisson (2014) (Brian-Jaisson 2014), la formation de biofilm a été considérée comme ayant eu lieu lorsque le rapport A moyenne (6 répliques) / A moyenne blanc était supérieur à 2.

4.2.9. DESCRIPTIONS MORPHOLOGIQUES.

L'observation macroscopique a été faite sur des bactéries isolées, pures, cultivées sur un milieu LB agar, 2,5% de NaCl, 40 ppm de Ni (concentration à laquelle les souches ont été sélectionnées). Des cultures fraîches ont été réalisées sur boîtes et mises à incuber pendant 48h à 72h à 28°C, puis conservées à 4°C jusqu'à leurs descriptions. Les descriptions ont été réalisées selon une observation multicritères résumée dans la Figure 4.2 ci-dessous.

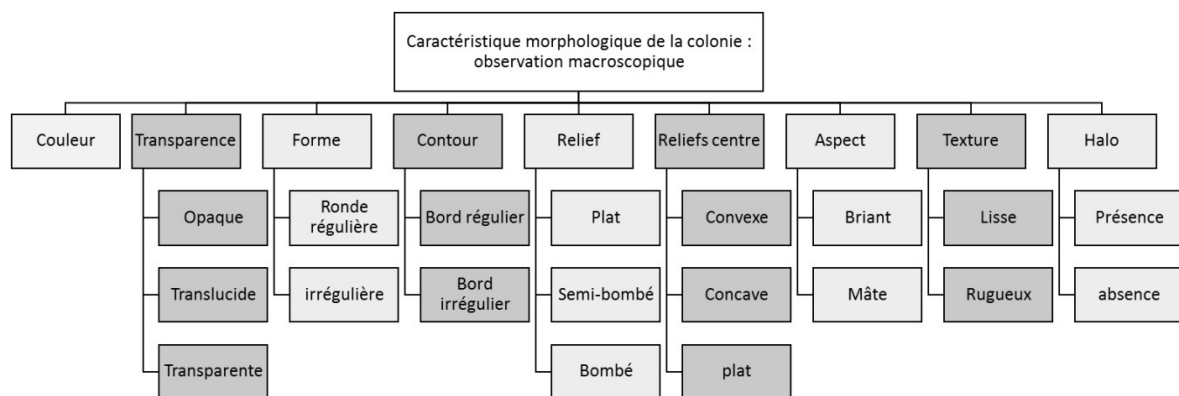


Figure 4.2 : Critères de descriptions morphologiques des colonies bactériennes

4.3. RESULTATS ET DISCUSSION

4.3.1. BACTÉRIES

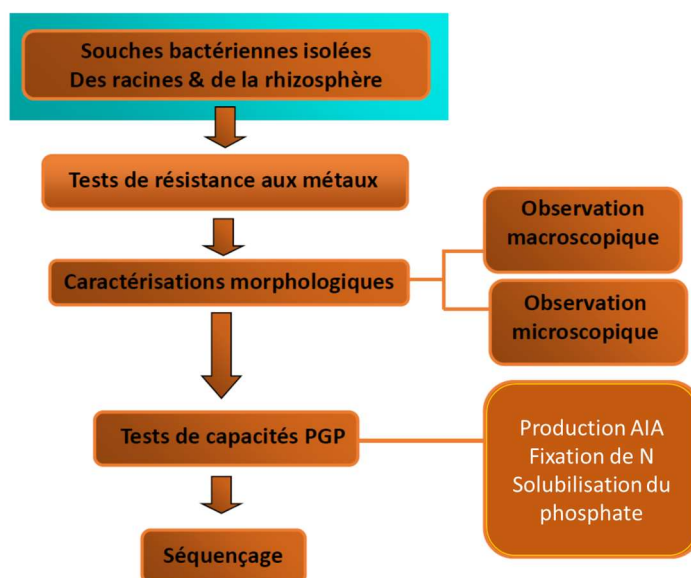


Figure 4.3 : Schéma de la stratégie générale employée pour les sélections bactériennes.

Au total, nous avons initialement isolé plusieurs centaines de bactéries à partir des racines ou du sol rhizosphérique de 3 *halophytes cibles* (A, B, C). Toutes ont ensuite été cultivées sur un milieu doublement sélectif : enrichi en NaCl et en Nickel à 40 ppm. A noter que toutes les bactéries ont montré une résistance à toutes les concentrations salines testées, résistant jusqu'à 3% de NaCl, en accord avec les salinités auxquelles elles sont fréquemment exposées dans les tannes de Nouvelle-Calédonie, régulièrement recouvertes d'eau de mer.

Ensuite, **107 bactéries** (Tableau synthétique 4.2 ; tableau complet Annexe 2 Partie 4 tâche 1) ont pu être sélectionnées pour leur capacité à se développer sur un milieu Ni/NaCl (40 ppm/2,5%) (concentration saline retenue car proche de la moyenne rencontrée dans l'eau de mer). Ces bactéries ont été soumises aux différents tests PGP et de résistance à des mélanges d'ETM (voir section matériels et méthodes).

Tableau 4.2: Nombre de bactéries cultivables en présence de Ni, isolées à partir des racines des 3 plantes cibles.

Espèce végétale	Bactéries isolées du Rhizoplan	Bactéries isolées du sol rhizosphérique
A	56	0
B	22	1
C	13	15

Le nombre de souches bactériennes résistantes aux ETM diminue à partir du niveau [ETM]1 pour les trois halophytes. Sur 23 souches isolées au total à partir de l'espèce végétale B, 12 sont résistantes aux niveaux [ETM]1 et [ETM]2 mais pas au niveau [ETM]3. Sur 56 souches isolées à partir des racines de A, 20 bactéries sont résistantes aux niveaux [ETM]1 et 5 d'entre elles étaient également résistantes aux concentrations [ETM]2. Sur les 28 souches isolées à partir de C, 20 sont résistantes aux niveaux [ETM]1 et 5 aux niveaux [ETM]2.

Toutes les souches résistantes au mélange [ETM]1 (52) ont ensuite été évaluées pour leurs effets PGP. Trois effets PGP ont initialement été évalués : production d'AIA, solubilisation du phosphate et de l'azote.

Chez la plante B, toutes les souches isolées étaient à la fois capables de produire de l'AIA et de solubiliser les phosphates. 60% d'entre elles étaient fixatrices de N₂.

Chez la plante A, 96,4 % produisaient de l'AIA, 64,4 % des isolats montraient des capacités de solubilisation du phosphore et 46,4% étaient fixatrices de N₂.

Chez la plante C, sur les 20 souches isolées au total, seules 5 souches résistantes au mélange [ETM]2⁶⁰⁰⁰. Sur ces 5 souches, toutes étaient capables de produire de l'AIA, mais seulement 4 étaient capables de solubiliser du phosphore et de l'azote.

Pour la suite de nos travaux, la sélection des bactéries s'est basée sur une résistance minimum à un niveau [ETM]1 de concentrations en ETM, ainsi que sur des résultats positifs à au moins deux des trois tests PGP effectués. Ces bactéries ont ensuite été identifiées par séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S. L'ensemble des résultats, ainsi que l'identification moléculaire de ces bactéries sont présentés dans le Tableau 4.3 (Tableau complet en annexe confidentielle 2 Partie 4 tâche 1).

Sur les 52 souches de bactéries résistantes à une concentration multimétallique [ETM]1, 5 ont été perdues au fur et à mesure des cultures bactériennes et de l'avancement des tests (ne poussaient plus, quel que soit le milieu de culture utilisé). Les tests PGP ont donc été effectués sur 47 souches de bactéries morphologiquement différentes restantes.

Sur ces 47 souches testées pour leur capacité à présenter trois effets PGP, seules 17 d'entre elles, toutes issues des espèces végétales A et B, présentaient au moins deux des trois effets PGP testés (Tableau 4.3 ; tableau confidentiel complet en annexe 2 partie 4 Tâche 1).

Le séquençage du gène cible codant pour l'ARNr 16S a montré que sur ces 17 souches bactériennes identifiées comme étant résistantes à un mélange multimétallique [ETM]1, 7 appartiennent au genre bactérien B', 5 au genre S, 2 au genre M, 2 au genre K et 1 au genre U. Parmi ces isolats cultivables sélectionnés sur la base des résultats de résistance aux ETM et d'effets PGP, seuls les genres U et K sont présents exclusivement chez la plante A.

Toutes ces souches ont ensuite été testées pour leur capacité à produire des EPS et/ou du biofilm. Seules 8 d'entre elles, appartenant au genre B', ont montré la capacité à produire des EPS et ont été sélectionnées pour la Tâche 2 de notre étude (voir Chapitre 5 ci-après).

6 De nombreuses bactéries issues de la plante C ont malheureusement été perdues (contaminées) dans le cadre d'un stage de Master 2.

Tableau 4.3 : Souches bactériennes cultivables isolées à partir des racines de *A* et *B* : identification, résistance aux ETM et tests PGP (+ : test positif ; - : test négatif).

Plante	Code ¹	Identification	[NaCl] (%) ²	[ETM] max. ³	AIA	P	N ₂
A							
	1R00	U	3	2	+	-	+
	1R01	K	3	2	+	+	-
	1R16	B	3	2	+	+	-
	1R19	S	3	2	+	-	+
	1R23	B	3	2	+	+	+
	1R25	S	3	2	+	+	+
	1R26	S	3	2	+	+	+
	1R27	K	3	2	+	+	-
	1R28	M	3	2	+	+	+
	1R30	B	3	2	+	+	+
	1R32	S	3	2	+	+	-
	2R04	B	3	2	-	-	+
	2R08	B	3	2	+	+	+
	2R21	B	3	2	+	+	+
B							
	2R06	B	3	2	+	+	+
	2R07	S	3	2	+	+	-
	2S12	M	3	2	+	+	+

¹R= Rhizoplan ; S= Sol rhizosphérique

²Concentration en NaCl du milieu gélosé : Le niveau « 2 » correspond à une croissance en présence de 2% de NaCl et le niveau « 3 » correspond à 3% de NaCl.

³[ETM] : niveau de concentration en ETM (Ni, Co, Cr et Mn) ; le niveau 2 correspond à [ETM]2 reflète les valeurs maximales (tanne contaminé) et le niveau 3 à [ETM]3 soit le double de [ETM]2.

4.3.2. AMF

Les extractions de spores révèlent une faible présence des AMF dans le sol. Le décompte des spores vivantes et des spores noires (considérées comme non vivantes) a été effectué. Au mois de novembre 2019, chez la plante *A*, on comptait en moyenne $26 \pm 32,2$ spores vivantes et $30,5 \pm 23,9$ spores noires pour 100 g de sol. Chez la plante *B*, on trouve $2 \pm 1,2$ spores vivantes et $12 \pm 7,5$ spores noires. En juin 2020, chez la plante *A* on obtenait $11,6 \pm 3,7$ spores vivantes et $14 \pm 6,9$ spores noires et chez la plante *B*, $2 \pm 2,7$ spores vivantes et $4,4 \pm 2,7$ spores noires.

Concernant l'analyse des lames de racines des deux halophytes, aucun arbuscule, aucune propagule et trace de mycélium d'AMF n'ont été observés.

En revanche, la présence d'autres champignons septés est notable. Deux types de mycélium septés ont été trouvés (Figure 4.4) : un non mélanisé, coloré au bleu Trypan et un autre mélanisé (de type « dark septate endophyte »). Par commodité, la fréquence du mycélium (notée F%) et son intensité (ou densité) de colonisation (notée M%) ont été calculés, pour ces deux types de mycélium, selon les mêmes critères que pour les AMF (Trouvelot, A., Kough, J.L. and Gianinazzi-Pearson 1986) et sont présentés dans le Tableau 4.4 (Tableau complet en annexe).

Tableau 4.4: Fréquence et intensité de colonisation des racines fines des plantes *A* et *B* par un champignon bleu septé et un champignon brun septé.

Plante	Bleu		Brun	
	F% ¹	M% ²	F% ¹	M% ²
A	55,0 ± 27,6	6,5 ± 6,3	30,8 ± 20,8	3,2 ± 2,1
B	67,4 ± 22,9	11,7 ± 6,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

¹ Fréquence de mycorhization calculée pour les endophytes selon la méthode de Trouvelot et al. (1986)

² Intensité de mycorhization calculée pour les endophytes selon la méthode de Trouvelot et al. (1986)

Le champignon dit « bleu » - car non mélanisé (Figure 4.4) - est présent chez les deux espèces de plantes halophiles. Cependant, l'intensité de colonisation (M%) s'étend de 6,5 à 11,7 ce qui est considéré comme relativement faible.

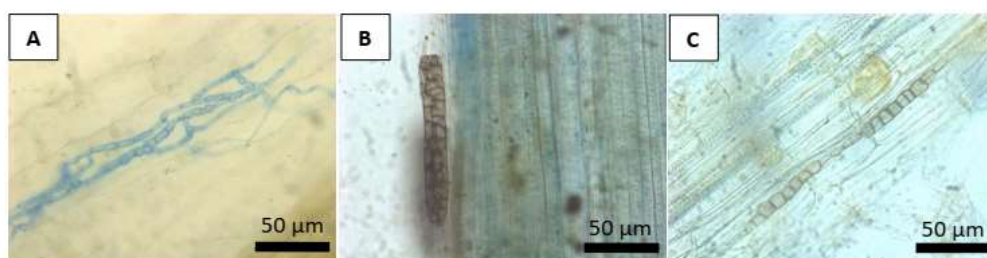


Figure 4.4: Champignons septés observés dans les racines de la plante *B* (A) et de la plante *A* (B, C), coloré au bleu Trypan (x400).

Compte-tenu de l'absence de mycorhization des racines des deux halophytes, nous avons choisi de ne pas isoler d'AMF du fait du faible nombre de spores retrouvées dans le sol.

4.3.3. CHAMPIGNONS ENDOPHYTES

Les résultats des isolats fongiques sont présentés synthétiquement dans le Tableau 4.5 anonymé et dans leur intégralité en annexe (Annexe confidentielle 2 de la partie 4 Tâche 1).

L'isolement des champignons endophytes a fourni au total **23 champignons** (17 pour la plante *A* et 6 pour la plante *B*). En raison du faible nombre d'isolats, les tests et l'identification moléculaire ont été réalisés sur la totalité des champignons. Le genre *M* était présent à la fois dans les racines des deux plantes alors que les autres genres, *P* et *D* n'étaient présents que chez la plante *A*.

Toutes les souches sont au moins résistantes à 1 % de NaCl et au niveau 1 de concentration en ETM. Le développement du mycellium de toutes les souches est inhibé à 3% de NaCl. Certaines souches peuvent supporter des concentrations de 2 % de NaCl (Tableau 4.5). Concernant les ETM, toutes les souches du genre *M* et *P* poussent à des concentrations au moins égales au niveau 2. Les souches du genre *D* résistent à des concentrations en ETM de niveau 1 et 2 mais leur développement est systématiquement inhibé en niveau 3.

La plupart des souches sont capables de produire de l'AIA dès le 11^{ème} jour. En revanche, aucune des souches n'était capable de solubiliser le phosphate sous forme de phosphate tricalcique Ca₃(PO₄)₂ en milieu solide.

Tableau 4.5: Souches fongiques cultivables isolées à partir des racines des plantes A et B : identification, résistance aux ETM et tests PGP. (+ : test positif ; - : test négatif).

Plante	Code	Identification	[NaCl] (%) ¹	[ETM]max. ²	AIA	P
A						
	01	M	1	3	+	-
	02.1	P	1	3	+	-
	02.2	P	1	3	+	-
	03.1	D	1	1	+	-
	03.2	D	1	1	+	-
	04	D	1	1	+	-
	05	D	1	2	+	-
	06	M	2	2	+	-
	07	P	1	2	+	-
	08	D	1	2	+	-
	09	D	1	2	+	-
	10	D	1	1	+	-
	11	M	1	3	+	-
	12	M	1	2	+	-
	13	M	2	2	+	-
	14	D	1	1	+	-
	15	M	1	3	+	-
B						
	01	M	2	2	+	-
	02	M	2	2	+	-
	03	M	1	3	+	-
	04	M	2	3	+	-
	05	M	1	3	+	-
	06	M	2	3	+	-

¹Concentration en NaCl du milieu gélosé : Le niveau « 2 » correspond à une croissance en présence de 2% de NaCl et le niveau « 3 » correspond à 3% de NaCl.

²[ETM] : niveau de concentration en ETM (Ni, Co, Cr et Mn) ; le niveau 1 correspond à [ETM]1 reflète les valeurs minimales de ces analyses (tanne « témoin »), le niveau 2 correspond à [ETM]2 et reflète les valeurs maximales (tanne contaminé) et le niveau 3 à [ETM]3 soit le double de [ETM]2.

4.4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

Dans un souci de confidentialité des résultats, les références bibliographiques ont été supprimées. Elles sont toutefois consultables dans leur intégralité dans l'annexe confidentielle 3 Partie 4 tâche 1.

A partir des racines des plantes A et B, 17 bactéries ont été isolées et présentent des propriétés potentiellement intéressantes pour l'inoculation de plantes dans un contexte de phytoremédiation des ETM. Les genres identifiés dans cette sélection de microorganismes PGP et résistants aux ETM ont déjà été décrits pour des effets similaires dans d'autres études et conditions. Sept bactéries sur 17 appartiennent au genre *B'*. Deux souches, 1R13 et 2R21, semblent particulièrement intéressantes puisqu'elles présentent les trois caractéristiques PGP testées. Le genre *B'* est en effet bien connu en bioremédiation, de nombreuses souches sont déjà commercialisées comme engrais biologique et inoculum bénéfique aux plantes par de nombreuses entreprises innovantes, en raison de leurs nombreux traits PGP (production de sidérophores, AIA, ACC désaminase, cytokinine, EPS). Le genre *S* est très diversifié et est représenté par 5 souches dans notre étude, dont deux d'entre elles, 1R25 et 1R26 étaient capables de produire de l'AIA, de fixer l'azote atmosphérique et de solubiliser les phosphates. De nombreuses souches de ce genre sont connues comme pathogènes mais de nombreuses études montrent aussi des effets positifs des bactéries de ce genre *S* sur les plantes. Certains auteurs montrent que ce genre est capable de réduire des concentrations en Cr (VI) et de promouvoir la croissance des plantes. Certaines souches sont notamment positives aux tests de production de sidérophores, d'acide indole acétique, d'ammoniaque et de catalase, de solubilisation du phosphate et à la formation de biofilm en présence et en l'absence de Cr (VI). Dans une autre étude, une souche de ce genre *S* s'est avérée capable d'éliminer l'arsenic des milieux liquides et de produire de l'acide indole acétique (IAA), des sidérophores et de l'acide 1- aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) désaminase. De plus, l'inoculation de plants de *Brassica juncea* avec cette souche bactérienne, augmentait de manière significative la biomasse, les protéines, la chlorophylle et les caroténoïdes dans la plante ainsi que les concentrations en As dans les parties aériennes et racinaires. La souche 2S12 du genre *M* est particulièrement intéressante en raison de ces capacités à se développer sur un milieu enrichi en ETM dans des concentrations [ETM]₃ soit deux fois supérieures aux concentrations maximales supportées par 88% de notre échantillon de souches bactériennes. De plus, cette souche répond positivement aux trois tests PGP investigués. Le genre d'appartenance de cette souche a été étudié dans plusieurs études pour ses capacités de (i) résistance à différents stress comme les ETM de dégradation d'hydrocarbures ou de production d'EPS. Ce genre a été retrouvé dans le microbiome d'halophytes et est couramment associé aux intertidaux et tidaux (Brito et al. 2006; Yuan et al. 2016). La souche 1R01 appartenant au genre *K* manifeste également des propriétés PGP et de résistance aux ETM. Ce genre a été décrit comme contenant des espèces et des souches avec des propriétés PGP qui présentent un potentiel dans la bioremédiation de divers polluants. Des chercheurs ont montré notamment que les plants de maïs inoculés avec une souche du genre *K* améliorent leur tolérance au stress salin. La souche est capable de réguler les hormones des plantes, elle a des capacités de facilitation de l'accès aux nutriments notamment du phosphore, elle aide à l'homéostasie des cellules végétales, au maintien de leur potentiel redox et stimule l'expression de gènes de réponse aux stress. Une autre étude de 2021 montre aussi plusieurs propriétés PGP (IAA, sidérophores, ACC désaminase) d'une souche du genre *K* avec des effets significatifs sur la croissance de la tomate sous d'importantes concentrations salines (amélioration de la biomasse racinaire, de l'élongation racinaire, augmentation du taux de germination, augmentation de la biomasse aérienne).

En ce qui concerne les champignons endophytes, la faible présence de spores dans le sol dans nos échantillons et l'absence totale d'hyphe et de structure typique des AMF dans les racines des 2 échantillonnages effectués à 7 mois d'intervalles, suggèrent que les populations d'halophytes présentes sur la tanne contaminée étudiée pourraient ne pas être associées à des AMF. Cependant, les observations de racines ont permis de constater la présence d'autres champignons, septés, parcourant l'épiderme et rentrant dans les cellules corticales des racines en formant par ailleurs des structures

ressemblant à des microsclérotés, portant la couleur bleue du bleu Trypan ou bien avec une couleur brunâtre, plus ou moins claire. Nos analyses concordent avec plusieurs études rapportant une faible mycorhization voir une absence de mycorhization chez les halophytes et en particulier celles appartenant aux Amaranthacées (Gerdemann and Nicolson 1963; Hirrel et al. 1978). Cependant, des études plus récentes montrent que les AMF peuvent toutefois s'associer à des halophytes telles que *Allenrolfea patagonica*, *Atriplex argentina*, *Heterostachys ritteriana* et *Suaeda divaricate* (Becerra et al. 2014).

L'isolement de 23 champignons endophytes cultivables et associés aux racines provenant du même échantillonnage a montré la présence de différentes souches de genre *M* (12 souches), de genre *D* (8) et de genre *P* (3), toutes productrices d'AIA et résistantes à des concentrations multi-métalliques et salines élevées. La diversité fongique cultivable observée chez la plante *B* est réduite au genre *M* tandis que les 3 genres fongiques identifiés colonisaient les racines de la plante *A*. Le genre *M* est connu pour sa pathogénicité envers diverses plantes cultivées (Cucurbitacées, Vignes) et provoque un pourrissement racinaire et le dépérissement de la vigne. Il a été plusieurs fois isolé à partir du microbiome d'halophytes (*Bassia dasyphylla*, *Kalidium foliatum*, *Suaeda acuminata*, *Suaeda salsa*). Cependant, son rôle chez ces plantes reste à élucider. Le genre *P* est un genre de champignon endophyte largement documenté possédant une grande diversité fonctionnelle au sein du genre, avec (i) des pathogènes des Cucurbitacées et provoquant une pourriture noire, (ii) des saprotrophes mais aussi (iii) des mutualistes contribuant effectivement à la réduction du stress. Il est trouvé en association avec certaines plantes médicinales, certaines halophytes, certaines cactées et certaines algues. On rapporte que le genre *P* comprend des espèces présentant des propriétés (i) PGP telle la production de diverses hormones (« indole-3-butyric acid » ou IBA et d'AIA), (ii) améliorant la croissance et la ramification des racines. Il produit des flavonoïdes et de fortes teneurs en phénols, et augmente la germination chez le riz. Le genre *D* a été récemment identifié comme DSE dans des plantes herbacées de milieux semi-arides. Ce genre est peu documenté. Il est souvent associé à des plantes herbacées type Poacées de divers milieux stressants arides. Des chercheurs en 2018 ont identifié plusieurs souches du genre *D* dont 1 souche augmentant la biomasse d'une espèce végétale de désert, *Ammopiptanthus mongolicus* et 1 autre la réduisant.

Les présentes recherches ont permis l'isolement et la caractérisation de souches bactériennes et fongiques potentiellement utilisables pour des techniques de bio-augmentation (car cultivables, capables de manifester des propriétés PGP et fortement résistants aux stress salin et métallique). Les propriétés PGP détectées en conditions *in vitro* permettent une première sélection de microorganismes potentiellement intéressants qui seront alors classiquement testés en inoculation chez des plantes afin de se rapprocher des conditions réelles. Il est impossible de tester la totalité des souches actuellement disponibles dans notre bibliothèque de souches dans des expériences en serre sur des plantes, en raison des efforts colossaux que cela représenterait (et incompatibles avec la durée de réalisation d'un projet de recherche de 3 années). Cependant, nous avons sélectionné deux souches fongiques la souche 09 (genre *D*) et la souche 07 (genre *P*) isolées de la plante *A* sur la base de nos résultats, de la littérature et de leur rapidité de croissance par rapport aux autres souches du même genre, afin de tester leurs effets en serre sur l'amélioration de la croissance des plantes et leur capacité à bio-augmenter la phytoremédiation des ETM en conditions semi-contrôlées. Deux souches bactériennes seront également choisies et prochainement testées dans une autre expérience en serre.

PRINCIPAUX RESULTATS DU CHAPITRE 4

- Isolement de 107 souches bactériennes associées aux racines possédant plusieurs propriétés PGP (fixation d'azote, AIA, solubilisation des phosphates) et identification moléculaire de 5 genres.
- Isolement de 23 souches fongiques toutes productrices d'AIA et résistantes aux ETM et identification moléculaire de 3 genres.

5. TACHE 2. CAPACITÉS DE SORPTION MÉTALLIQUE DES DIFFÉRENTS TYPES DE MICROORGANISMES ET/OU BIOMASSES PRODUITES (TACHE 1C ET TACHE 2 DU PROJET METDEP)

En raison des nombreuses contraintes et difficultés évoquées en début de ce rapport, cette tâche a été réalisée uniquement sur les souches **bactériennes** préalablement sélectionnées. A noter que les 17 bactéries sélectionnées contenaient 8 souches appartenant au genre *B*, 6 au genre *S*, 2 au genre *M*, 1 au genre *K*. En raison de leur potentielle pathogénicité, nous avons éliminé de la suite du travail les 6 bactéries du genre *S*. Ainsi, la Tâche 2 du projet a été réalisée sur les bactéries du genre *B*, *M* et *K*.

L'utilisation de microorganismes à des fins de restauration écologique et/ou de développements biotechnologiques dans des environnements contaminés aux ETM, nécessite de connaître leur capacité de sorption ou d'accumulation métalliques, quel que soit le processus mis en œuvre. Dans cette perspective, nous avons (i) sélectionné les bactéries les plus résistantes au sel, aux ETM et présentant au moins deux des trois effets PGP testés et (ii) évalué, dans différentes conditions :

- Leurs capacités à produire des EPS ;
- Leurs capacités à produire du biofilm ;
- L'influence du NaCl, de la température et du pH sur leur croissance ;
- Leurs antibiorésistances ;
- Leurs capacités de biosorption et/ou de bioaccumulation des ETM.

5.1. MATERIEL ET MÉTHODES.

Le matériel et méthodes a été résumé et anonymé et les parties confidentielles sont mises en annexe 1 des annexes du Chapitre 5.

5.1.1. CAPACITE A PRODUIRE DES EPS

Test de la capacité des bactéries à produire des EPS. La mise en évidence de la production d'exopolysaccharides a été réalisée sur un milieu salin agar additionné de glucose. Le protocole a été adapté de (Guezennec 2004). En bref, des triplicats de 5µL d'une suspension bactérienne sont déposés sur la gélose et mis à incuber. Si les colonies formées présentent un aspect particulièrement visqueux, le résultat est considéré comme positif.

Production d'EPS en vue de la réalisation des tests de chélation.

La première étape consiste en une production de biomasse bactérienne en milieu de culture liquide par des cultures successives. La biomasse est récupérée par centrifugation. Le culot est nettoyé de toute trace de milieu de culture par 3 lavages avec un milieu minimum. La biomasse est remise en suspension dans du milieu minimum et est utilisée pour inoculer des erlenmeyers de 2L de culture (28°C, 125 rpm, 96h) en milieu minimum additionné de glucose (3%). La pureté de chaque culture est vérifiée par dilution en série et étalement sur boîte.

Après 96h de culture, le moût de fermentation est centrifugé. Le surnageant est ultrafiltré sur membrane de filtration tangentielle (seuil de coupure 100 KDa). Le rétentat est lavé et concentré par ultrafiltration puis lyophilisé. La quantité d'EPS produite est alors évaluée par pesée finale de l'EPS sec.

5.1.2. CAPACITE À PRODUIRE DU BIOFILM

Dans une perspective d'automatisation, le test de formation de biofilm a été réalisé en microplaque (96 puits, à fond plat). Deux répliqués de plaques ont été réalisés en présence et en absence de la solution métallique de concentration [ETM]₂.

Sur chaque plaque, des témoins négatifs (milieu seul ou milieu + [ETM]₂) et positifs (milieu ensemencé par la bactérie) ont été réalisés. Les microplaques ont été incubées de façon statique à 28°C pendant 72h. Après 72h, le milieu de culture contenant les bactéries non adhérentes a été éliminé par retournement de la plaque. Le biofilm a été lavé trois fois à l'eau distillée. Les cellules du biofilm ont été colorées au cristal violet (CV). Après 30 minutes à température ambiante, l'excès de colorant a été éliminé. Le biofilm coloré a été lavé à l'eau déminéralisée. Après séchage, le CV intracellulaire a été remis en solution par de l'éthanol à 95%. Le contenu de chaque puits a été transféré dans une nouvelle microplaque et l'absorbance à 590 nm a été lue. La quantification de la formation de biofilm a été réalisée en calculant l'absorbance moyenne de six répliqués pour chaque espèce bactérienne testée et en divisant par l'absorbance moyenne du témoin négatif (sans bactérie). La formation de biofilm a été considérée comme effective lorsque le rapport ainsi calculé était supérieur à 2.

5.1.3. DÉTERMINATION DE LA TEMPERATURE

Dix µL d'une culture bactérienne d'une nuit ont été déposés sur milieu LB agar et incubés pendant 48°C à différentes températures 4, 10, 15, 20, 25, 28, 40, 45 et 50°C. Un cercle de croissance confluent est considéré comme positif.

5.1.4. DÉTERMINATION DU pH ET DE LA CONCENTRATION OPTIMALE EN NaCl.

La détermination des optimaux de pH (plage de 4 à 10) et de concentration en NaCl (plage de 0,5 à 14%) a été réalisée en milieu liquide en microplaques. La plaque a été incubée à 28 °C sous agitation (120 tr/min). La croissance bactérienne a été suivie par lecture de l'absorbance à 590 nm.

5.1.5. ANTIBIORESISTANCES

Les antibiorésistances bactériennes ont été évaluées par mise en culture sur boîtes des bactéries en présence de disque commerciaux imprégnés de divers antibiotiques.

5.1.6. GALERIE API

La caractérisation plus approfondie des souches du genre *B* a été réalisée sur galerie API20NE.

5.1.7. TESTS DE BIOACCUMULATION ET DE BIOSORPTION (ADSORPTION)

La détermination des quantités de métal adsorbé à la surface de la cellule bactérienne et de métal accumulé à l'intérieur de la cellule a été réalisée de la manière décrite ci-dessous. Un triplicat de culture en milieu additionné d'ETM ([ETM]₂) ainsi qu'une culture témoin sans métaux ont été ensemencés par une culture primaire de 24h et mis en culture (24h, 28°C, 125 rpm). Sur chaque surnageant de culture, les paramètres suivants ont été déterminés : (i) les CFU (Colony Forming Unit) par étalement sur boîte, (ii) le poids (frais et sec après lyophilisation) après lavage par centrifugation du culot bactérien et (iii) la concentration métallique par minéralisation (HNO₃/H₂O₂) du culot et du lavage du culot bactérien à l'EDTA. Les concentrations métalliques ont été déterminées par ICP-OES (Spectroscopie d'émission optique par plasma inductif, Varian, Varian 730-ES, Palo Alto, CA, USA).

5.2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le tableau 5.1 ci-dessous résume la plupart des résultats obtenus sur les bactéries testées à la date de restitution du présent rapport. Les quelques données manquantes seront fournies dans les semaines (ou mois) à venir. Les parties confidentielles ont été transférées en annexe 2 du chapitre 5.

Comme indiqué dans ce tableau, l'identification des microorganismes a été réalisée par voie moléculaire et par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Cependant, cette seconde technique n'a pas permis de préciser plus avant l'identité des bactéries isolées. Seule l'identification génomique a permis de confirmer que 8 des 11 souches appartiennent au genre *B*, deux au genre *M* et 1 au genre *K*. Il est désormais nécessaire de procéder à leur identification précise par des techniques dites de WGS (Whole Genome Sequencing ou Séquençage complet du génome).

Ces séquençages complets des génomes ne peuvent pas actuellement être réalisés sur le territoire et ont donc été externalisés sur une plateforme de séquençage internationale. Ces analyses sont en cours pour les génomes des 11 bactéries sélectionnées et devraient être disponibles d'ici la fin de l'année 2025 (sous réserve de complications techniques éventuelles au niveau de la plateforme de séquençage).

Concernant les huit souches du genre *B*, des analyses complémentaires de type RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ont montré que ces huit souches ne sont pas clonales et appartiennent toutes à un même groupe (« clusterisent ensemble »). Cette analyse suggère la possibilité qu'il puisse s'agir d'un nouvel écotype d'une espèce voire une nouvelle espèce du genre *B*. Le séquençage complet de leur génome (actuellement en cours), ainsi que la caractérisation biochimique des souches permettra de confirmer ou d'infirmer ces hypothèses.

Tableau 5.1: Tableau récapitulatif des identifications, tests PGP, résistances salines, métalliques, antibiotiques, croissance à différents pH et températures des souches sélectionnées.

Numéro souche	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	
Identification ISEA	2R06	1R23	1R25	1R26	1R28	1R30	2R08	2R21	1R00	1R01	1R19	
Espèce végétale source	<i>B</i>			<i>A</i>						<i>A</i>		
Identification par Séquençage 16S (2022)	<i>B</i>	<i>B</i>	<i>B</i>	<i>B</i>	<i>B</i>	<i>B</i>	<i>B</i>	<i>B</i>	<i>M</i>	<i>K</i>	<i>M</i>	
Identification par Maldit-Tof (2023)	<i>id. pas fiable</i>	<i>id. pas fiable</i>	<i>id. pas fiable</i>	<i>id. pas fiable</i>	<i>id. pas fiable</i>	<i>id. pas fiable</i>	<i>id. pas fiable</i>	<i>id. pas fiable</i>	<i>id. pas fiable</i>	<i>id. pas fiable</i>	<i>id. pas fiable</i>	
Salinité moyenne tolérée (en %)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
Résistance maximale aux ETM	[ETM]2	[ETM]2	[ETM]2	[ETM]2	[ETM]2	[ETM]2	[ETM]2	[ETM]2	[ETM]2	[ETM]2	[ETM]2	
Croissance milieu minimum sans azote	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	
Tests PGP	Production AIA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Solubilisation phosphore	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	
	Production sidérophores	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	
Mise en évidence EPS	Mise en évidence de la production d'EPS sur milieu agar	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	
	Mise en évidence de la production EPS en présence [ETM]2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Mise en évidence de la production EPS en présence [ETM]1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Biofilm	Production biofilm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Production biofilm en présence [ETM]2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Production biofilm en présence de glucose 1%	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	

	Production biofilm avec glucose 1% + [ETM]2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	
Température	4°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	10°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
	15°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	20°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	25°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	28°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	40°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	45°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
50°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-		
pH	pH 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	pH 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
	pH 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	pH 7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	pH 8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
	pH 9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
	pH 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
NaCl	0,5 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	1 %	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	
	2 %	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
	4 %	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	
	6 %	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	
	8 %	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	
	10 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
	12 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
14 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
Antibiotiques	Gentamycin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		S	
	Penicillin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R		S	
	Carbenicillin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R		S	
	Tetracyclin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		S	
	Streptomycin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		R	
	Ampicillin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R		S	
Galerie API ZONE	Cf. tableau supplémentaire													
Galerie Biolog	Cf. tableau supplémentaire													
Bioaccumulation + Biosorption	en présence de [ETM]2	Nickel	en %	8,53	12,87	4,79	4,76	5,66	13,65	12,23	10,57	11,52	13,38	10,84
			en mg/g	7,51	7,81	3,13	2,33	2,37	5,72	7,18	4,77	6,34	3,86	5,30
		Cobalt	en %	13,30	18,70	1,56	1,09	1,47	1,96	1,91	2,02	17,93	15,10	12,19
			en mg/g	2,35	2,28	0,20	0,11	0,12	0,16	0,22	0,18	1,98	0,88	1,20
		Chrome	en %	64,45	73,04	91,29	81,80	91,70	91,21	81,92	158,43	92,45	34,37	43,02
			en mg/g	5,03	3,93	5,27	3,54	3,41	3,39	4,26	6,34	4,50	0,88	1,86
		Manganèse	en %	55,17	61,61	56,38	57,00	59,19	62,19	59,97	100,71	57,29	19,04	39,91
			en mg/g	90,91	70,02	68,83	52,18	46,45	48,80	65,88	85,11	58,99	10,29	36,54

Concernant les résistances à des salinités élevées, toutes les souches testées sont résistantes à une concentration de NaCl moyenne égale à 3% lorsqu'elles sont cultivées sur milieu solide (sur boîtes), soit la salinité moyenne rencontrée dans l'eau de mer. La plupart des bactéries sélectionnées (à l'exception des souches B5, B8 et B10), présentent une grande capacité de croissance sur des milieux enrichis en sel, allant jusqu'à 14% pour certaines d'entre elles (soit plus de 4 fois la salinité moyenne naturellement rencontrée dans l'eau de mer). A noter que des tests négatifs à salinité moyenne puis de nouveau positifs à des salinités plus élevées peuvent être le reflet d'un problème ponctuel de culture bactérienne. Ces résultats devront donc être confirmés.

Concernant les résistances métalliques, ces bactéries sont toutes résistantes à des concentrations multimétalliques élevées (correspondant au niveau [ETM]2 testé dans notre étude), puisque [ETM]2 = 50 ppm Ni ; 10 ppm Co ; 5 ppm Cr ; 100 ppm Mn, soit des concentrations de 2 à 5 fois plus élevées que celles rencontrées dans des sols de tannes « rouges », contaminés aux ETM par l'érosion. Ainsi, notre étude a permis l'isolement et la caractérisation de bactéries à la fois résistantes aux ETM et au NaCl, deux caractéristiques particulièrement intéressantes en vue d'applications ultérieures. Dans cette perspective, nous avons testé leurs effets PGP et leurs capacités de sorption des ETM, ainsi que leur capacité à produire des biomolécules d'intérêt, EPS et/ou biofilm.

Concernant les effets PGP, sur les 11 bactéries testées, 9 sont capables de se développer sur un milieu dépourvu d'azote, démontrant leurs capacités à utiliser l'azote atmosphérique. Toutes les bactéries sont capables de produire de l'AIA et toutes, à l'exception des deux du genre *M*, sont aptes à solubiliser du phosphate. La production du sidérophore (quatrième effet PGP testé, en lien avec l'assimilation du fer) n'est observée que pour deux souches du genre *B*, les deux souches du genre *M*, ainsi que pour la souche du genre *K*. A l'exception de l'une des deux souches du genre *M* qui n'en présente que deux, la plupart des souches testées présente au moins 3 des 4 effets PGP testés, ce qui est très encourageant pour leur utilisation dans de futures applications de restauration écologique ou de développements biotechnologiques. Deux souches du genre *B* (B1 et B5) présentent même les quatre effets PGP testés.

Concernant la capacité à produire des EPS, toutes les souches du genre *B* ainsi que l'une des deux souches du genre *M* sont positives lorsque testées sur milieu solide. Cette production semble constitutive et n'est en tout cas pas stimulée en présence de métaux, quelle que soient les concentrations multimétalliques testées, puisque les résultats sont négatifs en présence d'ETM aux concentrations [ETM]1 et [ETM]2.

Concernant la production de biofilm, seules deux souches présentent cette capacité : la souche B1 du genre *B'* et la souche B9 du genre *M*. Dans les deux cas la production de biofilm est observée en présence de Glucose dans le milieu de culture. Dans le cas de la bactérie B9, la production de biofilm semble stimulée par la présence d'ETM à une concentration relativement élevée ([ETM]2). A noter que seule la souche B1 présente à la fois la capacité de produire des EPS et du biofilm.

Concernant les optima de croissance testés (pH et concentration en NaCl), on observe que les souches du genre *B* sont capables de croître dans une gamme très large de pH (allant de pH 5 à pH 9 inclus), tandis que les autres genres sont plus sensibles aux variations de pH. En effet, les souches du genre *M* présentent une plage de croissance comprise entre pH 5 et pH 7 pour l'une et entre pH 5 et pH 8 pour l'autre. En revanche, la gamme de pH des bactéries du genre *K* est beaucoup plus restreinte, puisque cette souche ne se développe qu'entre pH 6 et 8.

Concernant la gamme de température, les souches du genre *B* présentent une gamme de tolérance particulièrement importante puisqu'elles se développent entre 10 et 50°C inclus, contrairement aux 3 autres souches pour lesquelles la gamme de température de croissance est réduite, et oscille entre 15 et 45°C.

Concernant les antibiorésistances, toutes les souches du genre *B'* sont sensibles à l'ensemble des antibiotiques testés. La souche B9 est sensible à l'ensemble des antibiotiques testés sauf à la streptomycine pour laquelle elle est résistante. La souche B7 est sensible à la gentamycine, à la streptomycine et à la tétracycline, mais est résistante à la pénicilline, à la carbenicilline et à l'ampicilline. Ces résultats font des souches du genre *B* des candidats idéaux pour de futures applications. Les deux souches du genre *M* présentent des antibiorésistances.

Tableau 5.2. Résultats galerie API pour les 8 bactéries du genre *B*

	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8
	2R06	1R23	1R25	1R26	1R28	1R30	2R08	2R21
Nitrate reduction to nitrite	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction to nitrogen	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole production	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose fermentation	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-
β -glucosidase (hydrolyse)	+	+	+	+	+	+	+	+
Protease (hydrolyse)	+	+	+	+	+	+	+	+
β -galactosidase	+	+	+	+	+	+	+	+
Assimilation								
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+
N-acetyl-glucosamine	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
Potassium gluconate	+	+	+	+	+	+	+	+
Capric acid	-	-	-	-	-	-	-	-
Adipic acid	-	-	-	-	-	-	-	-
Malic acid	+	+	+	+	+	+	+	+
Trisodium citrate	-	-	-	-	-	-	-	-
Phenylacetic acid	-	-	-	-	-	-	-	-

Concernant les tests biochimiques réalisés grâce à la galerie API 20NE (Tableau 5.2), on constate que toutes les souches présentent le même profil. Elles sont capables de produire de la beta-glucosidase, de la beta-galactosidase et des protéases mais elles sont incapables de produire de l'uréase et de l'arginine dihydrolase. Elles ne produisent pas d'indole et ne fermentent pas le glucose. Elles sont capables de réduire les nitrates en nitrites et en diazote (dénitrification). Elles assimilent le glucose, l'arabinose, le mannitol, le maltose, le gluconate de potassium et l'acide malique. Elles ne peuvent par contre pas assimiler la N-acétyl glucosamine, les acides caproïques, adipique, malique et phénylacétique.

Les résultats des tests biochimiques de la galerie Biolog (non montrés ici) sont plus complexes. Toutefois on note que les souches en général sont capables d'utiliser l'alpha-D-glucose, le saccharose et le lactate de sodium 1%, le chlorure de lithium mais n'utilisent pas la dextrine, le D-maltose, le D-thréalose, le D-cellobiose, le gentiobiose, le D-turanose, le stachyose, le D-raffinose, le sym-D-lactose, le D-melibiose, le bêta-Méthyl-D-glucoside, les dérivés d'oses (glucose, galactose, mannose) aminés N-acétylés et l'acide N-acétyl-neuraminique. Elles n'utilisent pas non plus le D-galactose, D fructose, le 3-méthyl glucose, le Fucose (L ou D), le L-rhamnose, l'inosine, l'acide fusidique, la D-serine, , le D-arabitol, le myo-inositol, les dérivés 6-phosphate du D-glucose et du D-fructose, l'acide D ou L-aspartique, l'acide glutamique, la L-histidine, l'acide L-pyroglutamique, la L-sérine, l'acide D galacturonique, l'acide D galactonique lactone, l'acide D-gluconique, l'acide D-glucuronique, la glucuronamide, l'acide mucique, l'acide kinique, le tetrazolium violet ou bleu, l'acide D-lactique méthyl ester, l'acide alpha cetoglutarique, l'acide D-malique, l'acide bromo-succinique, l'acide gamma-amino-butérique, l'acide alpha hydroxy-butérique, le beta-hydroxy-D, L-butérique, l'acide acéto-acétique, le tween 40, l'acide propionique, l'acide acétique, l'acide formique. Les résultats concernant les autres sources de carbones ou les activités enzymatiques sont souche-dépendants.

Concernant la sensibilité aux antibiotiques testés sur la galerie, on note une sensibilité des souches à la vancomycine, l'acide nalidixique, la guanidine HCl, la lincomycine, le niaproof 4 mais une résistance à l'azétronam, le chlorure de lithium, le tellurite de potassium.

Concernant les tests de biosorption et bioaccumulation, les expérimentations ont été réalisées en absence d'ETM (témoin) ou en présence du mélange multimétallique [ETM]2. Les résultats ne sont disponibles que pour les 8 souches du genre *B* au moment de la rédaction de ce rapport. Les tests pour les trois autres souches (2 du genre *M* et 1 du genre *K*) ont bien été réalisés mais les résultats des analyses ICP ne sont pas disponibles (panne de l'appareil et transition vers l'installation du nouvel appareil). Les résultats obtenus pour chacun des quatre ETM testés (mélange [ETM]2) sont présentés dans le **Tableau 5.3 et 5.4. (tous deux transférés en Annexe 2 - Résultats discussion du Chapitre 5).**

Concernant l'ensemble des ETM, on note que le Manganèse et le Chrome sont très fortement captés par les bactéries (à 60% en moyenne pour le manganèse et entre 67 et 95% pour le chrome). Toutefois, les différentes souches semblent avoir développé des stratégies adaptatives différentes vis-à-vis de ces ETM. En effet, si l'on compare par exemple le comportement des souches B2 et B5 vis à vis du Mn, on observe qu'alors que les deux souches peuvent capter des quantités d'ETM initiales semblables (autour de 65%), la souche B2 adsorbe en surface 73% du Mn qu'elle assimile, tandis que la souche B5 en internalise 85%. Concernant le chrome, à l'exception des souches B1 et B2, toutes les autres souches semblent privilégier la bioaccumulation de cet ETM. Concernant le Nickel et le Cobalt, les quantités initiales d'ETM captées par les bactéries sont moindres, avec au maximum 16% du Ni initial et 22% au maximum du Co initial pour l'ensemble des souches testées. Cependant, alors que la majorité du Ni semble être adsorbé à la surface des cellules, le processus est souche-dépendant pour le Co, qui est plutôt adsorbé en surface par les souches B1, B2, B6 et B7 et internalisé pour toutes les autres. Ainsi, selon le métal testé, les souches privilégient soit la biosorption, soit la bioaccumulation.

Concernant le Nickel, les résultats sont assez homogènes d'une souche à l'autre et montrent que les huit souches du genre *B* ont tendance à plus adsorber le nickel à la surface cellulaire plutôt que de le bioaccumuler. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature concernant la tendance à biosorption préférentielle du nickel par les espèces de ce genre.

Ce résultat est inverse à celui obtenu pour le manganèse, qui semble plus bioaccumulé par les bactéries du genre *B* qu'adsorbé à leurs surfaces, à l'exception des souches B1 et B2. Ce résultat est également

observé pour le chrome, qui est plus bioaccumulé qu'adsorbé à la surface des cellules sauf pour les souches B1 et B2. Enfin, les souches ont développé des stratégies différentes concernant le cobalt : B3, B4, B5 et B8 bioaccumulent le cobalt alors que B1, B2, B6 et B7 adsorbent plutôt le cobalt en surface.

Quoiqu'il en soit, et quel que soit le processus mis en œuvre, biosorption et/ou bioaccumulation, les deux processus concourent à la captation métallique et donc à la décontamination des ETM environnementaux et sont donc intéressants. C'est pourquoi nous avons également calculé la quantité totale d'ETM captés par les bactéries, rapportée à la masse de matière sèche.

Les quantités maximales d'ETM captés par les différentes souches diffèrent beaucoup d'un ETM à l'autre : de 2 à 7,8 mg / g de matière sèche pour le Ni ; de 0,1 à 2,3 mg / g de matière sèche pour le Co ; de 3 à 6,3 mg / g de matière sèche pour le Cr et de 1 à 3 µg/g (0,001 à 0,003 mg/g) de matière sèche pour le Mn.

Concernant le chrome, cette capacité de sorption est assez faible, puisque certaines espèces bactériennes du genre *B'* ont été rapportées dans la littérature comme pouvant en biosorber jusqu'à 40 mg/g de matière sèche. Concernant le manganèse, là encore, certaines souches du genre *B* ont été décrites comme capables de biosorber des quantités de manganèse bien plus élevées (de l'ordre de 45 mg/g de matière sèche) que celle que nous avons rapportées ici. Concernant le nickel, les quantités d'ETM moyennes assimilées par nos 8 souches *B*, comprises entre 2 et 7,8 mg / g de matière sèche sont comparables à celles trouvées pour d'autres souches du genre *B*, mais inférieures à celles rapportées pour d'autres genres (autour de 40 mg/g de matière sèche), isolées à partir de sources thermales. Cependant, il est à noter que nos résultats doivent encore être affinés. En effet, de très nombreux paramètres influencent la capacité de biosorption/bioaccumulation des ETM par les microorganismes et doivent être testés pour chacun d'entre eux, et notamment : la concentration initiale de l'ETM considéré, la durée de contact ETM/microorganisme, la salinité employée, le pH, la température, pour ne citer que les plus importants. Il est ainsi possible que les valeurs présentées dans les tableaux en Annexes puissent être améliorées.

La capacité de sorption/chélation des ETM par les EPS récupérés à partir des bactéries qui en produisent sera évaluée dans les mois à venir, puisque, comme évoqué plus haut, les EPS produits sous contrainte métallique peuvent activement (et efficacement) participer à leur adsorption (Mathivanan et al. 2021). Ils sont, à ce titre, très étudiés en tant que biosorbants pour la bioremédiation des ETM (Santana de Oliveira Santos 2023). Cette dernière n'a pas pu être établie à ce stade du fait de problèmes de production des polymères à grande échelle (pas de fermenteur opérationnel et productions en « batch ») et des émeutes de Nouvelle-Calédonie en 2024. En effet, l'étudiante que nous avons recrutée en stage pour assurer la production des polymères en batch en avril 2024 puis tester leurs capacités de sorptions métalliques a vu son stage interrompu de manière brutale en mai 2024. Deux EPS ont été produits à ce jour (à partir des souches B1 et B2). Les autres sont en cours de production. Tous seront testés pour leurs capacités de sorptions métalliques. Dans le même sens, les biofilms produits seront également testés pour leurs capacités de sorptions métalliques, ces structures biologiques étant également considérées comme des solutions prometteuses dans le cadre de décontamination des eaux chargées en divers polluants (Sharma 2022; Saini et al. 2023; Karnwal et al. 2024).

5.2. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les travaux de caractérisation des souches bactériennes cultivables isolées à partir du sol rhizosphérique et du rhizoplan des trois espèces de plantes halophiles se développant sur les sols de tannes néo-calédoniennes nous ont permis d'isoler et de caractériser pleinement une pré-sélection de 107 souches bactériennes (toutes résistantes à 40 ppm de Nickel et à 2,5% de NaCl), disponibles au laboratoire. Ces 107 souches bactériennes ont été criblées sous le double prisme de leurs résistances métalliques et de leurs effets PGP. Ceci nous a permis de mettre en évidence 51 souches présentant des résistances à un mélange multimétallique dit [ETM]₂, oscillant chacune entre 2 à 5 fois celles rencontrées dans les tannes contaminées par des sols latéritiques (érosion et coulées). Sur ces 51 souches, 5 ont été « perdues » au fur et à mesure des cultures bactériennes (un phénomène courant). Les 47 souches restantes ont toutes été caractérisées morphologiquement, et présentaient toutes des caractéristiques morphologiques (macroscopiques et/ou microscopiques) tout ou parties distinctes. Sur ces 47 souches, 3 tests d'effets PGP ont été réalisés *in vitro*. 16 d'entre elles, présentant au minimum

2 des 3 effets PGP testés, ainsi que deux autres souches présentant des particularités morphologiques, ont été sélectionnées pour une caractérisation complète par séquençage du gène cible codant pour l'ARNr 16S et par MALDI-TOF. Ces séquençages du gène cible nous ont permis de montrer que sur les 18 bactéries, 6 appartenaient au genre *S*, 8 au genre *B*, 2 au genre *M*, 1 au genre *U* et 1 au genre *K*. En raison du caractère fréquemment pathogène des bactéries du genre *S*, ces dernières ont été écartées de la suite de l'étude. Les 11 bactéries restantes ont été caractérisées plus en détail. Tout d'abord, une tentative d'identification plus fine de ces 11 bactéries a été entreprise par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (sur la plateforme du Médipôle, en partenariat avec l'IPNC). Cette approche s'est révélée décevante puisqu'aucune des souches isolées n'a pu être identifiée dans les bases de données actuellement disponibles. Cela pourrait cependant indiquer qu'il pourrait s'agir de nouvelles espèces ou de nouveaux écotypes bactériens. Cela sera confirmé ou infirmé par séquençage des génomes complets de certaines de ces bactéries (actuellement en cours sur une plateforme externe spécialisée). Sur ces 11 souches, 8 étant du genre *B*, ces dernières ont été caractérisées plus en aval par : des tests de type RAPD, ainsi que par des galeries API et Biolog. Les résultats indiquent que les huit souches du genre *B* ne sont pas des clones. Au vu des résultats biochimiques (qui sont souche-dépendants mais avec des traits toutefois majoritaires), nous sommes potentiellement en présence d'une nouvelle espèce ou d'un écotype de genre *B* autochtone à la Nouvelle-Calédonie.

En effet, les tests RAPD ont montré qu'il s'agissait de 8 souches bactériennes différentes (et non de clones), et, bien que les analyses par MALDI-TOF n'aient pas permis de préciser l'identité de chacune des souches, ils ont montré que les 8 souches « clusterisaient » ensemble d'un point de vue phylogénétique, renforçant la potentialité qu'il puisse s'agir d'un nouvel écotype bactérien ou d'une nouvelle espèce.

Ces 11 souches ont été caractérisées plus avant en termes de résistance saline, de paramètres physico-chimiques optimaux de croissance bactériennes (pH et température), et toutes présentent une gamme de croissance large tant en termes de pH (de 5 à 10) que de températures (de 10 à 50 °C). Ceci est particulièrement intéressant en vue du développement de stratégies de décontamination des eaux ou des sols, pour lesquels les gammes de pH et de température sont compatibles avec ces données. Par ailleurs, les tests d'antibiorésistances, montrant la sensibilité des 8 souches du genre *B* à l'ensemble des antibiotiques testés, renforce encore leurs potentialités, ce qui n'est pas le cas des autres souches bactériennes, puisque les 2 souches du genre *M* et la souche du genre *K* présentent au moins 2 antibiorésistances, ce qui est problématique en vue d'utilisations potentielles en aval.

Les capacités des 8 souches du genre *B* à adsorber en surface et/ou bioaccumuler les ETM ont été évaluées et, bien qu'intéressantes, ces dernières semblent relativement faibles comparées à celles rapportées pour d'autres souches du même genre isolées à partir d'autres environnements. Outre le fait que de nombreux paramètres physicochimiques et cinétiques influencent cette bioremédiation et restent encore à tester (voir discussion supra), nous ne pouvons pas exclure que notre stratégie expérimentale initiale ait peut-être été trop ambitieuse. En effet, afin de mimer des conditions de pollutions environnementales se produisant en conditions naturelles, nous avons systématiquement exposé nos microorganismes bactériens à des mélanges multimétalliques. Il est possible, qu'une forme de compétition ait pu s'établir entre les différents ETM et que ceci ait impacté négativement leur capacité à capter les métaux pour chacun d'entre eux par les bactéries. Cependant, nous ne pouvons pas omettre le fait qu'il puisse également y avoir une synergie des effets des métaux sur les potentialités des organismes. Ces possibilités devront être challengées et, dans cette perspective, nous allons rétester les capacités de biosorption/bioaccumulation de chacune des bactéries étudiées en présence non plus d'un mélange, mais de chacun des 4 ETM, utilisé seul, à la concentration testée dans le mélange [ETM]₂. La détermination des concentrations inhibitrices à 50% (CI₅₀) de la croissance pour chaque métal et des mélanges métalliques serait intéressantes à évaluer.

Les capacités à produire des EPS et du biofilm ont été évaluées. Toutes les souches du genre *B* testées, ainsi qu'une des deux souches du genre *M* (B11), sont aptes à produire des EPS quand testées sur boîte de culture. La souche de B1, à la fois capable de produire des EPS, de former du biofilm et dépourvue d'antibiorésistance, nous paraît particulièrement prometteuse et sera investiguée plus en avant. La seconde souche (B9) du genre *M*, bien que ne répondant pas positivement au test de production d'EPS sur boîte, est capable de produire du biofilm en réponse à une stimulation métallique (en présence de [ETM]₂) et de glucose.

En perspective, les EPS et les biofilms de toutes les souches bactériennes en produisant seront préparés en grandes quantités, puis leurs capacités de chélation/sorption métalliques seront testées.

Enfin, le même travail devra être mené sur l'ensemble des souches fongiques isolées. En résumé, nous avons encore bien du travail en perspective. Cependant, ce dernier ne sera possible que si nous disposons de ressources humaines dédiées.

6. ETUDES DES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES TOTALES ASSOCIÉES AUX PLANTES HALOPHILES DES TANNES DE NOUVELLE-CALÉDONIE PAR DES APPROCHES DE METAGÉNÉTIQUE CIBLÉE (TACHE 4)

Les études de communautés microbiennes par des approches cultures dépendantes, telles que réalisées et présentées dans les chapitres 4 et 5 ci-dessus (et correspondant aux Tâches 1, 2 et 3 du projet METDEP) sont indispensables dans la perspective de pouvoir utiliser les microorganismes isolés, purs, cultivables et pleinement caractérisés, dans le développement d'applications ultérieures (quelles qu'elles soient, et dans notre cas plus spécifiquement celles liées à la restauration écologique et/ou au développement de biotechnologies innovantes de décontamination des ETM). Toutefois, les microorganismes cultivables ne représentent qu'une proportion infime (moins de quelques %) du microbiome total des espèces végétales ou des sols auxquels ils sont associés. C'est pourquoi, afin de mieux comprendre la contribution microbienne aux adaptations aux contraintes environnementales, la caractérisation complète du microbiome total des espèces ou des sites d'intérêt doit généralement être entreprise par des approches cultures-indépendantes, menées parallèlement aux approches cultures dépendantes. Ceci permet d'avoir une vision d'ensemble bien plus fine des interactions microbiennes ayant cours dans l'écosystème étudié. Parmi les approches cultures-indépendantes, la métagénomique ciblée (ou metabarcoding), qui consiste de manière simplifiée à extraire les ADN totaux d'un échantillon puis à séquencer de manière sélective des gènes cibles permettant la mise en évidence de toutes les espèces microbiennes présentes, est la méthode de choix. C'est donc ce type d'approche que nous avons souhaité mettre en œuvre sur les deux sites de tannes modèles que nous avons choisis dans le cadre de notre étude, à savoir un site « Rouge », contaminé par les ETM de manière naturelle et un site vierge de toute contamination. Sur ces deux sites, nous avons entrepris une caractérisation du microbiome bactérien et fongique : (i) du sol à distance des trois espèces halophytes étudiées, (ii) du sol en interaction directe avec les racines des trois espèces végétales (ou sol rhizosphérique), ainsi que (iii) des racines et (iv) des parties aériennes de nos plantes modèles. Pour cela, nous avons suivi une stratégie d'échantillonnage précise, testé de très nombreux protocoles d'extractions d'ADN (stage de Jeanne Grillo, 2022) afin de trouver les conditions optimales permettant d'obtenir un ADN en quantité suffisante et de qualité compatible avec les techniques de séquençage à haut débit nouvelle génération (NGS : Next Generation Sequencing). Nous avons ensuite testé la qualité des amplifications obtenues et envoyé nos échantillons pour séquençage sur une plateforme spécialisée (MacroGen Inc.). A ce stade d'avancement du projet, seules les amplifications pour le gène cible de l'ARNr 16S, permettant de caractériser les cortèges bactériens sont disponibles. En effet, à ce jour, les amplifications du gène cible codant pour les ITS (Internal Transcribed Spacer), permettant de caractériser les communautés fongiques, ne fonctionnent pas chez le prestataire choisi (bien que fonctionnant dans notre laboratoire). C'est pourquoi, seuls seront présentés ici (en annexe confidentielle) les résultats pour les cortèges bactériens ; directement traités et écrits sous forme d'un article scientifique en cours de finalisation pour soumission (conformément à ce qui était prévu dans le cadre du projet METDEP). Dès qu'ils seront disponibles, le même type d'article sera écrit avec les données fongiques, puisque nous continuons activement cette partie du projet avec notre prestataire.

Dans cette partie du travail, nous avons mené une étude à haute résolution sur les communautés bactériennes associées à trois espèces d'halophytes et aux sols en vrac dans un site côtier contaminé et un site de référence en Nouvelle-Calédonie. En utilisant le séquençage à haut débit d'amplicons d'ARNr 16S et des analyses écologiques multivariées, nous avons étudié comment la diversité, la composition et la structure microbienne varient en fonction des espèces, des compartiments végétaux

et des niveaux de contamination. Nous avons également examiné le rôle d'ETM spécifiques dans les changements de communautés en utilisant des méthodes d'ordination sous contrainte.

Nos objectifs spécifiques étaient les suivants : i) comparer la diversité bactérienne alpha et bêta entre les espèces végétales, les compartiments et les conditions de contamination ; ii) identifier les groupes taxonomiques qui sont enrichis ou appauvris dans les environnements contaminés et dans des compartiments végétaux spécifiques ; iii) évaluer la contribution relative des métaux biodisponibles à la variation de la communauté microbienne ; et enfin iv) caractériser les taxons bioindicateurs potentiels spécifiques aux compartiments et leurs associations avec les gradients de métaux. Avec ces objectifs, cette recherche aborde deux questions écologiques clés : i) comment les gradients de contamination et l'identité de la plante hôte interagissent-ils pour façonner la structure et la diversité des communautés bactériennes dans les systèmes halophytes côtiers ? Et ii) dans quelle mesure les compartiments végétaux et le microbiote associé peuvent-ils servir de bioindicateurs ou de médiateurs du stress dû aux métaux lourds dans les écosystèmes estuariens tropicaux ?

En établissant un lien entre l'écologie microbienne et l'assainissement potentiel de l'environnement dans un hotspot de biodiversité d'importance mondiale, nos résultats offrent de nouvelles perspectives sur les réponses biotiques complexes à la contamination des sols et éclairent les futures stratégies de phytoremédiation et de conservation dans les environnements côtiers riches en métaux.

Comme indiqué plus haut, nous avons choisi de rédiger cette partie du travail sous la forme d'un article scientifique, actuellement en cours de finalisation donc confidentiel. Nous ne détaillerons pas ici l'ensemble des tests (deux stages et l'implication d'une ingénieure de recherche) qui ont permis la mise au point (particulièrement chronophage et complexe des protocoles employés dans cette partie du travail). Un résumé des travaux réalisés est présenté ci-dessous. Une fois accepté, l'article sera mis à disposition.

Résumé des travaux : La végétation halophyte et le microbiote qui lui est associé jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement des écosystèmes côtiers et l'atténuation des polluants, mais la dynamique écologique des interactions plantes-microbes-métaux dans les sols ultramafiqes tropicaux reste mal comprise. Ici, nous avons examiné les communautés bactériennes dans le sol en vrac, la rhizosphère, l'endosphère racinaire et les compartiments foliaires de trois halophytes calédoniennes communes sur un site contaminé par des métaux lourds et sur un site de référence adjacent. En utilisant le séquençage à haut débit du gène de l'ARNr 16S, nous avons caractérisé la diversité alpha et bêta, la composition taxonomique et l'influence des métaux extractibles par le DTPA. Le compartiment (sol en vrac, feuilles, racines et sol rhizosphérique) est apparu comme le principal moteur de la diversité alpha ($p < 0,001$), le sol en vrac et les feuilles abritant la richesse et l'homogénéité les plus élevées, et les racines les plus faibles. Les espèces hôtes ont exercé un effet secondaire mais significatif sur la diversité ($p < 0,01$), tandis que les effets de la contamination se sont manifestés principalement par des interactions entre espèces et compartiments ($p < 0,001$). Les ordinations de la diversité bêta (NMDS, $R^2 \approx 0,88$, $p = 0,001$) ont révélé des assemblages microbiens distincts selon le compartiment et l'identité de la plante, et les analyses spécifiques au phylum ont montré que les Pseudomonadota dominaient le sol et la phyllosphère, que les Cyanobacteriota monopolisaient les feuilles (>90 %), et que les Chloroflexota étaient confinés dans les matrices du sol. Les gradients de métaux, en particulier le Ni et le Co, étaient significativement corrélés avec les communautés rhizosphériques de deux des trois espèces végétales, ce qui indique un filtrage induit par les métaux. Nos résultats démontrent que les compartiments végétaux agissent à la fois comme des bioindicateurs du stress dû aux métaux lourds et comme des réservoirs de taxons tolérants aux métaux et potentiellement favorables à la croissance des plantes (par exemple, Pseudomonas, Halomonas) avec des applications dans la rhizoremédiation ou la rhizostabilisation. Cette répartition multifactorielle des niches souligne l'importance des interactions hôte-microbiome-métal dans les stratégies d'assainissement des côtes tropicales et fournit une feuille de route pour l'exploitation du microbiote des halophytes en biotechnologie et en conservation.

7. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GÉNÉRALES DU PROJET METDEP.

Ce travail exploratoire, le premier du genre sur les tannes de Nouvelle-Calédonie, a permis d'explorer les microbiomes fongiques et bactériens totaux (par métagénomique ciblée) et cultivables (approches cultures dépendantes) associés aux espèces des sols et des plantes halophiles se développant sur les sols de tannes néo-calédoniens.

Les données de métagénomique ne sont actuellement exploitables que pour le microbiome bactérien, mais nous espérons obtenir celles pour le microbiome fongique. Ces données ont montré une structuration des communautés bactériennes en lien avec le compartiment étudié (plus de richesse bactérienne dans les sols que dans les racines ou les parties aériennes des plantes), mais aussi en fonction de l'espèce végétale étudiée.

L'isolement des microbiomes cultivables des trois espèces halophytes a permis de cultiver plusieurs centaines d'espèces bactériennes et fongiques. Ces espèces ont ensuite été testées de manière systématique et sélectionnées pour leur résistance au sel, aux ETM, ainsi que pour leur capacité à présenter des effets promoteurs de la croissance des plantes (PGP). Cela nous a permis d'isoler des souches bactériennes et fongiques particulièrement résistantes aux métaux et présentant plusieurs effets PGP. Les souches bactériennes sélectionnées appartiennent aux genres *B*, *M* et *K*. Certaines de ces souches sont connues d'après la littérature pour présenter des propriétés intéressantes de Biosorption ou Bioaccumulation des ETM. Toutes sont capables de produire des EPS et/ou du biofilm et seront investiguées plus avant. Les souches fongiques sélectionnées appartiennent aux genres *P* et *D*. Tous ces genres, qu'ils soient bactériens ou fongiques sont connus dans la littérature pour être particulièrement adaptés aux métaux et présenter des avantages de croissance aux espèces végétales avec lesquelles ils sont en association.

Tous ces genres continueront donc d'être investigués plus avant par notre équipe de recherche. En particulier, la vérification de leurs effets PGP et de leurs effets sur la bioaccumulation des ETM par les espèces végétales devront être vérifiés, dans le cadre d'expériences en conditions contrôlées en serre, puis idéalement, sur le terrain.

Références

- Ahmed MK, Kundu GK, Al-Mamun MH, Sarkar SK, Akter MS, Khan MS. 2013. Chromium (VI) induced acute toxicity and genotoxicity in freshwater stinging catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 92:64–70. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.02.008>
- Al-Battashi H, Joshi SJ, Pracejus B, Al-Ansari A. 2016. The Geomicrobiology of Chromium (VI) Pollution: Microbial Diversity and its Bioremediation Potential. *Open Biotechnol J*. 10(1):379–389. <https://doi.org/10.2174/1874070701610010379>
- Alam MR, Islam R, Anh Tran TK, Van D Le, Rahman MM, Griffin AS, Yu RMK, MacFarlane GR. 2021. Global patterns of accumulation and partitioning of metals in halophytic saltmarsh taxa: A phylogenetic comparative approach. *J Hazard Mater* [Internet]. 414(February):125515. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125515>
- Ali A, Shaheen SM, Guo D, Li Y, Xiao R, Wahid F, Azeem M, Sohail K, Zhang T, Rinklebe J, et al. 2020. Apricot shell- and apple tree-derived biochar affect the fractionation and bioavailability of Zn and Cd as well as the microbial activity in smelter contaminated soil. *Environ Pollut*. 264:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114773>
- Allenbach M, Andréoli R, Cavarero V, Caze N, Couturier A, Boissieu F De, Despinoy M, Dumas S, Flouvat F, Allenbach M, et al. 2015. Fonctionnement des petits bassins versants miniers . Rapp synthèse CNRT “nickel son environnement.” 298.
- Amari T, Ghnaya T, Abdelly C. 2017. Nickel, cadmium and lead phytotoxicity and potential of halophytic plants in heavy metal extraction. *South African J Bot* [Internet]. 111:99–110. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.03.011>
- Amari T, Souid A, Ghabriche R, Porrini M, Lutts S, Sacchi GA, Abdelly C, Ghnaya T. 2020. Why does the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* better tolerate Ni toxicity than *Brassica juncea*: Implication of antioxidant defense systems. *Plants*. 9(3). <https://doi.org/10.3390/plants9030312>
- Audet M-A. 2009. Le massif du Koniambo , Nouvelle-Calédonie Formation et obduction d ' un complexe ophiolitique du type SSZ . Enrichissement en nickel , cobalt et scandium dans les profils résiduels. [place unknown].
- Ayele A, Godeto YG. 2021. Bioremediation of Chromium by Microorganisms and Its Mechanisms Related to Functional Groups. *J Chem*. 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/7694157>
- Aziz I, Mujeeb A. 2022. Halophytes for phytoremediation of hazardous metal(loid)s: A terse review on metal tolerance, bio-indication and hyperaccumulation. *J Hazard Mater*. 424. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127309>
- Baize D, Girard M. 2009. Référentiel pédologique 2008 1 st ed. Versailles. QUAE GIE. [place unknown].
- Baltruschat H, Fodor J, Harrach BD, Niemczyk E, Barna B, Gullner G, Janeczko A, Kogel KH, Schäfer P, Schwarczinger I, et al. 2008. Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytol*. 180(2):501–510. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02583.x>
- Barbier EB, Hacker SD, Kennedy C, Koch EW, Stier AC, Silliman BR. 2011. The value of estuarine and coastal ecosystem services. *Ecol Monogr*. 81(2):169–193. <https://doi.org/10.1890/10-1510.1>
- Bashan Y, de-Bashan LE, Prabhu SR, Hernandez JP. 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant Soil*. 378(1–2):1–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>
- Baudrimont M, Dominique Y, Feurtet-mazel A, Gourvès P, Gunkel-grillon P, Lefrançois E, Letourneur Y, Marquié J, Baudrimont M, Dominique Y, et al. 2019. Dispersion et exposition humaine aux métaux en Nouvelle-Calédonie : synthèse des résultats To cite this version : HAL Id : hal-03409815. CNRT « Nickel son Environ ».
- Becerra A, Bartoloni N, Cofré N, Soteras F, Cabello M. 2014. Arbuscular mycorrhizal fungi in saline soils: Vertical distribution at different soil depth. *Brazilian J Microbiol*. 45(2):585–594. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000200029>
- Becker K, Fischer M, Heier T, Waller F, Achatz B, Baltruschat H, Neumann C, Wettstein D Von, Franken P, Kogel K, Hu R. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress

tolerance , disease resistance , and higher yield. 102(38):13386–13391.

Berthelot C, Chalot M, Leyval C, Blaudez D. 2019. From darkness to light: Emergence of the mysterious dark septate endophytes in plant growth promotion and stress alleviation. *Endophytes a Grow World.*:143–164. <https://doi.org/10.1017/9781108607667.008>

Bilal L, Asaf S, Hamayun M, Gul H, Iqbal A, Ullah I, Lee IJ, Hussain A. 2018. Plant growth promoting endophytic fungi *Asprgillus fumigatus* TS1 and *Fusarium proliferatum* BRL1 produce gibberellins and regulates plant endogenous hormones. *Symbiosis.* 76(2):117–127. <https://doi.org/10.1007/s13199-018-0545-4>

Biscéré T, Rodolfo-Metalpa R, Lorrain A, Chauvaud L, Thébault J, Clavier J, Houlbrèque F. 2015. Responses of two scleractinian corals to cobalt pollution and ocean acidification. *PLoS One.* 10(4):1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122898>

Bonaventure P. 2023. Capacité des halophytes de bord de mer de Nouvelle-Calédonie à fixer les éléments traces- métalliques (ETMs) : applications potentielles à la phytoremédiation bioaugmentée. [place unknown]: Université de la Nouvelle-Calédonie.

Bonaventure P, Guentas L, Burtet-Sarramegna V, Amir H. 2023. Potential of Halophytes-Associated Microbes for the Phytoremediation of Metal-Polluted Saline Soils. *Appl Sci.* 13(7). <https://doi.org/10.3390/app13074228>

Bonnet X, Briand MJ, Brischoux F, Letourneur Y, Fauvel T, Bustamante P. 2014. Anguilliform fish reveal large scale contamination by mine trace elements in the coral reefs of New Caledonia. *Sci Total Environ* [Internet]. 470–471:876–882. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.027>

Boula A, Laporte-Magoni C, Gunkel-Grillon P, Bour O, Selmaoui-Folcher N. 2022. Potential contamination of stream waters by ultramafic mining sediments: Identification of geochemical makers (New Caledonia). *J Geochemical Explor.* 232(August 2021). <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2021.106879>

Bourles A, Amir H, Gensous S, Cussonneau F, Medevielle V, Juillot F, Bazire A, Meyer M, Burtet-Sarramegna V, Cavaloc Y, et al. 2020. Investigating some mechanisms underlying stress metal adaptations of two *Burkholderia sensu lato* species isolated from New Caledonian ultramafic soils. *Eur J Soil Biol.* 97. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2020.103166>

Bourles A, Guentas L, Chalkiadakis E, Majorel C, Juillot F, Cavaloc Y, Burtet-sarramegna V, Medevielle V, Jourand P, Amir H. 2019. New Caledonian ultramafic conditions structure the features of *Curtobacterium citreum* strains that play a role in plant adaptation. 15(August):1–15.

Brian-Jaisson F. 2014. Identification et caractérisation des exopolymères de biofilms de bactéries marines. [place unknown]: Université de Toulon.

Briand Marine J., Bustamante P, Bonnet X, Churlaud C, Letourneur Y. 2018. Tracking trace elements into complex coral reef trophic networks. *Sci Total Environ* [Internet]. 612:1091–1104. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.257>

Briand Marine J, Bustamante P, Bonnet X, Churlaud C, Letourneur Y. 2018. Science of the Total Environment Tracking trace elements into complex coral reef trophic networks. *Sci Total Environ* [Internet]. 612:1091–1104. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.257>

Briand MJ, Letourneur Y, Bonnet X, Wafo E, Fauvel T, Brischoux F, Guillou G, Bustamante P. 2014. Spatial variability of metallic and organic contamination of anguilliform fish in New Caledonia. *Environ Sci Pollut Res.* 21(6):4576–4591. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2327-0>

Brito EMS, Guyoneaud R, Goñi-Urriza M, Ranchou-Peyruse A, Verbaere A, Crapez MAC, Wasserman JCA, Duran R. 2006. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Res Microbiol.* 157(8):752–762. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.03.005>

Burke DJ, Weis JS, Weis P. 2000. Release of metals by the leaves of the salt marsh grasses *Spartina alterniflora* and *Phragmites australis*. *Estuar Coast Shelf Sci.* 51(2):153–159. <https://doi.org/10.1006/ecss.2000.0673>

Burke L, Kura Y, Kassem K, Revenga C, Spalding M, McAllister D. 2001. PILOT ANALYSIS OF GLOBAL ECOSYSTEMS: Coastal ecosystems. *World Reso.* [place unknown]. https://doi.org/10.1007/978-0-387-36699-9_19

Cavarero V, Peltier A, Aubail X, Leroy A, Dubuisson B, Jourdain S, Ganachaud A, Gibelin A-L, Lefèvre J, Menkes C, Lengaigne M. 2012. Les évolutions passées et futures du climat de la Nouvelle-Calédonie. *La Météorologie*. 8(77):13. <https://doi.org/10.4267/2042/47371>

Certain C. 2021. Variabilité spatio-temporelle et expérimentale de la valeur fonctionnelle de cinq plantes halophytes de Nouvelle-Calédonie, candidates à l'agriculture biosaline [Internet]. [place unknown]: Université de la Nouvelle-Calédonie. <http://www.theses.fr/2021NCAL0003>

Chibuiké GU, Obiora SC. 2014. Heavy metal polluted soils: Effect on plants and bioremediation methods. *Appl Environ Soil Sci*. 2014(August 2014). <https://doi.org/10.1155/2014/752708>

Cofré N, Becerra A, Nouhra E, Soteras F. 2012. Arbuscular mycorrhizae and dark-septate endophytes on *Atriplex cordobensis* in saline sites from Argentina. *J Agric Technol*. 8(7):2201–2214.

Colette M, Guentas L, Patrona L Della, Ansquer D, Callac N. 2023. Dynamic of active microbial diversity in rhizosphere sediments of halophytes used for bioremediation of earthen shrimp ponds. *Environ Microbiome*. 18(1):1–20. <https://doi.org/10.1186/s40793-023-00512-x>

Cordier S, Barguil Y, Dominique Y, St-Jean A, Mengant S, Le Bot B, Ayotte P. 2017. Niveaux d'imprégnation et déterminants de l'exposition humaine aux métaux en Nouvelle-Calédonie. CNRT « Nic. [place unknown]. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Cranenbrouck S, Voets L, Bivort C, Renard L, Strullu D-G, Declerck S. 2005. Methodologies for in Vitro Cultivation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi with Root Organs Chapter 18 In *soil Biology*. S. Declerck, D.-G. Strullu and AF, editor. [place unknown]: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-27331-x_18

Danloux J, Laganier R. 1991. Classification et quantification des phénomènes d'érosion, de transport et de sédimentation sur les bassins touchés par l'exploitation minière en Nouvelle-Calédonie. *Hydrol Cont*. 6(1):15–28.

David G, Guillaud D, Sodter E. 1995. Relief, Climat et population en Nouvelle-Calédonie. *Agric spéciale Nouv Calédonie - ORSTOM*:4–8.

Desclaux T, Pischedda M, Lemonnier H, Soulard B, Gendre R Le. 2017. Vers une modélisation déterministe des écoulements de surface en Nouvelle-Calédonie Implémentation du code GR4H sur quatre bassins versants du Grand Nouméa.

Duda-Chodak A, Blaszczyk U. 2008. The Impact of Nickel on Human Health. *J Elem*. 13(4):685–696.

Duke NC, McKenzie J, Wood A. 2010. *Tidal Wetland Flora of New Caledonia* Author Norman C Duke, Jock Mackenzie and Apanie. [place unknown].

Dumas P. 2004. Caractérisations des littoraux insulaires : approche géographique par télédétection et SIG pour une gestion intégrée. Application en Nouvelle-Calédonie. :1 vol. (401 f.).

Dumas P, Cohen O. 2014. Influence de la susceptibilité à l'érosion hydrique des bassins-versants sur l'évolution du rivage : exemples dans le sud de la Nouvelle-Calédonie. (*Ea* 4242):269–278.

Etesami H. 2018. Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues: Mechanisms and future prospects. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 147(August 2017):175–191. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.032>

Evelin H, Kapoor R, Giri B. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: A review. *Ann Bot*. 104(7):1263–1280. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp251>

Fernández PM, Viñarta SC, Bernal AR, Cruz EL, Figueroa LIC. 2018. Bioremediation strategies for chromium removal: Current research, scale-up approach and future perspectives. *Chemosphere*. 208:139–148. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.166>

Flowers TJ, Colmer TD. 2008. Salinity tolerance in halophytes. *New Phytol*. 179(4):945–963. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02531.x>

Fourati E, Vogel-Mikuš K, Wali M, Kavčič A, Gomilšek JP, Kodre A, Kelemen M, Vavpetič P, Pelicon P, Abdelly C, Ghnaya T. 2020. Nickel tolerance and toxicity mechanisms in the halophyte *Sesuvium portulacastrum* L. as revealed by Ni localization and ligand environment studies. *Environ Sci Pollut Res*. 27(19):23402–23410. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05209-8>

Fourati E, Wali M, Vogel-Mikuš K, Abdelly C, Ghnaya T. 2016. Nickel tolerance, accumulation and

subcellular distribution in the halophytes *Sesuvium portulacastrum* and *Cakile maritima*. *Plant Physiol Biochem.* 108:295–303. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.07.024>

Franken P. 2012. The plant strengthening root endophyte *Piriformospora indica*: Potential application and the biology behind. *Appl Microbiol Biotechnol.* 96(6):1455–1464. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4506-1>

Gabrie C, Bouvet G, Chevillon C, Cros A, Downer M, Juncker L, Levy-Hartman L, You H. 2008. Programme CRISP : Analyse écorégionale marine de la Nouvelle-Calédonie”. Documentation Ifreco, consulté le 13 juin 2025 [H fr/items/show/1701](http://fr/items/show/1701)., editor. [place unknown].

Garbisu C, Alkorta I. 2001. Phytoextraction: A cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresour Technol.* 77(3):229–236. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00108-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00108-5)

Garcin M, Baills A, Le Cozannet G, Bulteau T, Auboin A-L, Sauter J. 2013. Pluri-decadal impact of mining activities on coastline mobility of estuaries of New Caledonia (South Pacific). *J Coast Res.* 65:494–499. <https://doi.org/10.2112/si65-084.1>

Gei V, Isnard S, Erskine PD, Echevarria G, Fogliani B, Jaffré T, Van Der Ent A. 2020. A systematic assessment of the occurrence of trace element hyperaccumulation in the flora of New Caledonia. *Bot J Linn Soc.* 194(1):1–22. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boaa029>

Genchi G, Carocci A, Lauria G, Sinicropi MS, Catalano A. 2020. Nickel: Human health and environmental toxicology. *Int J Environ Res Public Health.* 17(3). <https://doi.org/10.3390/ijerph17030679>

Gerdemann JW, Nicolson TH. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Br Mycol Soc [Internet].* 46(2):235–244. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(63\)80079-0](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(63)80079-0)

Germande O, Gunkel-Grillon P, Dominique Y, Feurtet-Mazel A, Bierque E, Dassié E, Daffe G, Pierron F, Baudrimont I, Baudrimont M. 2022. Impact of nickel mining in New Caledonia on marbled eels *Anguilla marmorata*. *J Hazard Mater.* 436(May). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129285>

Ghnaya T, Slama I, Messedi D, Grignon C, Ghorbel MH, Abdelly C. 2007. Effects of Cd²⁺ on K⁺, Ca²⁺ and N uptake in two halophytes *Sesuvium portulacastrum* and *Mesembryanthemum crystallinum*: Consequences on growth. *Chemosphere.* 67(1):72–79. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.09.064>

Giovannetti M, Avio L, Salutini L. 1991. Morphological, cytochemical and ontogenetic characteristics of a new species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *Can J Bot.* 69(1):161–167.

Gordon SA, Weber RP. 1951. Colorimetric estimation of indole-3-acetic acid. *Plant Physiol.* 26(1):192–195. <https://doi.org/doi:10.1104/pp.26.1.192>.

Guerinot M Lou. 2000. The ZIP family of metal transporters. *Biochim Biophys Acta.* 1465:190–198. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00138-3](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00138-3)

Guezennec J. 2004. Les bactéries des sources hydrothermales profondes à l’origine de nouvelles molécules bio-actives? *Vertigo.*:488–493. <https://doi.org/doi.org/10.4000/vertigo.3214>

Gunkel-Grillon P, Laporte-Magoni C, Lemestre M, Bazire N. 2014. Toxic chromium release from nickel mining sediments in surface waters, New Caledonia. *Environ Chem Lett.* 12(4):511–516. <https://doi.org/10.1007/s10311-014-0475-1>

Gupta P, Diwan B. 2017. Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnol Reports [Internet].* 13:58–71. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.12.006>

Haferburg G, Kothe E. 2010. Metallomics: Lessons for metalliferous soil remediation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 87(4):1271–1280. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2695-z>

Hammer EC, Nasr H, Pallon J, Olsson PA, Wallander H. 2011. Elemental composition of arbuscular mycorrhizal fungi at high salinity. *Mycorrhiza.* 21(2):117–129. <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0316-4>

Haouet S, Lefeuvre J-C, Bocquet A. 2016. Profil D’Ecosystemes De La Nouvelle-Calédonie. :195.

Hasanuzzaman M, Nahar K, Alam MM, Bhowmik PC, Hossain MA, Rahman MM, Prasad MNV, Ozturk

- M, Fujita M. 2014. Potential use of halophytes to remediate saline soils. *Biomed Res Int*. 2014(July). <https://doi.org/10.1155/2014/589341>
- Hazrat Ali. 2012. Phytoremediation of heavy metals by *Trifolium alexandrinum*. *Int J Environ Sci*. 2(3). <https://doi.org/10.6088/ijes.00202030031>
- Hirrel MC, Mehravaran H, Gerdemann JW. 1978. Vesicular–arbuscular mycorrhizae in the Chenopodiaceae and Cruciferae: do they occur? *Can J Bot*. 56(22):2813–2817. <https://doi.org/10.1139/b78-336>
- Holguin G, Vazquez P, Bashan Y. 2001. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: An overview. *Biol Fertil Soils*. 33(4):265–278. <https://doi.org/10.1007/s003740000319>
- Houzelot V, Ranc B, Laubie B, Simonnot MO. 2018. Agromining of hyperaccumulator biomass: Study of leaching kinetics of extraction of nickel, magnesium, potassium, phosphorus, iron, and manganese from *Alyssum murale* ashes by sulfuric acid. *Chem Eng Res Des* [Internet]. 129:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2017.10.030>
- Howe P, Malcolm H, Dobson S (Stuart), United Nations Environment Programme., International Labour Organisation., World Health Organization., Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals., International Program on Chemical Safety. 2004. Manganese and its compounds : environmental aspects. (April):63.
- Jing C, Xu Z, Zou P, Tang Q, Li Y, You X, Zhang C. 2019. Coastal halophytes alter properties and microbial community structure of the saline soils in the Yellow River Delta, China. *Appl Soil Ecol* [Internet]. 134(October):1–7. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.10.009>
- Jones DL, Nguyen C, Finlay RD. 2009. Carbon flow in the rhizosphere: Carbon trading at the soil-root interface. *Plant Soil*. 321(1–2):5–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9925-0>
- Joshi M, Mishra A, Jha B. 2012. NaCl plays a key role for in vitro micropropagation of *Salicornia brachiata*, an extreme halophyte. *Ind Crops Prod* [Internet]. 35(1):313–316. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.024>
- Juillot F. et al. 2019. Dynamique des métaux de la mine au lagon en Nouvelle-Calédonie : DYNAMINE. Rapport sc. Environnement" RC "Nickel et son, editor. [place unknown].
- Jumpponen A, Trappe JM. 1998. Dark septate endophytes: A review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytol*. 140(2):295–310. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1998.00265.x>
- Juniper S, Abbott L. 1993. Vesicular-arbuscular mycorrhizas and soil salinity S. *Mycorrhiza*. 4:45–57.
- Kaminsky LM, Trexler R V., Malik RJ, Hockett KL, Bell TH. 2019. The Inherent Conflicts in Developing Soil Microbial Inoculants. *Trends Biotechnol* [Internet]. 37(2):140–151. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.11.011>
- Karnwal A, Martolia S, Dohroo A, Al-Tawaha ARMS, Malik T. 2024. Exploring bioremediation strategies for heavy metals and POPs pollution: the role of microbes, plants, and nanotechnology. *Front Environ Sci*. 12(July):1–31. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2024.1397850>
- Khan AL, Gilani SA, Waqas M, Al-Hosni K, Al-Khiziri S, Kim YH, Ali L, Kang SM, Asaf S, Shahzad R, et al. 2017. Endophytes from medicinal plants and their potential for producing indole acetic acid, improving seed germination and mitigating oxidative stress. *J Zhejiang Univ Sci B*. 18(2):125–137. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1500271>
- Khan M, Shaheen S, Shafaqat A, Yi Z, Cheng L, Muhammad Daud Khan, S Azam M, Rizwan M, Afzal M, Irum G, Khan MJ, Zhu S. 2020. Phytoremediation In-situ Application Chapitre 2. Springer. Brian R. Shmaefsky, editor. [place unknown]. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-00099-8> ©
- Kumawat KC, Razdan N, Saharan K. 2022. Rhizospheric microbiome: Bio-based emerging strategies for sustainable agriculture development and future perspectives. *Microbiol Res* [Internet]. 254(May 2021):126901. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126901>
- Lal S, Ratna S, Said O Ben, Kumar R. 2018. Biosurfactant and exopolysaccharide-assisted rhizobacterial technique for the remediation of heavy metal contaminated soil: An advancement in metal phytoremediation technology. *Environ Technol Innov* [Internet]. 10:243–263. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.02.011>

- Laroche O. 2011. Revégétalisation de sites miniers et valorisation de boues de station d'épuration : cas de la Nouvelle-Calédonie. :128.
- Latham M, Quantin P, Aubert G. 1978. Etude des sols de la Nouvelle-Calédonie : nouvel essai sur la classification, la caractérisation, la pédogenèse et les aptitudes des sols de Nouvelle-Calédonie : carte pédologique de la Nouvelle-Calédonie à 1/1 000 000 : carte d'aptitudes culturale et for. ORSTOM Paris, editor. [place unknown].
- Lebigre J-M. 2004. Le « Cœur de Voh » (Nouvelle-Calédonie). Cah d'Outre-Mer. 57(225):109–112. <https://doi.org/10.4000/com.2313>
- Lecellier A. 2013. Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle. [place unknown]: Université de Champagne-Ardenne.
- Leysens L, Vinck B, Van Der Straeten C, Wuyts F, Maes L. 2017. Cobalt toxicity in humans—A review of the potential sources and systemic health effects. Toxicology [Internet]. 387:43–56. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.05.015>
- Li C, Wang H, Liao X, Xiao R, Liu K, Bai J, Li B, He Q. 2022. Heavy metal pollution in coastal wetlands: A systematic review of studies globally over the past three decades. J Hazard Mater. 424(May 2021). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127312>
- Li Y, Kong Y, Teng D, Zhang X, He X, Zhang Y, Lv G. 2018. Rhizobacterial communities of five co-occurring desert halophytes. PeerJ. 2018(8):1–27. <https://doi.org/10.7717/peerj.5508>
- Liu L, Li W, Song W, Guo M. 2018. Remediation techniques for heavy metal-contaminated soils: Principles and applicability. Sci Total Environ [Internet]. 633:206–219. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.161>
- Liu Z, Wang L ao, Ding S, Xiao H. 2018. Enhancer assisted-phytoremediation of mercury-contaminated soils by *Oxalis corniculata* L., and rhizosphere microorganism distribution of *Oxalis corniculata* L. Ecotoxicol Environ Saf [Internet]. 160(March):171–177. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.05.041>
- Lutts S, Lefèvre I. 2015. How can we take advantage of halophyte properties to cope with heavy metal toxicity in salt-affected areas? Ann Bot. 115(3):509–528. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu264>
- Lutts S, Qin P, Han RM. 2016. Salinity influences biosorption of heavy metals by the roots of the halophyte plant species *Kosteletzkya pentacarpos*. Ecol Eng. 95:682–689. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.06.009>
- Mandyam K, Jumpponen A. 2005. Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. Stud Mycol [Internet]. 53:173–189. <https://doi.org/10.3114/sim.53.1.173>
- Marchand C, Allenbach M, Lallier-Vergès E, Della Patrona L, Virly S, Rataud C. 2008. Structuration écologique et bilan des processus biogéochimiques au sein d'une mangrove «atelier» (Baie de Térémba, Nouvelle-Calédonie) -Impact potentiel des effluents de la crevetticulture.
- Marchand C, Fernandez JM, Moreton B, Landi L, Lallier-Vergès E, Baltzer F. 2012. The partitioning of transitional metals (Fe, Mn, Ni, Cr) in mangrove sediments downstream of a ferrallitized ultramafic watershed (New Caledonia). Chem Geol. 300–301:70–80. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2012.01.018>
- Margesin R, Schinner F. 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. Extremophiles. 5(2):73–83. <https://doi.org/10.1007/s007920100184>
- Marouani N, Tebourbi O, Mahjoub S, Yacoubi MT, Sakly M, Benkhalifa M, Rhouma KB. 2012. Effects of hexavalent chromium on reproductive functions of male adult rats. Reprod Biol [Internet]. 12(2):119–133. [https://doi.org/10.1016/S1642-431X\(12\)60081-3](https://doi.org/10.1016/S1642-431X(12)60081-3)
- Martínez ML, Intralawan A, Vázquez G, Pérez-Maqueo O, Sutton P, Landgrave R. 2007. The coasts of our world: Ecological, economic and social importance. Ecol Econ. 63(2–3):254–272. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2006.10.022>
- Mathivanan K, Chandirika JU, Mathimani T, Rajaram R, Annadurai G, Yin H. 2021. Production and functionality of exopolysaccharides in bacteria exposed to a toxic metal environment. Ecotoxicol Environ Saf [Internet]. 208(October 2020):111567. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111567>
- Mishra AK, Mohanty B. 2008. Acute toxicity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). Environ Toxicol

Pharmacol. 26(2):136–141. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2008.02.010>

Mousavi Kouhi S, Moudi M. 2020. Assessment of phytoremediation potential of native plant species naturally growing in a heavy metal-polluted industrial soils. *Environ Sci Pollut Res.* 84. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07578-6>

Naikoo MI, Kafeel U, Naushin F, Khan FA. 2020. Halophytes in India and Their Role in Phytoremediation. *Handb Halophytes.*:2345–2365. https://doi.org/10.1007/978-3-030-57635-6_115

Van Nevel L, Mertens J, Oorts K, Verheyen K. 2007. Phytoextraction of metals from soils: How far from practice? *Environ Pollut.* 150(1):34–40. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.05.024>

Nikalje GC, Yadav K, Panna S. 2019. Halophyte Responses and Tolerance to Abiotic Stresses. In: Hasanuzzaman M, Nahar K, Öztürk M, editors. *Ecophysiol Abiotic Stress Responses Util Halophytes*. Springer,. [place unknown]: Hasanuzzaman, Mirza Nahar, Kamrun Öztürk, Münir. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-3762-8>

Nriagu J O PJM. 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature.* 333:134–139.

O'Neal SL, Zheng W. 2015. Manganese Toxicity Upon Overexposure: a Decade in Review. *Curr Environ Heal reports.* 2(3):315–328. <https://doi.org/10.1007/s40572-015-0056-x>

Oelmüller R, Sherameti I, Tripathi S, Varma A. 2009. *Piriformospora indica*, a cultivable root endophyte with multiple biotechnological applications. *Symbiosis.* 49(1):1–17. <https://doi.org/10.1007/s13199-009-0009-y>

Pan J, Peng F, Tedeschi A, Xue X, Wang T, Liao J, Zhang W, Huang C. 2020. Do halophytes and glycophytes differ in their interactions with arbuscular mycorrhizal fungi under salt stress? A meta-analysis. *Bot Stud [Internet].* 61(1). <https://doi.org/10.1186/s40529-020-00290-6>

Paredes-Páliz KI, Caviedes MA, Doukkali B, Mateos-Naranjo E, Rodríguez-Llorente ID, Pajuelo E. 2016. Screening beneficial rhizobacteria from *Spartina maritima* for phytoremediation of metal polluted salt marshes: comparison of gram-positive and gram-negative strains. *Environ Sci Pollut Res [Internet].* 23(19):19825–19837. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7184-1>

Parmar, S., & Singh V. 2015. Phytoremediation Approaches for Heavy Metal Pollution : A Review. *J Plant Sci Res.* 2(2):1–8.

Della Patrona L. 2016. Evaluation, valorisation et gestion durable des ressources biologiques de la mangrove : 30 années de R & D en agriculture biosaline, pisciculture et crevetticulture. *Habilitati. Nouvelle-Calédonie U de la, editor.* [place unknown].

Paul A, Dey S, Ram DK, Das AP. 2024. Hexavalent Chromium Pollution and its Sustainable Management through Bioremediation. *Geomicrobiol J [Internet].* 41(4):324–334. <https://doi.org/10.1080/01490451.2023.2218377>

Pereira EC, Vazquez de Aldana BR, Arellano JB, Zabalgogezcoa I. 2021. The Role of Fungal Microbiome Components on the Adaptation to Salinity of *Festuca rubra* subsp. *pruinosa*. *Front Plant Sci.* 12(July). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.695717>

Peškan-Berghöfer T, Shahollari B, Pham HG, Hehl S, Markert C, Blanke V, Kost G, Varma A, Oelmüller R. 2004. Association of *Piriformospora indica* with *Arabidopsis thaliana* roots represents a novel system to study beneficial plant-microbe interactions and involves early plant protein modifications in the endoplasmic reticulum and at the plasma membrane. *Physiol Plant.* 122(4):465–477. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2004.00424.x>

Pires C, Franco AR, Pereira SIA, Henriques I, Correia A, Magan N, Castro PML. 2017. Metal(loid)-Contaminated Soils as a Source of Culturable Heterotrophic Aerobic Bacteria for Remediation Applications. *Geomicrobiol J [Internet].* 34(9):760–768. <https://doi.org/10.1080/01490451.2016.1261968>

Plenchette C, Duponnois R. 2005. Growth response of the saltbush *Atriplex nummularia* L. to inoculation with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *J Arid Environ.* 61(4):535–540. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2004.10.003>

Poljakoff-Mayber A, Gale J. 1975. *Plants in Saline Environments*. Berlin Hei. A. Poljakoff-Mayber and J. Gale, editor. [place unknown]. <https://doi.org/10.1038/086431a0>

- Priya AK, Gnanasekaran L, Dutta K, Rajendran S, Balakrishnan D, Soto-Moscoco M. 2022. Biosorption of heavy metals by microorganisms: Evaluation of different underlying mechanisms. *Chemosphere* [Internet]. 307(P4):135957. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135957>
- Qin S, Feng W-W, Zhang Y-J, Wang T-T, Xiong Y-W, Xing K. 2018. Diversity of bacterial microbiota of coastal Halophyte *Limonium sinense* and amelioration of salinity stress damage. *Appl Environ Microbiol*. 84(19):1–19.
- Qin Y, Druzhinina IS, Pan X, Yuan Z. 2016a. Microbially Mediated Plant Salt Tolerance and Microbiome-based Solutions for Saline Agriculture. *Biotechnol Adv* [Internet]. 34(7):1245–1259. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.005>
- Qin Y, Druzhinina IS, Pan X, Yuan Z. 2016b. Microbially Mediated Plant Salt Tolerance and Microbiome-based Solutions for Saline Agriculture. *Biotechnol Adv* [Internet]. 34(7):1245–1259. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.005>
- Quantin P, Becquer T, Bourdon E, Bouleau A, Guenin H, Millot G. 1996. Composition minéralogique et disponibilité des éléments Mn, Ni, Cr, Co et Zn de sols “ferritiques” dérivés de péridotites en Nouvelle-Calédonie. *Journées Natl l'Etude des Sols Sols Transf des Polluants dans les Paysages Rennes 96*, 5, Rennes (FRA), 1996/04/22-25 [Internet].(May):221–222. http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_7/b_fdi_51-52/010019619.pdf
- Rehman K, Fatima F, Waheed I, Akash MSH. 2018. Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *J Cell Biochem*. 119(1):157–184. <https://doi.org/10.1002/jcb.26234>
- Richards K. 2021. Chimie du fer et stratégie végétale : de la biosorption successive du fer et de l'arsenic à la chimie verte et durable. [place unknown]: Université de Montpellier.
- Richer, Forges B, Pascal M. 2008. La Nouvelle-Calédonie, un “point chaud” de la biodiversité mondiale gravement menacé par l'exploitation minière. *J Soc Ocean*. 126–127(1):95–112.
- Riva V, Mapelli F, Syranidou E, Crotti E, Choukrallah R, Kalogerakis N, Borin S. 2019. Root bacteria recruited by phragmites australis in constructed wetlands have the potential to enhance azo-dye phytodepuration. *Microorganisms*. 7(10). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100384>
- Saini S, Tewari S, Dwivedi J, Sharma V. 2023. Biofilm-mediated wastewater treatment: a comprehensive review. *Mater Adv*. 4(6):1415–1443. <https://doi.org/10.1039/d2ma00945e>
- Santana de Oliveira Santos LT. 2023. “Extracellular Polymeric Substances (EPS)-Producing by Bacteria for the Bioremediation of Heavy Metals.” *Biomed J Sci Tech Res*. 53(2):44586–44593. <https://doi.org/10.26717/bjstr.2023.53.008385>
- Santos-Echeandía J, Vale C, Caetano M, Pereira P, Prego R. 2010. Effect of tidal flooding on metal distribution in pore waters of marsh sediments and its transport to water column (Tagus estuary, Portugal). *Mar Environ Res* [Internet]. 70(5):358–367. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2010.07.003>
- Sarwar N, Imran M, Shaheen MR, Ishaque W, Kamran MA, Matloob A, Rehim A, Hussain S. 2017. Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives. *Chemosphere* [Internet]. 171:710–721. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.116>
- Saxena G, Purchase D, Mulla SI, Saratale GD, Bharagava RN. 2019. Phytoremediation of Heavy Metal-Contaminated Sites: Eco-environmental Concerns, Field Studies, Sustainability Issues, and Future Prospects. In: de Voogt P (eds), editor. *Rev Environ Contam Toxicol*. Vol. 249. [place unknown]. https://doi.org/DOI 10.1007/398_2019_24
- Schat H, Llugany M, Vooijs R, Hartley-Whitaker J, Bleeker PM. 2002. The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *J Exp Bot*. 53(379):2381–2392. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf107>
- Sen M, Dastidar MG. 2010. Chromium removal using various biosorbents. *Iran J Environ Heal Sci Eng*. 7(3):182–190.
- Sepulveda B, Tapia M, Tapia P, Milla F, Pavez O. 2020. Heavy metals bioabsorption and soil stabilization by. *Rev Int Contam Ambie*. 36(3):567–575.
- Sevin B. 2014. ULTRABASIQUE DE NOUVELLE-CALEDONIE : Localisation dans l'espace et le temps des gisements nickelifères. Thèse Dr en Sci l'Univers, Univ la Nouv.:1–536.

- Shabala S. 2013. Learning from halophytes: Physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. *Ann Bot.* 112(7):1209–1221. <https://doi.org/10.1093/aob/mct205>
- Sharma P. 2022. Role and significance of biofilm-forming microbes in phytoremediation -A review. *Environ Technol Innov* [Internet]. 25:102182. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102182>
- Singh B, Sherman DM, Mosselmans JFW, Gilkes RJ, Wells MA. 2002. Incorporation of Cr, Mn and Ni into goethite (α -FeOOH): mechanism from extended X-ray absorption fine structure spectroscopy. *Clay Miner.* 37(4):639–649. <https://doi.org/10.1180/00985502374066>
- Singh Vipin Kumar, Singh R, Rajput VD, Singh Vivek Kumar. 2023. Halophytes for the sustainable remediation of heavy metal-contaminated sites: Recent developments and future perspectives. *Chemosphere* [Internet]. 313(November 2022):137524. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137524>
- St-Jean A, Barguil Y, Dominique Y, Le Bot B, Ayotte P, Cordier S. 2018. Nickel and associated metals in New Caledonia: Exposure levels and their determinants. *Environ Int* [Internet]. 118(January):106–115. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.05.045>
- Stanovych A, Deyris P-A, Grison C. 2017. Phytotechnologies remédiatrices et chimie verte : une symbiose d'avenir. *L'Actualité Chim.*(414):I–XII.
- Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. 2012. Heavy Metals Toxicity and the Environment. In: Luch A E, editor. [place unknown]. <https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4>
- Teixeira C, Almeida CMR, Nunes da Silva M, Bordalo AA, Mucha AP. 2014. Development of autochthonous microbial consortia for enhanced phytoremediation of salt-marsh sediments contaminated with cadmium. *Sci Total Environ* [Internet]. 493:757–765. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.040>
- Tkacz A, Poole P. 2021. The plant microbiome: The dark and dirty secrets of plant growth. *Plants People Planet.* 3(2):124–129. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10167>
- Trescases JJ. 1975. L'évolution géochimique supergène des roches ultrabasiques en zone tropicale. *MÉMOIRES O.R.S.T.O.M.* No 78, editor. [place unknown].
- Tripathi P, Singhal A, Jha PK. 2022. Metal Transport and Its Impact on Coastal Ecosystem. In: Madhav S, Nazneen S, Singh P, editors. *Coast Ecosyst Environ importance, Curr Challenges Conserv Meas. Coastal Ec.* [place unknown]: Springer, Cham.; p. 239–264. https://doi.org/10.1007/978-3-030-84255-0_10
- Trouvelot, A., Kough, J.L. and Gianinazzi-Pearson V. 1986. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi-Pearson, V. et Gianinazzi S, editor. *Physiol Genet Asp mycorrhizae.* INRA. [place unknown].
- Tumolo M, Ancona V, Paola D De, Losacco D, Campanale C, Massarelli C, Uricchio VF. Chromium Pollution in European Water , Sources , Health Risk , and Remediation Strategies : An Overview. (Vi).
- Turner TR, James EK, Poole PS. 2013. The plant microbiome. *Genome Biol.* 14(6):1–10. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-209>
- Vandenkoornhuysse P, Quaiser A, Duhamel M, Le Van A, Dufresne A. 2015. The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytol.* 206(4):1196–1206. <https://doi.org/10.1111/nph.13312>
- Vårhammar A, Mclean CM, Man R, Yu K, Macfarlane R. 2019. Uptake and partitioning of metals in the Australian saltmarsh halophyte , samphire (*Sarcocornia quinque fl ora*). 156(October 2018):25–37. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2019.04.001>
- Varma A, Bakshi M, Lou B. 2012. Piriformospora indica : A Novel Plant Growth-Promoting Mycorrhizal Fungus. 1(June):117–131. <https://doi.org/10.1007/s40003-012-0019-5>
- Verma N, Sharma R. 2017. Bioremediation of Toxic Heavy Metals: A Patent Review. *Recent Pat Biotechnol.* 11(3). <https://doi.org/10.2174/187220831166617011111631>
- Virly. 2008. atlas_des_mangroves_de_nouvelle-caledonie.pdf.
- Wali M, Fourati E, Hmaeid N, Ghabriche R, Poschenrieder C, Abdelly C, Ghnaya T. 2015. NaCl alleviates Cd toxicity by changing its chemical forms of accumulation in the halophyte *Sesuvium portulacastrum*. *Environ Sci Pollut Res.* 22(14):10769–10777. <https://doi.org/10.1007/s11356-015->

Wang X, Sun R, Tian Y, Guo K, Sun H, Liu X, Chu H, Liu B. 2020. Long-Term Phytoremediation of Coastal Saline Soil Reveals. *Ecol Evol Sci.* 5(2):1–15.

Warda S, Fortas Z. 2018. Growth and mycorrhizal responses to cadmium stress in some halophytic plants. *Growth and mycorrhizal responses to cadmium stress in some halophytic plants.* 37(January 2019):169–177. <https://doi.org/10.25252/SE/18/61564>

Warda S, Fortas Z. 2019. The beneficial role of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of wetland plants and tolerance to metal stress. (January). <https://doi.org/10.24425/125916>

Wuana Raymond A., Okieimen FE. 2011. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *ISRN Ecol [Internet].* 2011:1–20. <https://doi.org/10.5402/2011/402647>

Wuana Raymond A, Okieimen FE. 2011. Heavy Metals in Contaminated Soils : A Review of Sources , Chemistry , Risks and Best Available Strategies for Remediation. 2011. <https://doi.org/10.5402/2011/402647>

Yang X, YU HY, Zhang T, Guo J, Zhang X. 2016. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Improve the Antioxidative Response and the Seed Production of Suaedoideae Species Suaeda physophora Pall under Salt Stress. *Not Bot Horti Agrobot Cluj-Napoca.* 44(2):533–540. <https://doi.org/10.15835/nbha44210543>

Yi J, Shing L, Lo H, Liu H, Qian P, Cheng J, Brien AO. 2021. Study of Heavy Metals and Microbial Communities in Contaminated Sediments Along an Urban Estuary. 8(November):1–17. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.741912>

Yuan Z, Druzhinina IS, Labbé J, Redman R, Qin Y, Rodriguez R, Zhang C, Tuskan GA, Lin F. 2016. Specialized Microbiome of a Halophyte and its Role in Helping Non-Host Plants to Withstand Salinity. *Nat Publ Gr [Internet].*(September). <https://doi.org/10.1038/srep32467>

Yusuf M, Fariduddin Q, Hayat S, Ahmad A. 2011. Nickel: An overview of uptake, essentiality and toxicity in plants. *Bull Environ Contam Toxicol.* 86(1):1–17. <https://doi.org/10.1007/s00128-010-0171-1>

Zhang Yujie, Zhang Yan, Liu M, Shi X, Zhao Z. 2008. Dark septate endophyte (DSE) fungi isolated from metal polluted soils: Their taxonomic position, tolerance, and accumulation of heavy metals in Vitro. *J Microbiol.* 46(6):624–632. <https://doi.org/10.1007/s12275-008-0163-6>

Zhao Q, Bai J, Gao Y, Zhang G, Lu Q, Jia J. 2021. Heavy metal contamination in soils from freshwater wetlands to salt marshes in the Yellow River Estuary , China. *Sci Total Environ [Internet].* 774:145072. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145072>

Zheng H, Wang X, Chen L, Wang Z, Xia Y, Zhang Y, Wang H, Luo X, Xing B. 2018. Enhanced growth of halophyte plants in biochar-amended coastal soil: roles of nutrient availability and rhizosphere microbial modulation. *Plant Cell Environ.* 41(3):517–532. <https://doi.org/10.1111/pce.12944>

Zuluaga-Gomez J, Bonaveri P, Zuluaga D, Álvarez-Peña C, Ramírez-Ortiz N. 2020. Techniques for water disinfection, decontamination and desalination: A review. *Desalin Water Treat [Internet].* 181:47–63. <https://doi.org/10.5004/dwt.2020.25073>