

Production de sidérophores dans des sols acides et calcimagnésiques et alteration de minéraux (oxyhydroxydes, silicates) par des champignons ectomycorhiziens

Françoise Watteau

▶ To cite this version:

Françoise Watteau. Production de sidérophores dans des sols acides et calcimagnésiques et alteration de minéraux (oxyhydroxydes, silicates) par des champignons ectomycorhiziens. Sciences de la Terre. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1990. Français. NNT: 1990NAN10404. tel-01754398

HAL Id: tel-01754398 https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754398

Submitted on 30 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

THESE

présentée à l'Université de Nancy I

pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Nancy I

par

Françoise WATTEAU

PRODUCTION DE SIDEROPHORES DANS DES SOLS ACIDES ET CALCIMAGNESIQUES ET ALTERATION DE MINERAUX

(oxyhydroxydes, silicates)

PAR DES CHAMPIGNONS ECTOMYCORHIZIENS

Soutenue publiquement le 28 juin 1990 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury

M. J. BERTHELIN, Directeur de Recherche, C.N.R.S. Nancy

Mme G. DEFAGO, Professeur à l'Ecole Polytechnique Fédérale de Zurich

MM. A. HERBILLON, Professeur à l'Université de Nancy I P. LEMANCEAU, Chargé de Recherche, I.N.R.A. Dijon

F. LE TACON, Directeur de Recherche, I.N.R.A. Nancy

J.M. MEYER, Maître de Conférence, Université Louis Pasteur, Strasbourg

J.C. PARGNEY, Maître de Conférence, Université de Nancy I

AVANT PROPOS

Je tiens à remercier ici les différentes personnes qui ont participé à ce travail : Monsieur Jacques Berthelin, à l'origine de cette recherche ; Madame Bernadette Gerard pour les dosages de carbone, Monsieur Jean-Marie Portal pour les analyses en HPLC, Monsieur James Rouiller pour les analyses titrimétriques, Messieurs Jean-Pierre Boudot et Emmanuel Jeanroy pour leurs conseils en synthèse minéralogique, Monsieur Gilbert Belgy pour les dosages en ICP et ses compétences concernant les fermenteurs, Mmes Colette Lamy et Brigitte Vaillant pour leurs conseils, Monsieur Philippe de Donato pour les analyses de spectre I.R. à réflexion diffuse et Madame Evelyne Jeanroy.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
PREMIERE PARTIE: Nature, production, role et analyse des siderophores chez les microorganismes et dans les sols: Breve revue des	
CONNAISSANCES ACTUELLES	5
I NATURE, ROLE ET PRODUCTION DES SIDEROPHORES	5
A Composition chimique et fonction des sidérophores	5
1 Les hydroxamates	5
2 Les phénolates-catécholates	8
B Mécanismes d'action des sidérophores	8
II ANALYSE ET PRODUCTION DES SIDEROPHORES	11
A Déferrification préliminaire des dispositifs de culture	11
B Méthodes de dosages	12
1 Tests non spécifiques de détection des sidérophores	12
2 Tests plus spécifiques de certains types de sidérophores	12
2.1. Dosage des hydroxamates : méthode de Csaky	12
2.2. Dosage des catécholates : méthode d'Arnow	13
2.3. Dosage des phénolates : méthode d'Hathway 2.4. Dosage de certains hydroxamates par voie biologique	13
2.4. Dosuge ue vertuins nyuroxumutes pur vote ototogique	14
III SITUATION ACTUELLE ET INTERET DU SUJET PROPOSE	16

DEUXIEME PARTIE: ETUDE DES SIDEROPHORES ET DES MICROFLORES RHIZOSPHERIQUES ET NON RHIZOSPHERIQUES PRODUCTRICES DE SIDEROPHORES DANS DES	
SOLS ACIDES ET CALCIMAGNESIQUES	21
I Introduction	21
II LES MICROFLORES BACTERIENNES PRODUCTRICES DE SIDEROPHORES DANS ET HORS	
RHIZOSPHERE DE MERCURIALE DANS UN SOL BRUN COLLUVIAL ACIDE ET UN SOL CALCIMAGNESIQUE (RENDZINE)	22
CALCIMAGNESIQUE (REINDEINE)	<i>*</i> • •
A La plante et les sols	22
B Recherche et dénombrement des microflores bactériennes productrices de	
sidérophores	26
1 Méthodes spécifiques de dénombrements	26
2 Recherche et mesure de l'endomycorhization	27
3 Résultats et discussion	28
3.1. Les microflores bactériennes rhizosphériques et non	
rhizosphériques	28
3.2. Endomycorhization de la mercuriale	31
III RECHERCHE DES SIDEROPHORES DANS LES SOLS RHIZOSPHERIQUES ET NON	
RHIZOSPHERIQUES ASSOCIES A LA MERCURIALE PRELEVEE SUR LA RENDZINE ET SUR LE	
SOL BRUN COLLUVIAL ACIDE	32
A Méthodes d'extraction	32
1 Extraction des différentes fractions organiques du sol	32
2 Extraction et dosage des sidérophores	34
B Résultats	35
1 Carbone organique des sols et des extraits hydrosolubles,	
acidosolubles et alcalinosolubles	35
2 Sidérophores de type hydroxamates décelables par la méthode	
biologique dans les extraits hydrosolubles, acidosolubles et	
alcalinosolubles des sols. Résultats et discussion	36
3 Sidérophores de type hydroxamate décelable par la méthode	
biologique, après extraction organique dans les extraits aqueux, acides et	
alcalins des sols. Résultats et discussion	42
4,- Dosages d'autres types de sidérophores dans ces deux sols (rendzine et	
sol colluvial acide)	46
4.1. Phénolates-Catécholates	46
4.2. Mise en évidence de complexants à affinité élevée	10
pour le fer(méthode au chromazurol)	48
IV RELATIONS POSSIBLES ENTRE LES SIDEROPHORES ET LES MICROFLORES BACTERIENNES	
POTENTIELLEMENT PRODUCTRICES DE SIDEROPHORES DANS LA RENDZINE ET LE SOL	
COLLUVIAL ACIDE	49

V LES SIDEROPHORES DANS D'AUTRES SOLS ACIDES ET CALCIMAGNESIQUES	52
VI DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE	53
TROISIEME PARTIE : ALTERATION D'OXYHYDROXYDE DE FER (GOETHITE) ET DE SILICATE FERROMAGNESIEN (BIOTITE) PAR DES CHAMPIGNONS PRODUISANT DES SIDEROPHORES	59
I Introduction	59
II ALTERATION D'UN OXYHYDROXYDE DE FER (LA GOETHITE) PAR DES CHAMPIGNONS ECTOMYCORHIZIENS ET NON MYCORHIZIENS PRODUISANT DES SIDEROPHORES	59
A Matériel et méthodes	60
1 Le minéral : la goethite	60
2 Choix du champignon ectomycorhizien 2.1. Origine des souches étudiées 2.2. Influence de la carence en fer du milieu sur la croissance des champignons ectomycorhiziens 2.3. Production de sidérophores par les souches ectomycorhiziennes testées 2.4. Capacité des champignons ectomycorhiziens à solubiliser la goethite	60 62 62 64 64
2.5. Capacité des souches ectomycorhiziennes à croître sur un autre milieu de culture B Solubilisation-altération de la goethite par Ustilago sphaerogena et Boletus	65
suilus (FROI)	67
1 Protocole expérimental et analyses	67
2 Dissolution et bioaccumulation du fer de la goethite 2.1. Par Ustilago sphaerogena 2.2. Par Suillus granulatus	68 68 73
3 Utilisation des sucres, source de carbone et d'énergie	79
4 Production de diphénols par les champignons	82
5 Production de différents types de sidérophores 5.1. Hydroxamates décelables par la méthode de Csaky 5.2. Hydroxamates décelables par le test biologique utilisant la bactérie Arthrobacter flavescens JG9 5.3. Les phénolates et les catécholates 5.4. Remarques sur ces dosages de sidérophores	83 83 84 85 86
6 Evolution de l'acidité des milieux de culture	87
6.1. Titrage potentiométrique des différentes formes d'acidité 6.2. Recherche et dosage des acides aliphatiques (HPLC et dosages enzymatiques)	87 87 90
7 Altération microbienne par <i>Ustilago sphaerogena</i> de la goethite en fermenteurs, en conditions de pH contrôlé	93
8 Altération abiotique (chimique sensu stricto) de la goethite par des acides aliphatiques produits par les champignons	97

9 Evolution de la goethite au cours de l'altération microbienne	99
10 Discussion et conclusion	100
III ALTERATION D'UN SILICATE FERROMAGNESIEN (BIOTITE) ET D'UN SULFURE (PYRITE) PAR USTILAGO SPHAEROGENA ET SUILLUS GRANULATUS OU LEURS PRODUITS DE METABOLISME	106
A Altération d'une biotite par les champignons Ustilago sphaerogena et Boletus suilus	106
1 Protocole expérimental	106
2. Résultats	107
B Altération abiotique de la biotite et de la pyrite par des produits de métabolisme (acides et sidérophores)	111
1 Altération abiotique de la biotite	111
2 Altération abiotique de la pyrite	113
IV CONCLUSION DE LA TROISIEME PARTIE	114
Conclusions generales	119
BIBLIOGRAPHIE	

ANNEXES

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Le fer est, quantitativement, le quatrième élément minéral de la couche superficielle terrestre et de la biosphère qui s'y rattache. Mais c'est aussi un élément très peu soluble et donc peu ou pas disponible, présent sous forme d'oxyhydroxydes, de silicates, de carbonates. Les organismes du sol, plantes et microorganismes, doivent donc mettre en place des mécanismes de dissolution qui favorisent cette biodisponibilité. Les microorganismes sont bien connus maintenant pour leur production de composés acidifiants et/ou chélatants, qui pourront dissoudre les minéraux du sol (BERTHELIN, 1983, 1988; BERTHELIN et ROBERT, 1986), contribuant ainsi à assurer leurs besoins nutritifs. Dans des conditions de faible solubilité du fer, particulièrement en milieu neutre ou plus ou moins basique, les bactéries anaérobies facultatives ou anaérobies strictes peuvent réduire le fer des oxyhydroxydes insolubles (BERTHELIN, 1982, 1988). En conditions plus aérobies, les champignons, les algues et de nombreuses bactéries peuvent produire des chélates spécifiques du fer, les sidérophores, dont les constantes de stabilité sont de l'ordre de 10³⁰.

Cette production de sidérophores s'accroît très significativement en conditions de carence en fer soluble assimilable (NEILANDS, 1974; EMERY, 1978). Des champignons ectomycorrhiziens produisent de tels composés (SZANISLO *et al.*, 1981), que les plantes pourraient, semble-t-il, utiliser pour leur nutrition (POWELL *et al.*, 1982).

Différents travaux (PERRY et al., 1984; POWELL et al., 1980; WAID, 1975; REID et al., 1984) ont mis en évidence la présence de sidérophores dans des sols, mais sans jamais préciser leur répartition au sein des compartiments de la matière organique de ces sols, ni relier cette présence aux microorganismes rhizosphériques ou non rhizosphériques producteurs de sidérophores, en comparant des milieux plus ou moins contrastés (calcimagnésique et acide). Par ailleurs, le rôle de tels composés sur la mobilisation du fer de divers minéraux ferriques et ferreux n'a pas encore été abordée à ce jour.

Ces constatations conduisent donc à proposer une étude portant sur les deux points suivants :

- étude des sidérophores et des microflores rhizosphériques et non rhizosphériques productrices de sidérophores dans les sols acides et calcimagnésiques,
- altération d'oxyhydroxyde de fer (goethite) et de silicate ferromagnésien (biotite) par des champignons produisant des sidérophores,

qui seront présentés après une brève revue des connaissances actuelles.

PREMIERE PARTIE

NATURE, PRODUCTION, ROLE ET ANALYSE
DES SIDEROPHORES CHEZ LES MICROORGANISMES
ET DANS LES SOLS:
BREVE REVUE DES CONNAISSANCES ACTUELLES

NATURE, PRODUCTION, ROLE ET ANALYSE DES SIDEROPHORES CHEZ LES MICROORGANISMES ET DANS LES SOLS: BREVE REVUE DES CONNAISSANCES ACTUELLES

Avant de présenter les résultats des travaux que nous avons effectués au cours de ces dernières années, il est indispensable d'exposer, au moins brièvement, l'état des connaissances actuelles sur la nature, le rôle, la production et les méthodes d'analyse des sidérophores chez les microorganismes et dans les sols. Cette revue simplifiée permettra de préciser les objectifs de ce mémoire.

I.- NATURE, PRODUCTION ET ROLE DES SIDEROPHORES

NEILANDS (1952) observa le premier, chez un champignon unicellulaire, *Ustilago sphaerogena*, cultivé en conditions de carence en fer, la production d'un composé à très forte affinité pour le fer, formant des complexes solubles à constante de stabilité élevée de 10^{29} : le ferrichrome. Depuis cette découverte, la production de ce type de composé a été mise en évidence chez de nombreux microorganismes, et s'est accompagnée d'études biochimiques de leur nature et de leur rôle. Les champignons produisent principalement des composés possèdant des fonctions hydroxamates, alors que les bactéries synthétisent plutôt des composés à groupe fonctionnel de type catécholate.

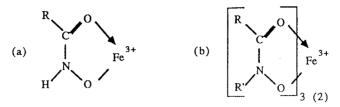
Plusieurs ouvrages donnent, à ce jour, de nombreux renseignements sur la composition chimique des sidérophores (EMERY, 1971, 1974; WAID, 1975; BYERS et ARCENEAUX, 1977; NEILANDS, 1973, 1981, 1984; LANKFORD, 1973; HIDER, 1984).

A.- COMPOSITION CHIMIQUE ET FONCTION DES SIDEROPHORES

1.- Les hydroxamates

Les acides hydroxamiques sont des composés organiques dont le groupement fonctionnel hydroxamate représente l'un des rares composés d'origine biologique à posséder une liaison N - O (azote-oxygène).

La structure des complexes de type hydroxamate ferrique est la suivante :



Elle forme ainsi un anneau très stable à 6 atomes. Trois ligands hydroxamates peuvent s'associer à un atome de Fe³⁺ pour former un chélate de type trihydroxamate (cf. b). Parmi les composés naturels, il existe aussi des mono- (cf. a.) et des dihydroxamates.

Parmi les monohydroxamates (cf. Figure I.1.), peuvent être cités les acides aspergilliques isolés de différentes souches d'*Aspergillus* et possédant une activité antibiotique, les cisfusarinines, produits par des *Fusarium*, et qui sont plus efficaces que les autres monohydroxamates, les hadacidines de *Penicillium* antitumoraux, mais pouvant inhiber la formation des chloroplastes, les acides hydroxamiques benzoxazines, qui interviendraient, semble-t-il, dans l'absorption du fer par les plantes.

Les sidérophores peuvent aussi être des dihydroxamates (cf. Figure I.1.), comme les mycobactines, isolés des mycobactéries et qui sont liposolubles, l'acide pulcherriminique, produit par des souches de *Candida pulcherrima* cultivé dans des milieux contenant du fer, la schizokinine de *Bacillus megaterium*, pouvant solubiliser et transporter le fer, l'aérobactine, d'*Aerobacter aerogenes*, contenant de l'acide citrique, les acides rhodotoruliques, synthétisés par différentes espèces de *Rhodotorula* et la pyoverdine produite par les *Pseudomonas fluorescens*.

Les trihydroxamates enfin, pour lesquels le fer trivalent est coordonné à 6 atomes d'oxygène de 3 hydroxamates (Figure I.1.), sont les plus stables grâce à "l'effet chélate" de la présence de trois fonctions hydroxamiques dans une même molécule, qui dispose ainsi d'une affinité pour le fer plus forte que celle fournie par la somme des trois fonctions chélatantes.

La partie commune de ces sidérophores de type trihydroxamate est constituée par un groupe hydroxylamine formé d'un acide aminé, l'ornithine le plus souvent, dans lequel un groupement N-hydroxyl remplace un groupement aminé. Ces sidérophores, sous forme de complexe ferrique, présentent un maximum d'absorption entre 425 et 440 nm pour des pH compris entre 2 et 7, et ont un poids moléculaire de 500 à 1200 daltons. Les trihydroxamates sont soit du type ferrichrome cyclique, ou du type ferrioxamine en chaîne (cf. Figure I.1.), produits par les bactéries, les actinomycètes et les champignons, et peuvent jouer le rôle de facteurs de croissance ou d'antibiotiques pour divers organismes.

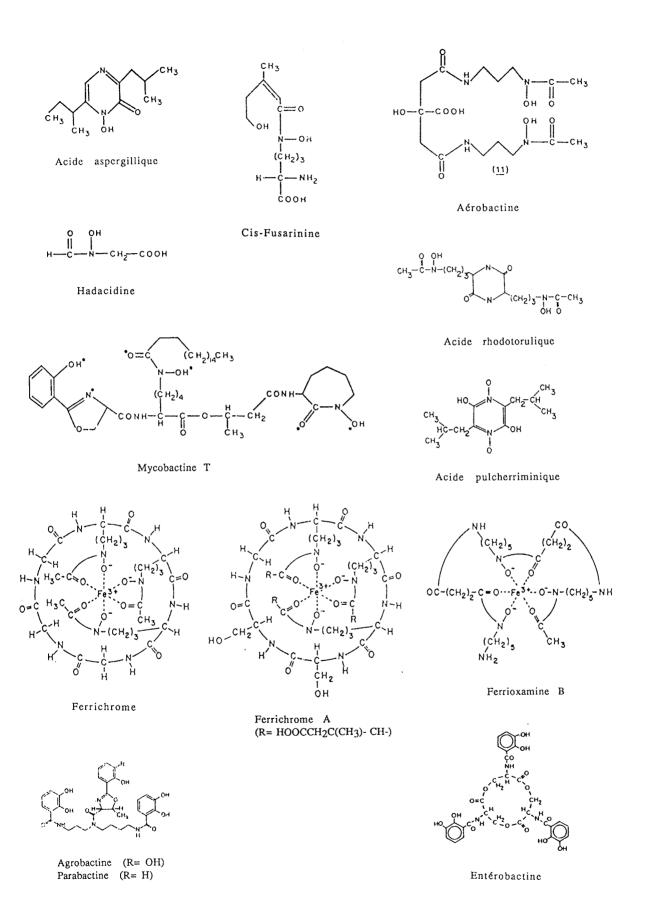


Figure I 1 : Formules chimiques de différents sidérophores

2.- Les phénolates-catécholates

Cette seconde catégorie de sidérophores est constituée d'acides aminés conjugués à l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque. On distingue essentiellement les phénolates produits par des champignons et les catécholates essentiellement d'origine bactérienne. L'entérobactine (cf. Figure I.1.) est un exemple de catéchol cyclique synthétisé par *Aerobacter aerogenes*, *Escherichia coli* et des espèces de *Salmonella*, et semble commune à toutes les entérobactéries. L'Agrobactine est un catécholate linéaire (Figure I.1.) synthétisé par *Agrobacterium tumefaciens*, ainsi que la parabactine isolée de *Paracoccus denitrificans*. La 2,3-dihydroxybenzolysine a été isolée d'une espèce fixatrice d'azote, *Azotobacter vinelandii*.

Les biosynthèses de tous ces composés ne sont pas présentées ici, mais peuvent être consultées dans les ouvrages précédemment cités.

B.- MECANISMES D'ACTION DES SIDEROPHORES

La principale propriété des sidérophores est de transporter le fer, mais pour que ce transport soit efficace, il faut aussi que le fer chélaté aux sidérophores puisse être disponible aux microorganismes producteurs. Les études effectuées ont montré qu'un microorganisme pouvait utiliser les sidérophores produits par un autre microorganisme, et que plusieurs sidérophores pouvaient être transportés indépendamment chez un seul microorganisme.

Le processus général d'action des sidérophores consiste dans l'excrétion dans le milieu de l'agent chélatant et la réabsorption dans les cellules du complexe, grâce à des protéines membranaires de transport spécifiques (Figure I.2.). Ensuite, soit le ligand est hydrolysé par une estérase pendant la libération du fer, comme dans le cas de l'entérobactine, soit le fer est réduit et le ligand peut être réutilisé, comme dans le cas des hydroxamates (COOPER et al., 1978). Dans certains cas, le chélate peut ne pas être réabsorbé dans les cellules et être débarrassé de son fer à la surface ou dans la membrane cellulaire : c'est le cas du ferrichrome A d'*Ustilago sphaerogena*.

L'exemple des ferrichromes produits par *Ustilago sphaerogena* va permettre de mieux visualiser le processus de transport du fer par les sidérophores (Figure I.2.). De nombreux travaux, particulièrement ceux d'EMERY (1971, 1978) ont mis en évidence qu'en conditions de carence en fer soluble, *Ustilago sphaerogena* produit deux sidérophores, le desferriferrichrome et le desferriferrichrome A (Figure I.1.), ce dernier devenant majoritaire dès le deuxième jour d'incubation du champignon.

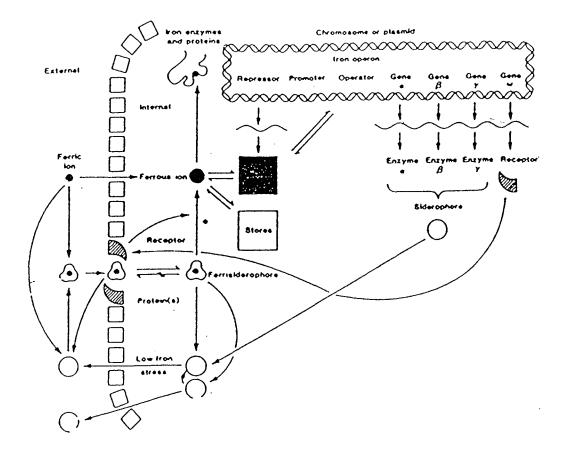


Figure I.2.- Modèle schématique du transport du fer à faible et forte affinité (d'après NEILANDS, 1984).

La synthèse protéique cellulaire diminue et les stocks d'acides aminés sont utilisés pour la synthèse des desferriferrichromes, qui sont la partie organique des ferrichromes (ECKER et al., 1982). Les ferrichromes extracellulaires chélatent alors spontanément le fer^{III}. Par un système de transport membranaire spécifique, le ferrichrome sera concentré à l'intérieur des cellules, Fe³⁺ sera séparé du chélate par réduction enzymatique en Fe²⁺, qui, n'ayant pas d'affinité pour le ferrichrome, pourra être utilisé dans les différentes voies métaboliques. Le ferrichrome déferrifié est alors excrété à nouveau en vue d'un autre transport de fer^{III}. En revanche, le ferrichrome A n'est pas absorbé par les cellules (EMERY, 1971b), le fer étant probablement libéré par réduction à la surface cellulaire et absorbé sur des sites spécifiques, ce qui conduit à une distribution rapide du fer dans les cellules (ECKER et al., 1982). Le desferriferrichrome A peut alors, à son tour, réeffectuer une navette. Les résultats ont été obtenus (Emery, 1971a) à partir d'expériences de marquage radioactif du ferrichrome A et sont résumés par la figure I.3.

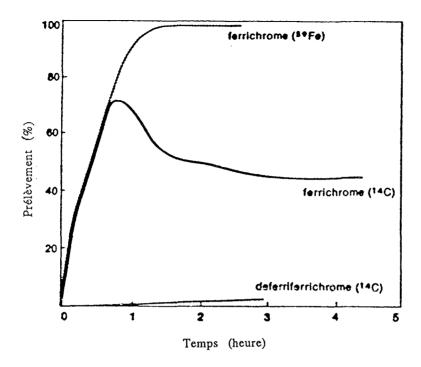


Figure I.3.- Absorption de ferrichrome marqué par Ustilago sphaerogena d'après Emery (1971a).

Cette figure montre bien l'absorption du ferrichrome ferrifié dans un premier temps, puis l'excrétion du sidérophore déferrifié dans un second temps, le desferriferrichrome n'étant pas absorbé.

Quand Fe³⁺ est chélaté au ferrichrome, chaque groupement hydroxamate perd un proton, donnant ainsi une neutralité électrique au chélate ferrifié, lui permettant de mieux traverser la membrane cellulaire. De plus, lors de la chélation, la molécule change de forme, adoptant une conformation plus régulière et globulaire, la cellule pouvant alors distinguer le ferrichrome ferrifié du ligand (EMERY, 1967).

Les concentrations cellulaires de ferrichromes sont fonction de la concentration en fer dans le milieu, et le mécanisme de régulation par lequel le fer réprime la biosynthèse des ferrichromes ne semble pas jouer au niveau des acides aminés (ECKER *et al.*, 1982).

Après ces exemples, qui ont permis de mieux définir la nature chimique ainsi que les mécanismes de fonctionnement des sidérophores, même si tous les aspects n'ont pas été abordés, il semble important de considérer en particulier les méthodes d'analyses de ces composés.

II.- ANALYSE ET PRODUCTION DES SIDEROPHORES

Le but n'est pas ici d'être exhaustif, mais de présenter les différentes méthodes de détection et de dosages des sidérophores, utilisées au cours de ce travail.

Etant donné la nature chimique très différente des sidérophores, les méthodes de dosages, chimiques ou biologiques, seront nombreuses et plus ou moins spécifiques. Comme leur production dépend des teneurs en fer soluble biodisponible, il est nécessaire d'effectuer les cultures de microorganismes en éliminant au maximum les traces de fer des milieux et des dispositifs, comme nous le précisons ci-dessous.

A.- DEFERRISATION PRELIMINAIRE DES DISPOSITIFS DE CULTURE

Afin d'éliminer au maximum les traces de fer, la verrerie utilisée dans les différentes expériences sera rincée à l'acide chlorhydrique 6N et à l'eau distillée.

Dans la mesure du possible, des produits très purs renfermant le moins de fer possible, seront utilisés pour préparer les milieux de culture. Pour une carence meilleure, ces milieux pourraient être préalablement traités sur résines de type chelex 100, mais qui élimineraient aussi d'autres ions. Une extraction à la 8-hydroxyquinoléine à 3 % dans le chloroforme, chélate à forte affinité pour les cations (K = 10³⁸) airait pu être effectuée, mais cette extraction risquait aussi d'éliminer d'autres métaux et oligoéléments que le fer, et modifierait ainsi la composition initiale du milieu, ce qui nuierait à la croissance des microorganismes. La source de carbone peut aussi influer sur la production de sidérophores ; ainsi, le remplacement du glucose par du succinate, qui ne peut être métabolisé que par une enzyme contenant du fer, entraînera chez *Aerobacter aerogenes* une carence plus forte en fer et une production d'aérobactine plus importante (NEILANDS, 1984).

Les inoculums fongiques utilisés dans les expériences seront obtenus à partir de précultures en milieu carencé en fer, afin de limiter le taux de fer par cellule. Néanmoins, les repiquages des souches seront effectués périodiquement sur milieu non carencé, afin d'éviter une mutation du microorganisme. Par ailleurs, il y a lieu de souligner qu'une conservation de souche trop continue sur milieu carencé peut modifier la nature des sidérophores produits (FEKETE et al., 1982).

B.- METHODES DE DOSAGES

1.- Tests non spécifiques de détection des sidérophores

Deux tests purement qualitatifs permettent de déterminer rapidement la présence de sidérophores dans des milieux de culture sans que cela ne nécessite un quelconque prétraitement. Ces tests sont basés sur l'addition de fer en milieu acide qui, en présence de sidérophores, entraîne une coloration spécifique rougêatre (rouille) du complexe sidérophore-fer.

Le premier test au FeCl₃ consiste à additionner quelques gouttes de FeCl₃ (0,1M) en milieu acide (HCl 0,1N) et à mesurer l'absorption due à la formation du complexe à une longueur d'onde de 425 nm. Le second test au Fe(ClO₄)₃ consiste à additionner quelques gouttes de Fe(ClO₄)₃ en milieu acide (HCl 0,1M) et à mesurer l'absorption à une longueur d'onde de 425 nm. PAYNE *et al.* (1983) utilisent ce test pour établir un screening de souches produisant des hydroxamates et déterminent la formation d'un complexe pourpre à pH 1, dont l'absorption maximale se situe à 485 nm (ATKIN *et al.*, 1970).

Le standard utilisé comme étalon dans ces deux tests est le desféral, deferoxamine méthane sulfonate, qui est un trihydroxamate de synthèse.

Les deux tests sont à utiliser simultanément en cas d'interférences avec certains composés du milieu.

Un troisième essai universel est le test au chromazurol S décrit par SCHWYN et NEILANDS (1987), et qui est basé sur l'affinité des sidérophores pour le fer. Le complexe ternaire chromazurol-fer-HDTMA (hexadecyltrimethylammonium bromide) sert d'indicateur coloré en passant du bleu à l'orange en présence d'un chélate plus fort, qui le débarrassera de son fer. Cette méthode est applicable à la fois en milieu liquide et en milieu solide sur boîte de Pétri, ce qui permet une visualisation très rapide de microorganismes producteurs de sidérophores, un halo de décoloration apparaissant autour de ces colonies.

2.- Tests plus spécifiques de certains types de sidérophores

Les méthodes de dosage sont de deux ordres : chimique, essentiellement spectrophotométrique, et biologique.

2.1. Dosage des hydroxamates : test de Csaky (1948)

Le test s'applique aux sidérophores possèdant une ou plusieurs fonctions hydroxamates, et dérive du test de Blom (CSAKY, 1948). Ce test quantifie les hydroxylamines libres, ou

liées chimiquement, dans des matériaux biologiques. Les hydroxylamines sont oxydées en "nitrites" en présence d'acide acétique et d'iodine ; les nitrites réagissent ensuite avec de l'acide sulfanilique et de l'alpha-naphtylamine, et sont alors dosés colorimétriquement, le thiosulfate détruisant les excès d'iodine. Dans le cas des hydroxylamines liées à des matériaux biologiques, une hydrolyse acide à chaud (H₂SO₄ 3N, 120°C, 6 heures) est opérée préalablement, puis après neutralisation à l'acétate de sodium à 35 %, la réaction précédemment décrite peut être effectuée. Le standard utilisé est de l'hydroxylamine ou de l'acétate de sodium.

Les travaux de CSAKY (1948) montrent que seuls quatre composés peuvent donner une réaction colorée : les acides nitrite, hyponitreux, nitrohydroxamiques et les hydroxylamines, mais que seules les hydroxylamines restent stables lors de l'hydrolyse acide. Les trois premiers composés peuvent néanmoins détruire complètement ou partiellement, selon leur concentration, les hydroxylamines présentes, ce qui réduit donc la validité de l'acidolyse aux échantillons dénués de composés azotés oxydés. Les résultats obtenus par ce test seront donc à prendre par défaut, mais seules les hydroxylamines donneront un test positif.

Le protocole est le suivant : 0.5 ml de H_2SO_4 3N sont ajoutés à 0.5 ml d'échantillon à doser. Une hydrolyse à $120\,^{\circ}$ C est effectuée pendant 30 mn avant de neutraliser le milieu avec 0.75 ml d'acétate de sodium à 35 %. Le standard utilisé est de l'hydrochlorure d'hydroxylamine, de formule NH_2OH HCl. Les lectures se font à 526 nm. Ce test sera principalement utilisé de façon qualitative et les résultats seront exprimés en terme de présence ou d'absence d'hydroxamates. EMERY (1983) indique une méthode pour différencier les trihydroxamates des monohydroxamates, basée sur leur réaction avec les cyanides.

2.2. Dosage des catécholates : test d'ARNOW (1937)

Les catécholates possèdent la fonction suivante

Le test d'ARNOW (1937) tire son origine d'un dosage enzymatique de la 3,4-dihydroxyphényl-alanine-tyrosine intervenant dans la formation de la mélanine, et se base sur la variation de couleur du complexe formé. L'échantillon à traiter mis en présence d'un réactif de nitrite de sodium-molybdate de sodium en milieu acide se colore en jaune, puis en rouge, à la suite d'une élévation du pH. Le molybdate de sodium empêche une décomposition rapide de l'acide nitrique, qui se produit en présence de NaNO₃, et l'acide chlorhydrique empêche le virage au rouge d'un éventuel précipité de mélanine, qui se produit dans le cas de solutions neutres ou basiques.

Le protocole est donc le suivant : à 1 ml de surnageant sont ajoutés 1 ml d'HCl 5N et 1 ml de réactif au nitrite-molybdate (10 g de nitrite de sodium, 10 g de molybdate de sodium pour 100 ml d'eau). Enfin, 1 ml de NaOH 1N et 1 ml d'eau sont ajoutés. Le standard utilisé est le catéchol. Les absorptions maximales de ces composés sont mesurées entre 500 et 525nm.

Par ailleurs, RIOUX *et al.* (1983) comparent au test d'ARNOW, une autre méthode colorimétrique d'analyse des catéchols, qui, en conditions acides, peuvent réduire une source de Fe^{III} (citrate ferrique ammoniacal) en Fe^{II}, qui est dosé par de la 1-10 phénantroline. Cette réaction est stoéchiométrique et le catéchol se transforme en O-benzoquinone de façon irréversible selon

Ce test est plus sensible que le test d'Arnow pour lequel le pH et le temps de nitratation ont une influence sur l'absorption. De plus, il peut s'appliquer aux catéchols substitués en 3 et 4, qui ne répondent pas à la nitratation.

Dans les études qui vont suivre, seul le test d'ARNOW sera effectué.

2.3. Dosage des phénolates : test d'Hathway (1969)

Ce test s'adresse aux composés de type et est basé sur la coloration de ces chélates à l'état complexé avec le fer.

Le protocole de cette réaction est le suivant : à 1 ml d'échantillon est ajouté 1 ml de réactif d'HATHWAY constitué de 1 ml de FeCl₃ 0,1M dans HCl 0,1N mélangé à 1 ml de ferricyanide de potassium 0,1M dilué à 100 ml dans de l'eau distillée.

Les acides dihydroxybenzoïques peuvent aussi être détectés dans les échantillons par observation de leurs spectres, les acides dihydroxamiques absorbant spécifiquement à 318 nm.

2.4. Dosage de certains hydroxamates par voie biologique

Les méthodes de dosage biologique des sidérophores sont basées sur la croissance de bactéries mutantes auxotrophes à ces composés. La croissance bactérienne proportionnelle à la quantité de sidérophores présente dans le milieu est mesurée, soit en milieu liquide, par mesure de la densité optique des cultures bactériennes, soit en milieu solide, par mesure du halo de croissance de la bactérie autour du point de dépôt de sidérophores.

Il existe plusieurs bactéries auxotrophes à différents sidérophores ; celle que nous utilisons dans ce travail est la bactérie *Arthrobacter flavescens* JG9 ATCC 25091 auxotrophe à certains hydroxamates.

Une préculture d'*Arthrobacter flavescens* JG9, de 24 heures, est inoculée dans la masse à un milieu nutritif de composition suivante : 10 g d'extrait de levure, 10 g de peptone, 2 g de K₂HPO₄ et 15 g d'agar noble pour un litre d'eau distillée. Des disques de papier filtre de 5 mm de diamètre sont imprégnés des échantillons à tester et déposés à la surface des milieux gélosés solidifiés. La lecture des halos de croissance autour des disques de papier filtre se fait après 24 ou 48 heures de culture. Une gamme étalon est effectuée en imprégnant des disques de différentes quantités de desféral. La réponse de la bactérie à ces concentrations est logarithmique.

Cette méthode est sensible, puisque des quantités de l'ordre du nanogramme/ml sont détectables, mais reste néanmoins limitée, la bactérie n'étant pas hétérotrophe à tous les hydroxamates. Par exemple, elle réagira au ferrichrome, mais non au ferrichrome A, tous deux étant des trihydroxamates produits par *Ustilago sphaerogena*. Toutefois, *Arthrobacter flavescens* JG9 réagira à la plupart des hydroxamates d'origine fongique, et ce test sera surtout utilisé pour doser les hydroxamates dans des extraits de sols. Le tableau I.1. (LANKFORD, 1973) indique les substances auxquelles est sensible *Arthrobacter flavescens* JG9. BOSSIER et VERSTRAETE (1986) montrent que la croissance bactérienne d'*Arthrobacter flavescens* dépend de la concentration en sidérophores et de la biodisponibilité du fer, reliée elle-même à la solubilité des sidérophores ferrifiés.

Tableau I.1.- Substances sensibles pour la croissance d'Arthrobacter flavescens JG9 (d'après LANKFORD, 1973).

Substances	Concentrations (mg/ml) requises pour une demi-croissance maximale
Ferrichrome	0,0003
Coprogène	0,007
Mycobactine	0,008
Ferrioxamine B	0,0005
Ferrirubine	0,02
Acide rhodotorulique	0,0002
Schizokinine	0,05
Acide aspergillique	0,7
Hémoglobine	0,2
Protohemine IX	0,08
Coprohemine III	0,1
Nocardamine	10
Albomycine	3,0

D'autres tests biologiques utilisent par exemple *S. typhimurium* enb 7, sensible aux hydroxamates et phénolates (LUCKEY *et al.*, 1972), ou *E. coli* (POWELL *et al.*, 1983).

Les méthodes citées ici ne sont donc que celles qui ont été utilisées dans ce travail. Toutes les méthodes de purification - colonnes échanges d'anions type chelex D (VAN DER HELM *et al.*, 1980) - extraction à l'acétate d'éthyl préliminaire au dosage des catécholates (REEVES *et al.*, 1983), ou de séparation par chromatographie (sur silica gels, VAN DER HELM *et al.*, 1980) ou sur papier (FEKETE *et al.*, 1982), ou sur résines (FREDERICK *et al.*, 1981) ne sont pas présentées ici en détails.

Les sidérophores étant des composés de nature chimique différente, ont presque chacun une méthodologie spécifique de production, d'extraction et de purification, reportée dans les publications concernées, et dont il n'y a pas lieu de faire ici l'inventaire.

Les méthodes citées ici sont des méthodes générales de détection des sidérophores qui devront nécessairement être complétées par une analyse plus poussée en vue d'une détermination précise des composés.

Certaines méthodes d'extraction de sidérophores, que nous avons mises au point pour effectuer des extraits de sols, seront décrites dans la deuxième partie.

III.- SITUATION ACTUELLE ET INTERET DU SUJET PROPOSE

Les sidérophores sont, à ce jour, essentiellement étudiés sous deux aspects : un premier aspect biochimique, visant à caractériser les sidérophores produits par les microorganismes ainsi que leurs voies de biosynthèse, et un second aspect, visant à utiliser les sidérophores en tant que facteur de croissance ou, au contraire, en tant qu'inhibiteur, dans le but soit de stimuler soit d'inhiber certaines populations de microorganismes pouvant avoir un effet positif (rhizobactéries favorisant la croissance des plantes, PGPR) ou négatif (microorganismes pathogènes) sur la croissance des plantes. Nous nous sommes intéressés à deux aspects complémentaires, liés à la mobilisation du fer dans les sols.

Comme le fer est peu biodisponible et que sa solubilité dépend du pH et du Eh des milieux, on constate, dans les sols carbonatés, des carences en fer pour de nombreuses plantes. Ces carences sont liées à la diffusion du fer dans les sols, qui dépend de sa solubilité et de l'activité du Fe^{III}, qui est divisée par 1000 à chaque augmentation du pH d'une unité (LINDSAY, 1979). En revanche, le fer forme des chélates stables avec de nombreux ligands synthétiques ou naturels (CLINE *et al.*, 1982 ; LINDSAY, 1979), entraînant ainsi une solubilité et une diffusion nettement plus importantes (Tableau I.2.).

Tableau I.2.- Constante de stabilité de complexes ferriques de certains acides hydroxamiques et d'autres substances chélatantes, déterminées à 20°C (d'après WAID, 1975).

Agent chélatant	Log10 de la constante de stabilité (logK)
Acetohydroxamate	28,3
Desferriferrichrome	29,1
Desferriferrioxamine B	30,5
Desferriferrioxamine D1	30,8
Desferriferrioxamine E	32,4
DIMBOA	21,3
Acide rhodotorulique	31,2
Enterobactine	52
Aerobactine	22,9
Acide citrique	11,9
Acide oxalique	10,0
EDTA ^(*)	25,1
Tetracycline	25,0
8 Hydroxyquinoline	36,0

(*) Ethylène diamine tétraacétique

C'est pourquoi l'étude proposée concerne en premier lieu l'écologie de la production de sidérophores en sol acide, où le fer est relativement plus biodisponible, et en sol neutre ou légèrement basique, où il est peu ou pas biodisponible.

Simultanément à cette étude d'écologie chimique des sidérophores, la détermination de la microflore potentiellement responsable de cette production de sidérophores a été conduite dans ces mêmes échantillons de sol. Ensuite, afin de vérifier l'efficacité de ces composés sur la mobilisation du fer à partir de minéraux du sol, des études de solubilisation d'oxyhydroxide cristallisé sous l'influence de microorganismes symbiotiques, tels que les champignons ectomycorhiziens, ont été menées dans des dispositifs expérimentaux au laboratoire.

Cette étude de la mobilisation du fer par les microorganismes rhizosphériques symbiotiques, comme les champignons ectomycorhiziens et les rhizobactéries doit contribuer à la compréhension du fonctionnement des système "sol-microorganismes-plantes". Par ailleurs, elle peut trouver des applications très importantes d'une part dans la nutrition des plantes, productrices ou non de phytosidérophores (MARSCHNER *et al.*, 1989) et, d'autre part, dans l'installation de microflores stimulant la croissance des plantes, et/ou antagonistes de microorganismes pathogènes.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DES SIDEROPHORES ET DES MICROFLORES RHIZOSPHERIQUES ET NON RHIZOSPHERIQUES PRODUCTRICES DE SIDEROPHORES DANS DES SOLS ACIDES ET CALCIMAGNESIQUES

ETUDE DES SIDEROPHORES ET DES MICROFLORES RHIZOSPHERIQUES ET NON RHIZOSPHERIQUES PRODUCTRICES DE SIDEROPHORES DANS DES SOLS ACIDES ET CALCIMAGNESIQUES

I.- INTRODUCTION

La recherche de sidérophores et des microflores responsables de leur production dans les sols a été conduite principalement dans des sites contrastés, acide et calcimagnésique, qui permettent la croissance de plantes bimodales comme la mercuriale (*Mercurialis perennis*). Cette capacité de développement (croissance) dans des milieux où la biodisponibilité des éléments minéraux nutritifs, et en particulier du fer, est très différente, suggère des stratégies de mobilisation de ces éléments par la plante et/ou les microflores rhizosphériques du sol qui lui sont associées, qui sont adaptées au milieu. Une production de substances complexantes du fer pouvant être plus importante en milieu carbonaté qu'en milieu acide.

Cette recherche des sidérophores a été effectuée dans le sol rhizosphérique (adhérant aux racines) et dans le sol non rhizosphérique, dans les fractions hydrosolubles, acidosolubles et alcalinosolubles, qui correspondent aux différents compartiments des matières organiques des sols.

Ces mêmes échantillons de sol ont aussi été utilisés pour étudier les microflores totales et les microflores productrices de sidérophores en utilisant les méthodes décrites ci-dessous.

Ces travaux ont été complétés par des études similaires, quoique moins détaillées, toujours en milieu acide et carbonaté, mais en association avec d'autres plantes comme les pins (*Pinus sylvestris, Pinus nigra*).

II.- LES MICROFLORES BACTERIENNES PRODUCTRICES DE SIDEROPHORES DANS ET HORS RHIZOSPHERE DE MERCURIALE DANS UN SOL BRUN COLLUVIAL ACIDE ET UN SOL CALCIMAGNESIQUE (RENDZINE)

A.- LA PLANTE ET LES SOLS

La mercuriale (*Mercurialis perennis*), euphorbiacée au système racinaire rampant et fasciculé, a été choisie car elle est présente à l'état naturel sur deux sites pédologiquement différents de la région lorraine : un sol brun acide colluvial récent des Vosges (route du Lac de Longemer) et une rendzine forestière calcimagnésique neutre de la forêt de Haye (site de la Crédence, Meurthe-et-Moselle).

Les caractéristiques détaillées de ces sols, d'après GURY (Livret-Guide, excursion pédologique) et BRISON (1978) sont présentées figures II.1. et II.2., respectivement pour le sol colluvial acide et la rendzine.

Il faut souligner que ces sols, dont les pH et les taux de fer libre sont très différents - respectivement 5,1 et 7,4 et 6 ‰ et 3 ‰ - pour les horizons de surface du sol colluvial acide et de la rendzine, ont des comportements très différents en ce qui concerne la dynamique du fer. En effet, le fer sera plus mobile en milieu acide qu'en milieu carbonaté.

Les prélèvements de sol ont été effectués le 17 mai 1989 pour le sol carbonaté et le 22 mai 1989 pour le sol acide. Les mercuriales ont été prélevées au stade préfloraison, même si les différences climatiques des deux sites impliquent une légère avance dans le cycle végétatif pour les plantes de la rendzine. Le temps était sec et ensoleillé pour les deux campagnes de prélèvement.

Dans les deux cas, les prélèvements ont été effectués en milieu de pente, afin, d'une part, de respecter le facteur "rajeunissement par colluvionnement" et, d'autre part, de minimiser le facteur "enrichissement de bas de pente". Ces prélèvements sont au nombre de six pour chaque site, trois rhizosphériques et trois non rhizosphériques. Les échantillons rhizosphériques correspondent aux fractions de sol attachées aux racines de mercuriale, alors que les échantillons de sol non rhizosphériques sont ceux pour lesquels, dans le même site, aucun plant de mercuriale n'était présent. Tous les prélèvements se situent dans l'horizon de surface (0-15 cm). Les teneurs en carbone et en azote, les pH et les pourcentages d'humidité sont présentés dans le Tableau II.1.

Tableau II.1.- Pourcentages de carbone total et d'azote, pH et taux d'humidité des différents échantillons de sol.

		Indice des échant.	C %	N %	C/N	pH _{H2O}	% humidité
RENDZINE	Sol rhizosphérique	A B C	7,12 7,38 7,05	0,45 0,54 0,48	15,8 13,6 14,6	7,2 7,1 7,3	61,8 65,6 64,1
	Sol non rhizosphérique	D E F	8,13 10,10 9,14	0,58 0,71 0,62	14,0 14,2 14,7	7,3 7,4 7,4	63,7 64,4 63,6
SOL ACIDE	Sol rhizosphérique	III II	6,43 4,98 6,14	0,48 0,32 0,39	13,4 15,5 15,7	5,3 5,3 5,2	69,6 79,2 80,0
	Sol non rhizosphérique	IV V VI	4,62 11,83 12,01	0,31 0,77 0,77	14,9 15,4 15,6	5,3 4,5 4,5	69,1 60,3 60,3

- Le carbone total (C) et l'azote ont été dosés au TCM (Total Carbon Monitor Carlo Erba).
- Le pH-eau a été mesuré sur une suspension de 10 g de sol, 0-2 mm, et 20 ml d'eau distillée après une heure d'agitation.

Les différents prélèvements, pour un même type d'échantillon, ont des caractéristiques chimiques très voisines, sauf quelques échantillons dont les comportements seront discutés ultérieurement.

- les échantillons non rhizosphériques E et F de la rendzine ont une teneur en carbone et un pH plus élevés que les autres échantillons de ce même sol. Ceci souligne une immobilisation plus importante de la matière organique et une influence plus marquée du milieu carbonaté.
- les échantillons V et VI du sol colluvial acide ont une teneur en carbone importante, alors qu'elle est faible pour les échantillons II et IV. L'échantillon IV sera considéré séparément, car il présente des caractéristiques différentes des deux autres échantillons non rhizosphériques. Le prélèvement a été effectué au voisinage d'un sapin, en aval d'une petite butte, dont l'origine n'a pas été déterminée, mais qui peut favoriser l'accumulation de matériaux, donnant ainsi lieu à la formation d'un horizon nettement plus épais que celui des autres prélèvements.
- les rapports C/N sont semblables à ceux des analyses des profils de sol pour la rendzine (Figure II.2.), mais correspondent plutôt à ceux des horizons inférieurs pour le sol colluvial acide (Figure II.1.). Cette différence s'explique par la difficulté à effectuer les prélèvements dans ce sol à granulométrie grossière, ce qui a imposé un prélèvement plus profond, afin de recueillir suffisamment de sol.

SOL COLLUVIAL

I.G.N. 1/25 000 - Gérardmer 5-6 - Route du Lac de Longemer - Altitude 740 m.

TOPOGRAPHIE:

Bas de pente très forte. Exposition Sud.

ROCHE-MERE:

Colluvium granitique récent, aéré, reposant sur un matériau morainique

très tassé.

VEGETATION:

Sapinière + Epicéas. Mercurialis perrenis, Asperula odorata, Festuca sylvatica,

Paris quadrifolia, Deschampsia flexuosa.

PROFIL

 A_1 (0-1 cm):

Mull actif, noir, très humifère. Structure grumeleuse, grossière.

Quelques éléments d'arène. Cailloux et blocs nombreux. Très aéré.

Racines très nombreuses. Transition progressive.

 A_1C (10-50 cm):

Brun noir, encore très riche en humus, agglomérant des éléments d'arène en

grumeaux et remplissant les intervalles des gros gragments de roche-mère.

Transition progressive.

C (> 50 cm):

Colluvium granitique. Gros blocs noyés dans une arène.

ANALYSES DE CARACTERISATION

Prof.	Hor.	Granulométrie						C% N%	C/N pH	Al ³⁺ %•	Bases échangeables me/100g			100S/T			
		S.G.	S.F.	L.G.	L.F.	A.	C A	14 /4	ON	pri	M- 700	Ca	Mg	K	s	T	1003/1
0-10	A	55,0	4,9	9,0	4,0	14,0	5,9	0,302	19,7	5,1	0,14	3,75	0,74	0,92	5,41	28,3	19,1
10-50	AC	54,0	9,4	11,1	4,3	16,5	4,8	0,280	16,5	4,8	0,28	1,90	0,66	0,27	2,83	14,2	19,95
> 50	С	60,0	10,1	9,2	5,1	11,8	1,5	0,102	14,7	4,8	0,23	0,87	0,33	0,08	1,28	7,6	16,8

Pref.	Hor.	Elé	Elém. libres %.				
		Fe	Al	Si			
′0-10	A ₁	6,0	3,4	2,0			
10-50	A_1C	7,8	3,3	2,5			
> 50	C	8,4	3,8	1,8			

COMMENTAIRES

- Sol situé en bas de pente, constamment remanié, rajeuni par le colluvionnement et enrichi en bases par lessivage oblique.
- Mull très actif et très aéré.
- Présence d'une flore exigeante en tous éléments (Mercuriale) sur un sol cependant très acide.
- Très bon sol forestier.

Figure II.1.- Description du sol colluvial.

RENDZINE FORESTIERE DE LA CREDENCE (d'après Brison, 1978)

Ligustrum vulgare, Cornus **VEGETATION ET TYPE D'HUMUS:** Hêtraie-chênaie à charme. sanguina, Viburnum lantana. Humus de type calcaire (effervescence dès la surface).

Profil

A ₁ (0-20 cm)	Horizon humifère de couleur brun foncé (10 YR 2/2). Structure polyédrique très
	fine. Texture limono-sablo-argileuse avec nombreux petits cailloux calcaires de
	5 mm. Limite peu nette avec l'horizon A ₁ C. Très nombreuses racines fines.
A ₁ C (20-40 cm)	Rouge jaunâtre à l'état humide (5 YR 4/6). Structure polyédrique fine. Texture
	sablo-limoneuse avec très nombreux petits cailloux calcaires.
	Limite peu nette avec l'horizon C. Nombreuses racines fines.
C (40-80 cm)	Roche-mère de couleur brun très pâle (10 YR 8/4) constituée de cailloux calcaires
	de l'ordre de 5 mm, enrobés d'une partie fine blanchâtre. Présence de bandes très
	blanches de pseudomycélium (calcaire précipité). Quelques racines noires.

ANALYSES DE CARACTERISATION

			nulomé ès décar								Bases éc	hangeabl	es me/100)g		Ses	q. libre	:s%•
Hor.	Prof.	LG.	L.F.	A.	M.O%	С%	N %	C/N	pН	Ca	Mg	ĸ	S	T	100S/T	Fe	Al	Si
	0-10	13,3	24,1	26,2	15,0	7,5	0,52	15	7,A	37	0,80	0,59	38,4	45,5	86	3,0	2,4	0,6
A	10-20	11,3	21,6	24,0	5,4	2,7	0,25	11	8,1	45	0,74	0,45	46,2	21,1	sat.	2,7	2,2	0,6
AC	20-40	5,9	14,0	10,0	0,9	0,44	0,04	11	8,6	34	0,22	0,15	34,4	7,4	sat	1,6	0,8	0,5
С	40-80	2,4	11,5	7,1	0,8	0,38	0,02	. 22	8,9	31	0,25	0,12	31,4	4,2	sat.	1,0	0,4	0,3

COMMENTAIRES

- Forte teneur en argile dans les horizons de surface, faible en profondeur.
- pH élevé dès la surface, très élevé en profondeur.
 Horizon profond constitué à 80 % de matériau calcaire (25 % en surface).

Figure II.2.- Description de la rendzine.

Les dénombrements des microorganismes et les extractions des sidérophores sont effectués sur la fraction de sol tamisé à 2 mm.

B. RECHERCHE ET DENOMBREMENT DES MICROFLORES BACTERIENNES PRODUCTRICES DE SIDEROPHORES

1.- Méthodes spécifiques de dénombrements

Les dénombrements ont été effectués par la méthode des suspensions-dilutions (POCHON et TARDIEUX, 1962). Après dilution, les suspensions de sol sont utilisées pour ensemencer divers milieux de culture, qui permettront de dénombrer les microflores totales et les microflores productrices de sidérophores.

- Le milieu "Agar nutritif" (Nutrient Agar, Difco) est utilisé pour dénombrer la microflore bactérienne totale.
- Le milieu King B (Bio-Polytone 20 g/L, phosphate bipotassique 1,5 g/L, sulfate de magnésium 1,5 g/L, gélose 14 g/L, Bio-Mérieux) est utilisé en mélangeant 37 g de poudre à 10 ml de glycérine dans un litre d'eau distillée et permet de dénombrer les Pseudomonas fluorescents, producteurs connus de sidérophores. Les *Pseudomonas fluorescens* sont des bactéries très étudiées car ce sont des PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) douées d'une forte capacité à coloniser les racines (SCHROTH et HANCOCK, 1982). Elles peuvent permettre aussi l'amélioration de la colonisation fongique en changeant entre autre la plasticité de la membrane cellulaire, l'exudation et la concentration de régulateurs de croissance (MEYER et al., 1986). C'est une espèce ubiquiste et qui, grâce à sa rapidité de croissance, peut devenir prédominante sous certaines conditions : pH proche de la neutralité, matière organique en solution, bonne oxygénation, absence de facteurs de croissance (BERGEY, 1984). Leur rôle de PGPR pourrait être dû à l'inhibition d'organismes phytopathogènes par privation de fer (KLOEPPER et al., 1980). Divers travaux traitent ainsi du rôle de ces bactéries sur le contrôle biologique des microflores rhizosphériques (COOK et al., 1976 ; PETER et al., 1983). Leur répartition dans quelques écosystèmes terrestres, et plus spécialement des agrosystèmes, a aussi été étudiée et le tableau II.2 établi par VANCURA (1980) en donne quelques exemples.

Tableau II.2. - Proportion (%) des différentes espèces de *Pseudomonas fluorescens* dans la rhizosphère et le sol non rhizosphérique de quelques plantes cultivées (VANCURA, 1980).

		9	Sol rhizosphérique			Rhizoplan			
Microorganismes	Sol non rhizosphérique	blé	orge	maïs	concombre	blé	orge	maïs	concombre
P. fluorescens	50,1	51,3	38,1	75,0	80,0	60,0	72,5	92,7	88,5
P. putida	30,2	25,6	45,2	22,5	8,0	37,5	35,0	4,9	4,8
Autres	19,7	23,1	16,7	2,5	12,0	2,5	2,5	2,4	6,7

Le groupe "Autres" inclut P. aeruginosa et des Pseudomonas fluorescents phytopathogènes.

27

• Pour dénombrer les bactéries productrices de sidérophores, sachant que la production

microbienne de sidérophores est d'autant meilleure que le milieu est carencé en fer, nous avons utilisé

un milieu nutritif (Nutrient Agar Difco) enrichi en EDDHA (éthylène diamine-di(O-hydroxyphenyl-

acetic acid, Sigma) qui, en complexant le fer, carence le milieu en cet élément. En utilisant des milieux

nutritifs additionnés de doses croissantes de EDDHA, on peut en effet considérer que les

microorganismes qui croissent dans ces milieux sont capables de produire des substances plus

efficaces que l'EDDHA pour complexer le fer et couvrir ainsi leurs besoins nutritifs. Dans les milieux

utilisés, les concentrations en EDDHA seront de 392, 769, 1481 et 3333 ppm, soit respectivement 1,08;

2,13; 4,11 et 9,24 millimolaires.

La 8-hydroxyquinoléine est aussi souvent utilisée pour carencer un milieu en fer (GEELS

et al., 1985), mais en plus de sa toxicité assez importante, ce composé peut chélater de nombreux autres

oligoéléments, et réduirait par là même la spécificité de ce test.

Enfin, même si le milieu Nutrient Agar n'est pas un milieu universel, il permettra de

dénombrer, au sein d'une population donnée, par addition d'EDDHA, un pourcentage de

microorganismes résistant à des quantités croissantes d'EDDHA et à une carence de plus en plus marquée en fer, correspondant ainsi à une production de substances chélatantes plus efficaces.

Les dénombrements ont été effectués sur tous les milieux de culture pour des dilutions

de sol de 10-3 à 10-9 à raison de trois répétitions par traitement.

Cette méthode n'est pas adaptée au dénombrement des microflores fongiques, qui n'a pas

été effectué par ailleurs.

2.- Recherche et mesure de l'endomycorhization

Comme la mercuriale est une plante endomycorhizée, nous avons vérifié l'existence de

cette symbiose sur les plantes prélevées. Elle se fait par l'observation au microscope photonique des

racines de la plante après coloration spécifique, selon PHILLIPS et HAYMAN (1970). Les racines sont

traitées dans KOH à 10 %, à 90°C, pendant une heure, rincées, acidifiées avec HCl 0,1N, puis colorées

pendant 5 minutes dans une solution de bleu trypan à 0,1 % dans le lactophénol. L'infection s'observe

au microscope en recherchant la présence de mycélium endocellulaire, de vésicules et d'arbuscules

colorés en bleu. Le taux d'infection d'une plante se calcule de la façon suivante :

Nombre de racines infestées

taux d'infection =----- x 100

Nombre de racines observées

3.- Résultats et discussion

3.1.- Les microflores bactériennes rhizosphériques et non rhizosphériques

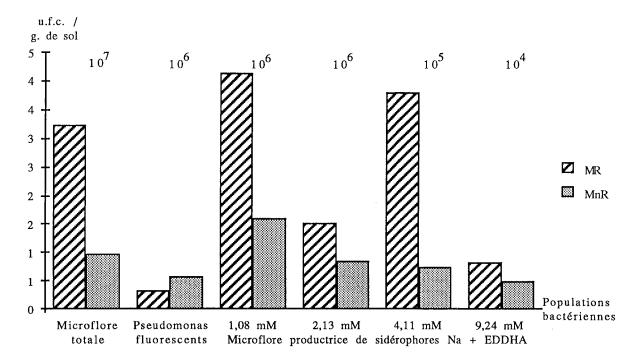
Les tableaux II.3. et II.4. présentent les résultats des dénombrements bactériens obtenus pour la rendzine et le sol colluvial acide. Les valeurs de ces tableaux correspondent aux moyennes, calculées à partir des trois répétitions, et à leurs intervalles de confiance ; les valeurs détaillées de chaque échantillon sont reportées dans l'annexe 1.

Tableau II.3.- Dénombrements des bactéries dans la rendzine, exprimés en u.f.c. (unités formant une colonie) par gramme de sol (toutes ces valeurs sont à multiplier par 10⁶), pourcentages des différentes populations par rapport à la population totale rhizosphérique (M.R) et non rhizosphérique (M.n.R) et effet rhizosphérique (R/S).

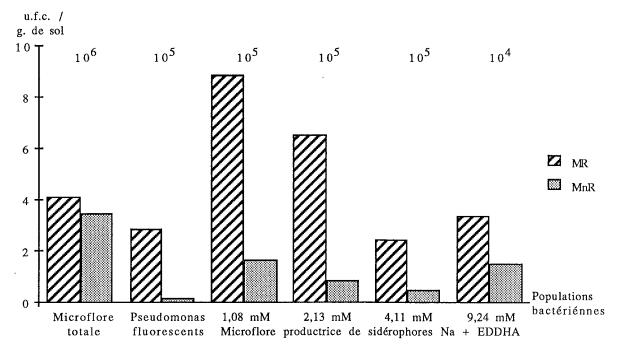
		Pseudomonas fluorescents (KB)	Bactéries productrices de sidérophores (NA + EDDHA)					
			1,08mM	2,13 mM	4,11 mM	9,24 mM		
Sol rhizosphérique	32,358 ± 3,454	0,328 ± 0,151	4,125 ± 1,350	1,530 ± 0,421	0,381 ± 0,298	0,008 ± 0,005		
Sol non rhizosphérique	9,751 ± 1,020	0,574 ± 0,388	1,603 ± 0,195	0,849 ± 0,737	0,075 ± 0,025	0,005 ± 0,001		
% de la M.R totale	100,00	1,03	12,55	4,71	1,13	0,02		
% de la M.n.R totale	100,00	6,02	16,65	8,83	0,79	0,05		
R/S	3,32	0,57	2,57	1,80	5,05	1,67		

Tableau II.4.- Dénombrements des bactéries dans le sol colluvial acide, exprimés en u.f.c. (unités formant une colonie) par gramme de sol (toutes ces valeurs sont à multiplier par 106), pourcentages des différentes populations par rapport à la population totale rhizosphérique (M.R) et non rhizosphérique (M.n.R), et effet rhizosphérique (R/S).

			Bactéries productrices de sidérophores (NA + EDDHA)					
			1,08mM	2,13 mM	4,11 mM	9,24 mM		
Sol rhizosphérique	4,136 ± 0,943	0,285 ± 0,217	0,888 ± 0,191	0,653 ± 0,321	0,246 ± 0,180	0,034 ± 0,018		
Sol non rhizosphérique	3,482 ± 1,528	0,018 ± 0,025	0,164 ± 0,040	0,088 ± 0,058	0,050 ± 0,049	0,015 ± 0,004		
% de la M.R totale	100,00	7,85	22,10	16,68	6,41	0,83		
% de la M.n.R totale	100,00	0,45	5,13	2,50	1,24	0,48		
R/S	1,19	15,94	5,41	7,40	4,90	2,21		



<u>II 3 a</u>: Rendzine



<u>Π 3 b</u>: Sol brun colluvial acide

MR : microflore rhizosphérique MnR : microflore non rhizosphérique

Figure II 3: Effets rhizosphériques en présence de la mercuriale dans la rendzine (II 3 a) et dans le sol brun colluvial acide (II 3 b)

Les populations bactériennes dénombrées correspondent à des valeurs tout à fait moyennes pour des sols (ALEXANDER, 1977; DOMMERGUES et MANGENOT, 1970). Les microflores bactériennes totales dénombrées sur milieu nutritif de base (NA) sont un peu plus importantes dans le sol calcimagnésique, où elles sont, au moment du prélèvement, respectivement de 3.10⁷ et 9.10⁶ bactéries par gramme de sol dans la rhizosphère et hors rhizosphère de la mercuriale, alors que dans le sol colluvial acide, elles n'atteignent que 4.10⁶ et 3.10⁶.

Les effets rhizosphériques sont faibles, puisque les rapports R/S (nombre de bactéries dans la rhizosphère/nombre de bactéries hors rhizosphère) ne sont que de 3,3 et 1,2 pour ces deux sols. Ce résultat peut s'expliquer en partie par la nature des échantillons qui sont prélevés dans les horizons de surface, où le développement des populations bactériennes est favorisé par la présence de matières organiques apportées par les litières de chêne, charme et hêtre d'une part, de sapin et épicéa d'autre part, et par les strates herbacées associées. Les rapports C/N de ces sols révèlent d'ailleurs une bonne activité biologique.

Les Pseudomonas fluorescents dénombrés sur milieu King B représentent respectivement, pour les microflores rhizosphériques et non rhizosphériques, 1 et 6 % de la microflore totale pour la rendzine, et 8 et 0,4 % pour le sol colluvial acide. Un effet rhizosphérique (R/S = 15,9) est observé dans le sol colluvial acide, mais pas dans le sol calcimagnésique (R/S = 0,57), où ces bactéries sont légèrement plus nombreuses dans le sol que dans la rhizosphère. Ces populations de *Pseudomonas fluorescens* sont relativement moins abondantes que celles observées par VANCURA (1980), qui trouvait (Tableau II.2.) que 50 % des bactéries de sols cultivés (blé, orge, maïs) et 40 à 80 % des bactéries rhizosphériques de ces mêmes plantes étaient des *Pseudomonas fluorescens*. Néanmoins, DE OLIVEIRA (1988), en comparant un sol brun mésotrophe et un sol brun acide, montre que dans ce premier sol les *Pseudomonas fluorescens* sont prédominants dans le compartiment non rhizosphérique, alors que dans le second sol acide, ces mêmes bactéries n'ont été observées que dans la rhizosphère des pins ectomycorhizés, qui y avaient été introduits.

En présence d'EDDHA, ajouté au milieu nutritif de base, on observe des populations dont le nombre décroît avec des apports croissants de ce complexant du fer. Les bactéries résistantes à l'EDDHA et adaptées à des milieux de plus en plus carencés en fer sont de l'ordre de 10⁵ à 10⁶ par gramme de sol pour des teneurs en EDDHA de 392 ppm, et de l'ordre de 10³ à 10⁴ pour les teneurs les plus élevées (3333 ppm). Pour les bactéries qui poussent sur ces milieux, on observe un effet rhizosphérique très sensible, plus important dans le sol colluvial acide de Longemer. La diminution des populations bactériennes sous l'effet des concentrations croissantes en EDDHA est relativement plus accentuée pour la rendzine. Pour la plus forte concentration en EDDHA (3333 ppm), le nombre de bactéries formant une colonie provenant de la rendzine est inférieur à celui trouvé pour le sol acide : 0,02 % et 0,05 % par rapport à 0,83 % et 0,48 % de la microflore totale respectivement pour les sols rhizosphériques et non rhizosphériques.

Mais il faut aussi noter une divergence entre les deux sols en ce qui concerne l'évolution des pourcentages des microflores rhizosphériques et non rhizosphériques, par rapport à la population totale. Pour la rendzine, ce sont les microorganismes non rhizosphériques qui sont, proportionnellement, plus nombreux, alors que pour le sol brun colluvial acide, ce sont les microorganismes rhizosphériques. Les conditions plus difficiles de mobilisation du fer dans la rendzine favorisent peut-être le développement de microorganismes plus efficaces à chélater le fer dans le sol non rhizosphérique, où les conditions nutritionnelles sont plus difficiles que dans le sol rhizosphérique.

D'autres groupes bactériens n'ont pas été recherchés, mais dans les dénombrements des microflores bactériennes totales, nous avons observé une nette prédominance des actinomycètes dans le sol acide par rapport à la rendzine, résultat confirmé par les travaux de DE OLIVEIRA (1988).

L'étude des populations microbiennes des sols dépend de nombreux facteurs (climatiques, saisonniers, nutritionnels) et peut nécessiter une étude saisonnière plus complète afin d'obtenir une meilleure image de la dynamique des populations. Néanmoins, des différences ont pu être mises en évidence entre ces deux sols et entre les milieux rhizosphériques et non rhizosphériques. Pour compléter ces observations, nous avons plutôt recherché les sidérophores dans les sols, en soulignant d'une part, qu'il a été démontré que les plantes pouvaient absorber des complexes ou des chélates organo-minéraux solubles d'éléments en traces synthétisés par les microorganismes (BARBER, 1973) et que, d'autre part, la présence de sidérophores révèle l'activité des microorganismes qui peuvent les produire.

Enfin, les bactéries poussant sur les milieux sélectifs ont été isolées aux plus fortes dilutions, en vue d'études ultérieures (détermination de l'espèce, production de sidérophores ...).

3.2.- Endomycorhization de la mercuriale

L'observation des lames colorées nous indique une bonne endomycorhization pour tous les plants de mercuriale isolés, avec un taux supérieur pour la rendzine. Ce taux d'endomycorhization pour la rendzine est de 70 %, alors qu'il n'est que de 45 % pour le sol brun colluvial acide. Jusqu'ici, il n'a pas été montré que les endomycorhizes produisent des sidérophores de type fongique, mais nous pouvons au moins considérer ces taux d'endomycorhization comme indicateurs d'un facteur biotique stimulant la croissance des plantes et favorisant leur activité rhizosphérique.

III.- RECHERCHE DES SIDEROPHORES DANS LES SOLS RHIZOSPHERIQUES ET NON RHIZOSPHERIQUES ASSOCIES A LA MERCURIALE PRELEVEE SUR LA RENDZINE ET SUR LE SOL BRUN COLLUVIAL ACIDE

L'analyse des sidérophores dans les sols utilise essentiellement, à ce jour, des méthodes de dosage biologique fondé sur la croissance d'une bactérie hétérotrophe, *Arthrobacter flavescens* JG9, sensible aux sidérophores, qu'elle utilise comme facteurs de croissance (cf. Première partie : Méthodologie des sidérophores). POWEL *et al.* (1980) ont ainsi montré l'existence de sidérophores dans les extraits aqueux de sols. Cette même méthode, utilisée aussi par des biochimistes (LUCKEY *et al.*, 1972; EMERY, 1973) a aussi permis de montrer un effet rhizosphérique, en décelant dans la rhizosphère de diverses plantes, des conifères pour la plupart, des concentrations de sidérophores jusqu'à 50 fois supérieures à celles notées dans les échantillons non rhizosphériques (REID *et al.*, 1984).

Afin de localiser les sidérophores dans les différentes fractions des matières organiques du sol, nous avons effectué des extractions à l'eau, à l'acide et à la soude, qui concernent les matières organiques hydrosolubles, acidosolubles (acides fulviques) et alcalinosolubles (acides fulviques et humiques) des deux sols précédemment cités. Comme ces extraits sont complexes et contiennent des composés autres que les sidérophores, qui pourraient agir sur *Arthrobacter flavescens* JG9, ces extraits ont été soumis à des extractions spécifiques des sidérophores. Les résultats permettront ainsi de quantifier et de localiser les sidérophores dans les différentes fractions des matières organiques des sols étudiés.

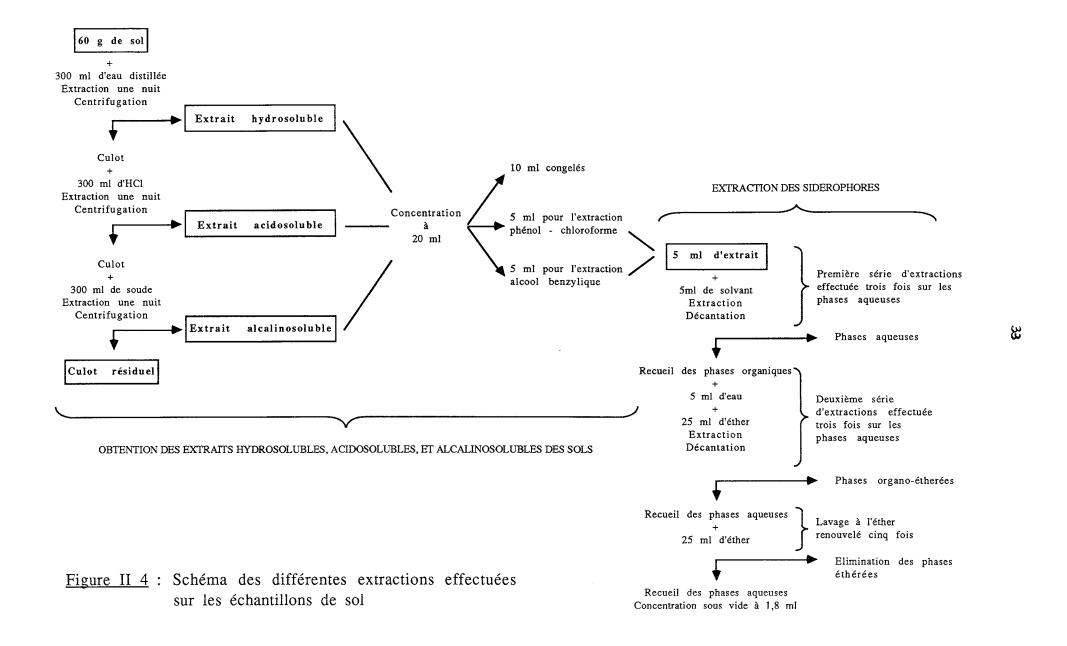
A.- METHODES D'EXTRACTION

1.- Extraction des différentes fractions organiques du sol

Les extractions effectuées sur les sols sont présentées schématiquement dans la figure II.4.

Les échantillons de sol séchés sont tamisés à 2 mm. 60 grammes de sol sont placés dans 300 ml d'eau distillée et agités une nuit à température ambiante. Après centrifugation, le surnageant recueilli correspond à l'extrait dit hydrosoluble. Le culot est repris dans 300 ml d'acide chlorhydrique pour un pH final de 2, et agité une nuit à température ambiante, puis centrifugé. Le surnageant recueilli correspond à l'extrait acidosoluble. Ce nouveau culot est repris dans 300 ml de soude pour un pH final de 12. Après agitation une nuit à température ambiante, le surnageant recueilli après centrifugation correspond alors à l'extrait alcalinosoluble, et le culot résiduel est conservé.

Les extraits hydrosolubles, acidosolubles et alcalinosolubles sont concentrés par évaporation sous vide à 40°C et ramenés à 20 ml. Dix millilitres subiront le protocole d'extraction des sidérophores par des solvants organiques décrits ci-après (5 ml d'extrait de sol pour chaque solvant), les dix autres millilitres étant conservés congelés. Chaque volume recueilli après les extractions organiques sera concentré sous vide à 40°C à 1,8 ml et congelés jusqu'aux analyses suivantes.



Les extraits alcalinosolubles du sol colluvial acide, trop concentrés, seront dialysés, ce qui permettra de minimiser la précipitation des matières humiques lors de l'acidification effectuée pour l'extraction des sidérophores par les solvants organiques. Pour cela, ces extraits alcalinosolubles seront concentrés à 100 ml, acidifiés à un pH de 2 et laissés à décanter une nuit à 4 °C. Après centrifugation, le surnageant recueilli constituera la fraction "acides fulviques acidosolubles". Le culot est repris dans de la soude jusqu'à complète dissolution des acides humiques, pour un pH final de 12. Cette fraction alcalinosoluble sera alors dialysée à 1000 contre de l'eau distillée pendant une semaine.

La teneur en carbone organique de chaque échantillon de sol et de chaque extrait est obtenue à l'aide d'un analyseur élémentaire Carmhograph Wösthoff ou d'un analyseur TCM (Total Carbon Monitor, Carlo Erba).

2.- Extraction et dosage des sidérophores

Le principe de cette extraction est fondé sur les affinités différentes des sidérophores pour l'eau et les solvants organiques, et sera appliqué aux extraits hydrosolubles, acidosolubles et alcalinosolubles (Figure II.4).

Un volume de l'échantillon à traiter est mélangé dans une ampoule à décanter à un volume de solvant, soit de l'alcool benzylique (après saturation de l'échantillon au sulfate d'ammonium), soit un mélange poids à poids de phénol-chloroforme. L'échantillon est acidifié en début d'extraction pour favoriser l'ionisation des sidérophores et ainsi leur séparation. Du chlorure ferrique peut aussi être ajouté afin de localiser plus facilement, au cours de l'extraction, les sidérophores alors colorés en rouge. Après décantation, deux phases sont obtenues : une phase organique, contenant tous les produits liposolubles, et en particulier les sidérophores, une phase aqueuse contenant entre autres tous les sels de la solution initiale. La phase organique est recueillie et la phase aqueuse est soumise à une nouvelle extraction. Trois extractions successives sont ainsi effectuées.

Les phases organiques issues des trois extractions étant regroupées, cinq volumes d'éther et un volume d'eau leur sont alors ajoutés dans l'ampoule à décanter. Après agitation et décantation, deux nouvelles phases sont obtenues : *une phase organo-éthérée*, dans laquelle se sont dissous les solvants, et *une phase aqueuse* contenant les sidérophores, insolubles dans l'éther. La phase aqueuse est recueillie, alors que la phase organo-éthérée est de nouveau soumise à extraction, et ceci trois à cinq fois de suite. Enfin, les phases aqueuses rassemblées sont lavées plusieurs fois à l'éther, afin d'obtenir une bonne séparation des phases, puis concentrées en 1,8 ml à l'évaporateur rotatif à 40°C.

Les sidérophores sont alors dosés sur les extraits hydrosolubles, acidosolubles et alcalinosolubles ayant subi ou non l'extraction spécifique des sidérophores par les solvants organiques, par la méthode de dosage biologique utilisant la bactérie *Arthrobacter flavescens* JG9. Les modalités et les limites de cette méthode sont présentées dans la première partie "Méthodologie des sidérophores".

B.- RESULTATS

1.- Carbone organique des sols et des extraits hydrosolubles, acidosolubles et alcalinosolubles

Le tableau II.5. présente, pour trois échantillons de chaque type de sol, les quantités de carbone mesurées dans les différentes fractions de sol, déterminées au Carmhograph Wösthoff pour les échantillons solides (sol initial et culot résiduel après extraction) et les extraits alcalins, et à l'analyseur TCM (Total Carbon Monitor Carlo-Erba) pour les extraits aqueux et acides.

Tableau II.5.- Bilan du carbone entre le sol initial et les différentes fractions obtenues après extraction. Les valeurs représentent les pourcentages du carbone des différentes fractions par rapport au carbone total.

			RENI	ZINE					SOL COLI	UVIAL A	.CIDE	
	s	ol rhizosphe	Érique	So	l non rhizosp	hérique	Sol	rhizosphé	rique	Sol no	n rhizosph	nérique
Echantillons	A	В	С	D	E	F	ĭ	II	III	IV	V	VI
Sol initial	7,12	7,38	7,05	8,13	10,10	9,14	6,43	4,98	6,14	4,62	11,83	12,01
Sol résiduel après extraction	5,82	5,10	6,47	5,86	9,21	7,19	2,62	3,44	3,50	2,03	5,16	4,58
Fraction hydrosoluble	0,008	0,008	0,010	0,013	0,010	0,010	0,015	0,013	0,013	0,012	0,020	0,022
Fraction acidosoluble	0,013	0,032	0,012	0,030	0,013	0,012	0,040	0,013	0,010	0,017	0,018	0,022
Fraction alcalinosoluble	0,420	1,590	0,545	1,750	1,220	0,980	2,525	1,702	1,800	2,675	5,437	4,515
Somme des fract.	6,261	6,730	7,037	7,653	10,453	8,192	5,2	5,168	5,323	4,734	10,635	9,139
Carbonate	800,0	0,002	0,007	0,004	0,007	0,008	-	•	-	-	-	-
Bilan du carbone	0,88	0,91	1	0,94	1,04	0,90	0,81	1,04	0,87	1,02	0,90	0,76

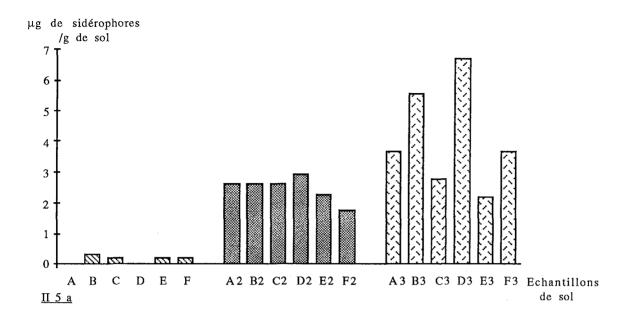
Les bilans imparfaits des extractions des matières organiques s'expliquent par le mode opératoire qui cumule des erreurs intervenant au cours des différentes étapes d'extractions, et qui sont essentiellement dues aux fortes concentrations en matière organique des extractions alcalines, et aux pertes de matière subies au cours des filtrations à 0,45 µm effectuées avant le dosage au T.C.M.

2.- Sidérophores de type hydroxamates décelables par la méthode biologique dans les extraits hydrosolubles, acidosolubles et alcalinosolubles des sols. Résultats et discussion.

Les mesures de sidérophores sont exprimées en µg équivalents DFOB (méthane sulfonate de déferoxamine) utilisé ici comme sidérophore témoin. Les résultats sont exprimés en µg équivalents DFOB par gramme de sol et en µg équivalents DFOB par mg de carbone de l'extrait. Les tableaux II.6. et II.7. rassemblent ces résultats respectivement pour la rendzine et le sol colluvial acide, sous forme de moyennes pour les prélèvements de chaque échantillon, et présentent leur intervalle de confiance, calculés sur trois répétitions. Les figures II.5. et II.6. indiquent par contre les teneurs des hydroxamates en µg (équivalents DFOB) par gramme de sol et en µg (équivalents DFOB) par mg de carbone pour chaque échantillon.

Tableau II.6.- Quantité de sidérophores des différentes fractions des sols rhizosphériques et non rhizosphériques de la rendzine, exprimées en μ g/g de sol et en μ g/mg de carbone.

SIDEROPHORES									
Extrait	s de sol	μg/g de sol	μg/mg de carbone						
Fraction	Sol Rhizos.	0,203 ± 0,155	2,303 ± 1,724						
hydrosoluble	Sol non Rhizos.	$0,\!170 \pm 0,\!127$	1,673 ± 1,237						
	R/S	1,15	1,38						
Fraction	Sol Rhizos.	$2,670 \pm 0,000$	17,162 ± 7,508						
acidosoluble	Sol non rhizos.	$2,387 \pm 0,587$	$14,598 \pm 4,065$						
	R/S	1,12	1,18						
Fraction	Sol Rhizos.	4,063 ± 1,432	0,588 ± 0,277						
alcalinosoluble	Sol non Rhizos.	$4,250 \pm 2,291$	$0,318 \pm 0,116$						
	R/S	0,96	1,85						



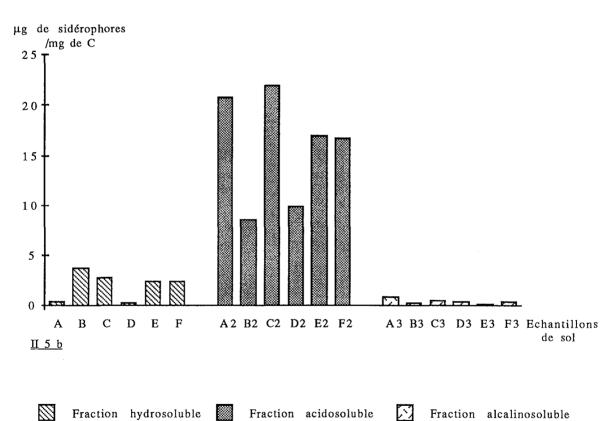
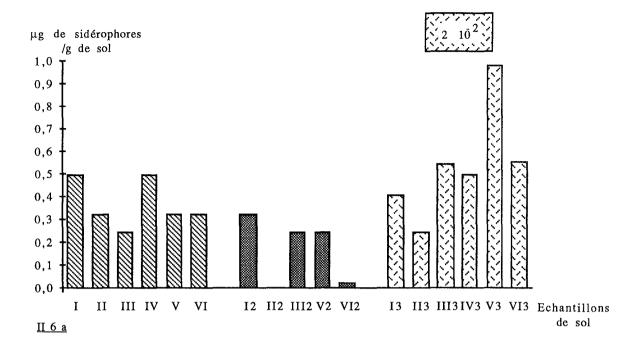


Figure II 5: Teneurs en sidérophores (mesurées en équivalent DFOB) trouvées dans les différentes fractions des échantillons de la rendzine exprimées en μg/g de sol (II 5 a) et en μg/mg de carbone (II 5 b).



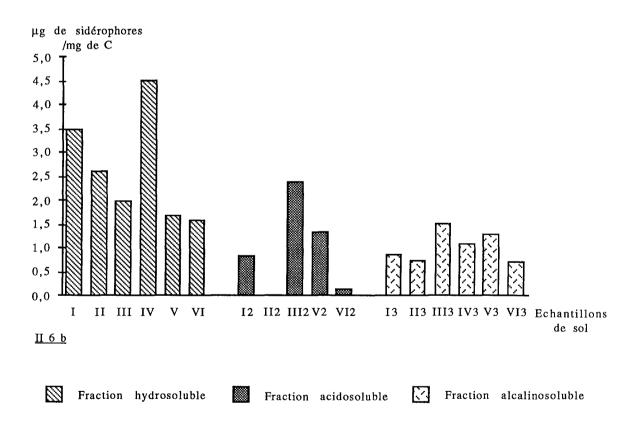


Figure II 6 : Teneurs en sidérophores (mesurées en équivalent DFOB) trouvées dans les différentes fractions des échantillons du sol colluvial acide exprimées en $\mu g/g$ de sol (II 6 a) et en $\mu g/mg$ de carbone (II 6 b).

Tableau II.7.- Quantité de sidérophores des différentes fractions des sols rhizosphériques et non rhizosphériques du sol acide colluvial, exprimées en $\mu g/g$ de sol et en $\mu g/mg$ de carbone.

SIDEROPHORES								
Extrai	ts de sol	μg/g de sol	μg/mg de carbone					
Fraction	Sol Rhizos.	0,360 ± 0,128	2,697 ± 0,793					
hydrosoluble	Sol non Rhizos.	0,387 ± 0,098	2,597 ± 1,671					
Fraction	R/S	0,93	1,04					
	Sol Rhizos.	0,290 ± 0,057	1,611 ± 1,083					
acidosoluble	Sol non rhizos.	0,140 ± 0,156	0,748 ± 0,843					
	R/S	2,07	2,15					
Fraction alcalinosoluble	Sol Rhizos. Sol non Rhizos. R/S	20,241 ± 7,632 34,166 ± 13,22 0,59	$1,054 \pm 0,417$ $1,033 \pm 0,297$ 0,99					

Les dosages ont été effectués quatre fois, afin de quantifier le facteur d'erreur dû à la variabilité du test biologique effectué par la bactérie. Il s'avère que les réponses au test peuvent varier de 5 à 15 % en valeurs absolues, mais que les réponses relatives restent toujours similaires. Les extractions ont été effectuées sur des sols secs, et ce séchage a pu favoriser un artefact dû à l'adsorption des hydroxamates. En effet, le pourcentage d'humidité des sols et la concentration en hydroxamates extraits sont inversement proportionnels (POWELL et al., 1980). Mais cette erreur peut être considérée ici comme négligeable, étant donné que 70 % des hydroxamates sont désorbés après une heure d'extraction (POWELL, 1982). Les valeurs relativement élevées des intervalles de confiance révèlent l'hétérogénéité des échantillons pour un même type de sol. La variabilité des teneurs en sidérophores est presque toujours plus importante dans le sol non rhizosphérique que dans le sol rhizosphérique. Mais ceci n'empêche pas de dégager des valeurs moyennes caractérisant chaque milieu étudié.

Pour la rendzine : Les résultats des analyses des sidérophores dosés directement dans les extraits hydrosolubles, acidosolubles et alcalinosolubles des sols, présentés dans le tableau II.6., montrent des quantités différentes dans les trois factions des matières organiques, et qui se classent dans l'ordre suivant : extrait hydrosoluble < extrait acidosoluble < extrait alcalino-soluble. Les quantités sont environ 15 à 25 fois plus importantes dans les extraits acidosolubles et alcalinosolubles que dans les extraits hydrosolubles. Des effets rhizosphériques sensibles sont observables dans les extraits hydrosolubles et acidosolubles.

Ces résultats, exprimés en fonction de la teneur en carbone des extraits, révèlent des teneurs en sidérophores dont le classement est modifié : extrait alcalinosoluble < extrait hydrosoluble < extrait acidosoluble. Dans ces trois extraits, on observe un effet rhizosphérique très net et des valeurs du rapport R/S (teneur du sol rhizosphérique/teneur du sol non rhizosphérique) de 1,4 ; 1,2 ; 1,8.

Ces résultats permettent de constater (Figure II.5.) :

- l'importance quantitative relative des sidérophores dans la fraction acidosoluble des matières organiques de la rendzine, qui possède, par rapport au carbone de ces fractions, les teneurs les plus fortes en sidérophores des fractions organiques,
- l'importance quantitative globale du stockage des sidérophores au sein des composés organiques alcalinosolubles, qui en renferment la quantité la plus importante en raison du stock de matières humiques présentes,
- la faible quantité de sidérophores de la fraction hydrosoluble et donc des solutions du sol, alors que leur teneur, par rapport au carbone de la fraction, est plus importante que dans les fractions humiques et fulviques de l'extrait alcalin,
- un effet rhizosphérique relativement net, en particulier pour les résultats exprimés par rapport au carbone des fractions, qui révèlent des teneurs plus fortes dans les fractions rhizosphériques.

Pour le sol colluvial acide : les quantités les plus importantes de sidérophores sont aussi, dans ce sol acide, observées dans les fractions alcalinosolubles, pour les résultats exprimés par rapport à la quantité de sol. Dans cette fraction, les quantités associées aux composés humiques sont plus élevées que celles associées aux composés fulviques (Tableau II.8.)

Tableau II.8.- Quantités de sidérophores en µg par gramme de sol dans les fractions fulviques et humiques de l'extrait alcalin du sol colluvial acide.

Fraction acidosoluble	Sol rhizosphérique	7,986
Acides fulviques	Sol non rhizosphérique	8,055
Fraction alcalinosoluble	Sol rhizosphérique	12,155
Acides humiques	Sol non rhizosphérique	26,111

En revanche, les sidérophores sont plus abondants dans l'extrait hydrosoluble que dans l'extrait acidosoluble. On n'observe pas d'effet rhizosphérique comme dans la rendzine, les rapports R/S de tous ces extraits étant en effet inférieurs à 1, sauf pour les extraits acides, qui montrent un net effet rhizosphérique avec une valeur du rapport R/S de 2,07.

Par rapport aux quantités de matières organiques de chaque fraction, les teneurs en sidérophores varient dans le sens croissant suivant : extraits alcalinosolubles ≤ extraits acidosolubles < extraits hydrosolubles, avec des valeurs du rapport R/S voisines de 1 pour les extraits alcalinosolubles et hydrosolubles, et légèrement supérieures à 2 pour les fractions acidosolubles (2,15).

Dans ce sol, on peut aussi souligner l'importance du stockage des sidérophores au sein des composés humiques *sensu lato* (Figure II.6.). Par contre, la fraction hydrosoluble - en fait la solution du sol - renferme, proportionnellement aux quantités de carbone présentes dans les fractions, les teneurs en sidérophores les plus importantes.

Comparaison des deux sols: Par rapport aux quantités de sol, la teneur totale en sidérophores est plus élevée dans le sol colluvial acide que dans la rendzine. Pour chacune des fractions, on peut observer que, dans les extraits hydrosolubles, les teneurs en sidérophores du sol colluvial acide sont légèrement plus élevées, alors que pour les extraits acidosolubles, les teneurs sont nettement supérieures dans la rendzine. Dans les extraits alcalinosolubles, les teneurs en sidérophores pour le sol colluvial acide sont cinq à huit fois plus importantes que celles de la rendzine. Mais si les quantités totales de sidérophores sont plus importantes dans le sol colluvial acide, une proportion plus grande est associée aux composés humiques et est donc sans doute peu disponible, alors que dans la rendzine, une quantité relativement plus importante que dans le sol colluvial acide se trouve dans les fractions hydrosoluble et acidosoluble, et semble donc plus mobile. Cette disponibilité potentielle plus grande dans la rendzine se confirme en considérant les quantités de sidérophores par rapport au carbone de chaque fraction. Les sidérophores sont, dans la rendzine, liés en proportion plus importante, à des composés carbonés plus biodisponibles et qui seront donc les premiers à être utilisés par la microflore et les systèmes racinaires.

Comparativement à la dynamique générale des matières organiques de ces sols, on constate donc l'importance relative des sidérophores dans les fractions plus mobiles (solution du sol, fraction acidosoluble), mais aussi la formation d'un pool, ou d'un stock quantitativement important de sidérophores, immobilisé par les matières organiques alcalinosolubles. Dans ce compartiment peu mobile, les teneurs sont faibles, mais la masse totale est importante.

Les relations matière organique-sidérophores ont été abordées par quelques auteurs (POWELL *et al.*, 1980), qui ont montré une corrélation positive entre ces deux types de composés. Par des expériences d'adsorption, ils ont observé la capacité de fixation de différents sidérophores sur le complexe argilo-humique des sols, grâce à la formation d'associations relativement stables.

3.- Sidérophores de types hydroxamates décelables par la méthode biologique, après extraction organique dans les extraits aqueux, acides et alcalins des sols. Résultats et discussion

Les résultats présentés ne concernent que les extractions à l'alcool benzylique. Les extractions au phénol-chloroforme ont des rendements inférieurs et conduisent à des résultats plus hétérogènes, qui ne sont pas présentés.

Pour la rendzine : Les résultats d'analyse des sidérophores après extraction sont rassemblés dans le tableau II.9.

Tableau II.9.- Quantités de sidérophores dosés après extraction organique dans les extraits hydrosoluble, acidosoluble et alcalinosoluble de la rendzine.

Siderophores								
Extrait	s de sol	μg/g de sol	μg/mg de carbone					
Fraction	Sol Rhizos. Sol non Rhizos.	0,105 ± 0,021	1,206 ± 0,139					
hydrosoluble	R/S	0.140 ± 0.035 0.75	1,205 ± 0,102 1					
Fraction	Sol Rhizos.	0.72 ± 0.085	3,978 ± 2,102					
acidosoluble	Sol non rhizos. R/S	0,78 ± 0,533 0,92	6,059 ± 4,733 0,66					
Fraction	Sol Rhizos.	1,665 ± 2,295	0,168 ± 0,085					
alcalinosoluble	Sol non Rhizos. R/S	$2,295 \pm 2,710$ 0,73	0,151 ± 0,142 1,11					

Que les teneurs soient exprimées en µg par gramme de sol ou en µg par mg de carbone des extraits, on retrouve les mêmes types de répartition de sidérophores que ceux observés dans les extraits non traités par les solvants, c'est-à-dire qu'on observe des teneurs croissantes dans le sens fractions hydrosolubles < fractions acidosolubles < fractions alcalinosolubles pour les résultats exprimés en µg par gramme de sol, et dans le sens fractions alcalinosolubles < fractions hydrosolubles < fractions acidosolubles pour les résultats exprimés en µg par mg de carbone. En revanche, l'effet rhizosphérique ne semble pas être marqué de la même façon. Les rapports R/S sont inférieurs à 1.

Mais la grande différence se situe au niveau des valeurs totales cumulées des résultats (Tableau II.10.).

Les quantités de sidérophores déterminées après extraction organique sont 2 à 5 fois plus faibles. Plusieurs hypothèses doivent être alors considérées pour expliquer ces différences. Les méthodes d'extraction pourraient avoir un très mauvais rendement, mais des vérifications avec des sidérophores témoins (DFOB, ferrichrome et ferrichrome A)ont démontré l'efficacité de

l'extraction. Il n'en reste pas moins que d'une part les sidérophores testés ne sont pas représentatifs de tous les sidérophores présents dans les sols, et que d'autre part, les échantillons à traiter sont des milieux plus riches et plus complexes qu'une simple solution témoin.

Tableau II.10.- Comparaison des quantités totales de sidérophores dosées dans les échantillons de la rendzine de la Crédence, avant et après extraction organique, exprimées en μg de sidérophores (équivalent DFOB) par mg de carbone.

	Sol	rhizosphéi	rique	Sol non rhizosphérique			
Echantillons de sol	A	В	С	D	Е	F	
Quantités totales de sidérophores avant extraction organique (µg/mg de C)	22,19	12,65	25,31	10,53	19,63	19,59	
Quantités totales de sidérophores après extraction organique (µg/mg de C)	5,27	2,73	6,84	2,22	9,95	10,06	
Rapport avant extr./après extr.	4,20	4,63	3,70	4,73	1,97	1,95	

Ce dernier point mérite d'être considéré et peut être à l'origine d'une perte importante de sidérophores recherchés, puisqu'il se produit, lors des extractions, des précipitations de composés organiques qui empêchent une bonne séparation des phases. Ces précipitations étaient surtout abondantes lors des extractions des fractions acidosolubles et alcalinosolubles, qui, comme nous l'avons vu, contiennent le plus de sidérophores. On ne retrouve effectivement, dans les échantillons extraits par les solvants organiques, que 50 à 70 % des sidérophores des fractions hydrosolubles, et seulement 23 à 41 % et 28 à 47 % respectivement des sidérophores des fractions acidosolubles et alcalinosolubles.

Une autre hypothèse pour expliquer ces différences de teneurs en sidérophores entre les échantillons traités et non traités par les solvants organiques pourrait être la présence dans les sols de composés qui n'appartiennent pas au groupe des hydroxamates, mais auxquels la bactérie *Arthrobacter flavescens* JG9 serait sensible. Ces composés peuvent être de type leghémoglobine (BERTHELIN, communication personnelle) ou haemine (POWELL, 1982). Toutefois, il faudrait que ces composés soient en quantités relativement abondantes pour entraîner de telles différences.

Pour mieux vérifier ces hypothèses et l'origine de ces différences de résultats, il y aurait lieu de travailler sur des extraits purifiés (précipitation préalable des polysaccharides par l'alcool, dialyse, désalage ...). Des extraits de sols sans sidérophores pourraient être étudiés pour définir l'influence de différents composés sur la croissance d'*Arthrobacter flavescens* JG9.

Les spectres UV-visibles de ces échantillons n'ont pas fait apparaître de différences significatives pouvant expliquer ces différences de dosage dans les deux types d'extraits.

Des séparations électrophorétiques et des dosages spectrophotométriques pourraient permettre de trouver une réponse plus précise quant à la comparaison des extraits.

L'utilisation d'un sidérophore marqué au carbone radioactif, ajouté comme étalon interne, permettrait de vérifier l'efficacité des extractions organiques à partir des différents extraits hydrosolubles, acidosolubles et alcalinosolubles.

Toutefois, comme les précédents travaux sur les sidérophores dans les sols utilisent le dosage biologique sur des extraits hydrosolubles simples des sols, nous utiliserons les résultats obtenus pour ce même type d'extrait à titre comparatif.

Pour le sol colluvial acide, les résultats sont exprimés en μg par g de sol ; les teneurs en sidérophores vont croissant dans le sens fractions hydrosolubles < fractions acidosolubles < fractions alcalinosolubles, alors que, lorsque les résultats sont exprimés en μg par mg de carbone, l'ordre croissant est le suivant : fractions alcalinosolubles < fractions acidosolubles < fractions hydrosolubles (Tableau II.11.).

Tableau II.11.- Quantités de sidérophores dosés après extraction organique dans les extraits hydrosolubles, acidosolubles et alcalinosolubles du sol colluvial acide.

Siderophores								
Extrait	s de sol	μg/g de sol	μg/mg de carbone					
Fraction	Sol Rhizos.	0,14 ± 0,035	1,05 ± 0,182					
hydrosoluble	Sol non Rhizos. R/S	0,38 ± 0,173 0,37	$2,11 \pm 0,421$ $0,5$					
Fraction	Sol Rhizos.	0,190 ± 0,105	$1,006 \pm 0,345$					
acidosoluble	Sol non rhizos. R/S	0,186± 0,161 1,02	$0,971 \pm 0,908$ 1,04					
Fraction	Sol Rhizos.	82,818 ± 138,736	$0,276 \pm 0,281$					
alcalinosoluble	Sol non Rhizos. R/S	3,727 ± 1,220 22,22	$0,122 \pm 0,065$ 2,26					

Les extraits de sol non traités aux solvants organiques donnaient les mêmes classements. En revanche, on peut noter une inversion de l'effet rhizosphérique pour les fractions hydrosolubles. Le rapport R/S est supérieur à 1 avant l'extraction organique, et inférieur à 1 après extraction.

Les mêmes différences entre les dosages dans les échantillons, avant et après extraction, se retrouvent pour les trois fractions (Tableau II.12.)

Tableau II.12.- Comparaison des quantités totales de sidérophores dosées dans les échantillons du sol colluvial acide de Longemer, avant et après extraction organique, exprimées en µg de sidérophores (équivalent DFOB) par mg de carbone.

	Sol rhizosphérique			Sol non rhizosphérique	
Echantillons de sol	I	II	III	v	VI
Quantités totales de sidérophores avant extraction organique (µg/mg de C)	5,21	3,37	5,88	4,31	2,44
Quantités totales de sidérophores après extraction organiques (µg/mg de C)	2,22	2,92	1,84	4,14	2,67
Rapport avant extr./après extr.	2,34	1,15	3,18	1,03	0,91

Toutefois, les extractions sur les différentes fractions du sol colluvial acide semblent avoir un meilleur rendement que les extractions effectuées sur les extraits de la rendzine. Il faut rappeler que des dialyses n'ont été effectuées que pour les extraits alcalins, et que cette purification n'a pas été très efficace, puisque l'on ne retrouve que 12 à 26 % des sidérophores dosés dans les fractions alcalinosolubles avant extraction.

Les mêmes remarques formulées pour les extraits de la rendzine, et présentées plus haut, peuvent s'appliquer aussi dans le cas du sol colluvial acide.

Les quantités de sidérophores trouvées après extraction organique sont en général plus faibles que celles que l'on note avant extraction, et ceci pour les deux sols. Néanmoins, il faut souligner que pour chacun des deux sols, et pour les deux types d'extraction (aqueuse et organique), la répartition des hydroxamates dans les différentes fractions des matières organiques est tout à fait comparable.

Les rapports d'extraction (hydroxamates dosés avant extraction organique/hydroxamates dosés après extraction organique) sont différents pour les deux sols. Leurs valeurs moyennes sont de l'ordre de 2 et 1 respectivement pour le sol rhizosphérique et non rhizosphérique du sol acide colluvial, et de 4 et 2 respectivement pour le sol rhizosphérique et non rhizosphérique de la rendzine. Par ailleurs, le maximum de pertes au cours de l'extraction se situe, pour les deux sols, dans la fraction alcalinosoluble. Il semblerait donc qu'il y ait des "natures" de matière organique différentes selon les sols et selon les compartiments rhizosphériques et non

rhizosphériques, et ce d'autant plus qu'il n'y a apparemment pas de corrélation entre les rendements d'extraction et les quantités de carbone présentes dans les fractions.

La méthodologie utilisée n'est donc sans doute pas tout à fait adaptée, et laisse une certaine inexactitude quant aux valeurs absolues des teneurs trouvées. Néanmoins, ces valeurs ont, dans les deux cas, une signification écologique, puisque POWELL *et al* (1980) estiment à $10^{-7}/10^{-8}$ M la quantité de sidérophores minimale dans les sols pour pallier des problèmes de chlorose pour un sol à 10% d'humidité (masse molaire du desféral = 656,7 g).

L'effet rhizosphérique n'est pas toujours très net, en particulier dans le cas des échantillons extraits aux solvants organiques, alors que des travaux antérieurs indiquent des différences beaucoup plus prononcées. L'hétérogénéité des échantillons prélevés dans un même site est sans doute aussi responsable de ces différences, au moins pour une part.

4.- Dosages d'autres types de sidérophores dans ces deux sols (rendzine et sol colluvial acide)

Dans la partie précédente de l'étude, seuls les hydroxamates utilisables comme facteur de croissance par la bactérie *Arthrobacter flavescens* JG9 ont été dosés. Même si PERRY *et al* (1984) considèrent que ces hydroxamates sont les sidérophores les plus répandus dans les sols, d'autres types d'hydroxamates sont aussi présents, tels que le ferrichrome A, non détectable par cette méhode, ainsi que des sidérophores de type phénolates et catécholates, qui ont été recherchés par des analyses chimiques. Les résultats des dosages des catécholates ne seront pas présentés, car des précipités se formaient dans de nombreux échantillons lors de l'addition du réactif nitrite-molybdate (ARNOW, 1937).

4.1.. Phénolates-catécholates

Les dosages des phénolates-catécholates ont été effectués dans les extraits hydrosolubles et acidosolubles, selon la méthode d'HATHWAY (1969). Les résultats sont reportés dans le tableau II.13. Toutes ces valeurs sont exprimées en équivalents d'acide 2,3 dihydroxybenzoïque, étant donné que les extractions obtenues correspondaient à ce composé et non pas à la gamme étalon de l'acide salicylique.

Les extraits hydrosolubles du sol acide contiennent, par rapport au poids de sol, plus de phénolates-catécholates que ceux de la rendzine. Cette tendance s'inverse pour les extraits acides. Un effet rhizosphérique très faible (R/S supérieur à 1) apparaît pour les phénolates-catécholates dans les extraits hydrosolubles de la rhizosphère de mercuriale en sol acide, et s'inverse pour ces mêmes extraits dans la rendzine (R/S inférieur à 1). Pour les extraits acides, les effets rhizosphériques s'inversent, avec un rapport inférieur à 1 dans le sol acide, et voisin de 1 dans la rendzine.

Tableau II.13.- Quantités de phénolates-catécholates dans les extraits hydrosolubles et acidosolubles de la rendzine et du sol colluvial acide.

	Extraits de sol			μg/mg de carbone
Randzina	Fraction hydrosoluble	Sol Rhizos. Sol non Rhizos. R/S	1,39 ± 0,48 1,83 ± 0,29 0,76	16,16 ± 6,20 16,05 ± 2,82 1,01
Rendzine	Fraction acidosoluble	Sol Rhizos. Sol non rhizos. R/S	$4,50 \pm 3,77$ $2,94 \pm 4,67$ 1,53	19,04 ± 5,46 10,50 ± 14,75 1,81
Sol acide	Fraction hydrosoluble	Sol Rhizos. Sol non Rhizos. R/S	3,39 ± 0,75 3,28 ± 0,75 1,03	25,90 ± 7,001 19,54 ± 3,42 1,33
ou acide	Fraction acidosoluble	Sol Rhizos. Sol non Rhizos. R/S	$2,25 \pm 0,35$ $3,83 \pm 0,24$ 0,59	$12,68 \pm 8,96 \\ 18,98 \pm 1,03 \\ 0,67$

Rapportés aux matières organiques de ces fractions, des effets rhizosphériques sont observés, sauf pour l'extrait acidosoluble du sol colluvial acide.

En totalité, les quantités de phénolates-catécholates ne sont pas très différentes dans les deux sols, puisque, exprimées par rapport aux taux de carbone des fractions, elles sont respectivement, pour les compartiments rhizosphériques et non rhizosphériques, de 38,58 et $38,52 \,\mu\text{g/mg}$ de carbone dans le sol acide, et de 35,2 et $26,55 \,\mu\text{g/mg}$ de carbone dans la rendzine.

Les tableaux II.14. et II.15. rassemblent les résultats obtenus pour les dosages de phénolates-catécholates dans les extraits hydrosolubles, acidosolubles et alcalinosolubles, après extraction organique pour le sol acide et le sol calcimagnésique.

Là encore, les valeurs trouvées après extraction sont inférieures à celles mesurées directement dans les extraits hydrosolubles et acidosolubles des sols. En général, les phénolates-catécholates sont plus abondants dans les extraits alcalinosolubles des deux sols. Mais, exprimées par rapport au taux de carbone des fractions, les teneurs sont plus fortes dans la rendzine pour les fractions hydrosolubles et acidosolubles. Il faut souligner que les quantités trouvées se réfèrent à l'acide 2,3 dihydroxybenzoïque utilisé comme étalon, et qu'il existe dans les sols, des composés autres que des sidérophores, qui peuvent être dosés par cette méthode.

Tableau II.14.- Quantités de phénolates-catécholates dosés dans les extraits hydrosolubles, acidosolubles et alcalinosolubles de la rendzine après extraction organique.

Extraits de sol		μg/g de sol	μg/mg de carbone	
Fraction hydrosoluble	Sol Rhizos. Sol non Rhizos. R/S	0,20 ± 0,35 0,56 ± 0,72 0,36	2,27 ± 3,93 5,27 ± 6,80 0,43	
Fraction acidosoluble	Sol Rhizos. Sol non rhizos. R/S	0.94 ± 1.28 4.17 ± 6.10 0.23	3,65 ± 3,85 1,19 ± 2,06 3,07	
Fraction alcalinosoluble	Sol Rhizos. Sol non Rhizos. R/S	5,42 ± 1,92 6,98 ± 1,39 0,78	0.78 ± 0.35 0.58 ± 0.27 1.34	

Tableau II.15. - Quantités de phénolates-catécholates dosés dans les extraits hydrosolubles, acidosolubles et alcalinosolubles du sol colluvial acide après extraction organique.

Extrait	s de sol	μg/g de sol	μg/mg de carbone
Fraction hydrosoluble	Sol Rhizos. Sol non Rhizos. R/S	0,51 ± 0,76 5,16 ± 8,53 0,10	4,00 ± 5,93 3,28 ± 3,87 1,22
Fraction acidosoluble	Sol Rhizos. Sol non rhizos. R/S	$0,28 \pm 0,28$ $8,25 \pm 6,34$ 0,03	2,21 ± 3,03 11,22± 8,37 0,20
Fraction alcalinosoluble	Sol Rhizos. Sol non Rhizos. R/S	$6,02 \pm 2,70$ $5,72 \pm 2,58$ 1,05	229,32 ± 237,97 228,06 ± 135,16 1,01

4.2. Mise en évidence de complexants à affinité élevée pour le fer (méthode au chromazurol) (SCHWYN, 1986)

Ce dosage permet, à l'aide d'un indicateur coloré (le chromazurol) complexant le fer, de mettre en évidence, par changement de coloration, la présence d'un complexant à plus forte affinité pour le fer, que le chromazurol. Dans ce cas, le complexe perd son fer et vire du bleu à l'orange. Cette méthode, qui donne de bons résultats avec les cultures de microorganismes sur milieu gélosé solide, n'a fournit, pour les extraits, que des résultats peu précis, ceci étant sans doute dû à l'état de complexe organo-ferrique d'une proportion importante des sidérophores extraits.

IV.- RELATIONS POSSIBLES ENTRE LES SIDEROPHORES ET LES MICROFLORES BACTERIENNES POTENTIELLEMENT PRODUCTRICES DE SIDEROPHORES DANS LA RENDZINE ET LE SOL COLLUVIAL ACIDE

Les bactéries dénombrées sur milieu King B (Pseudomonas fluorescents) ou sur gélose nutritive plus EDDHA aux plus fortes dilutions ont été repiquées sur milieu au chromazurol pour vérifier leur capacité à produire des sidérophores. Les résultats obtenus ont vérifié cette hypothèse. Même si les milieux utilisés ne concernent sans doute qu'une partie de la microflore bactérienne des sols considérés, et absolument pas la microflore fongique, nous avons établi les rapports entre les quantités de sidérophores en microgrammes par gramme de sol sur nombre de u.f.c. (unités formant une colonie) x 106 par gramme de sol. Les quantités de sidérophores utilisées pour calculer ce rapport sont les quantités totales d'hydroxamates dosées par la méthode biologique dans les échantillons de sol n'ayant pas subi d'extraction organique. Ils représentent donc la somme des hydroxamates dosés dans les fractions hydrosolubles, acidosolubles et alcalinosolubles pour chaque échantillon.

Le rapport n'a bien sûr qu'une valeur indicative et n'est utilisé que pour comparer les deux sols. Il ne correspond qu'à l'évaluation d'un indice de capacité potentielle des microflores à produire des sidérophores, sans attribuer, bien entendu, à la classe de bactéries dénombrées toute la production de sidérophores mesurée. De plus, les dosages de sidérophores ne donnent qu'une image de leur production globale dans les sols, qui ne tient pas compte de la biodégradation et de l'assimilation des sidérophores.

L'indice d'efficience ou de capacité potentielle des microflores à produire des sidérophores montre, pour la rendzine (Tableau II.16.) l'importance du groupe des bactéries isolées sur milieu complet contenant la plus forte concentration en EDDHA.

Tableau II.16.- Indices d'efficacité potentielle des différentes classes de microorganismes de la rendzine à produire des sidérophores.

	Bactéries	téries Pseudomonas es (NA) fluorescents (KB)	Bactéries productrices de sidérophores (Na + EDDHA)			
	totales (IVA)		1,08m M	2,13mM	4,11mM	9,24mM
Sol rhizosphérique	0,21	28,98	1,86	5,05	27,02	1063,42
Sol non rhizosphérique	0,69	16,03	4,28	14,07	95,91	1412,81
R/S	0,31	1,81	0,44	0,36	0,28	0,75

Le seul effet rhizosphérique observé pour cet indice concerne les *Pseudomonas fluorescens* isolés sur milieu King B (R/S = 1,8). Alors que toutes les autres valeurs du rapport R/S se situent aux environs de 0,3-0,4, celui des bactéries isolées à la plus forte concentration en EDDHA est de 0,75.

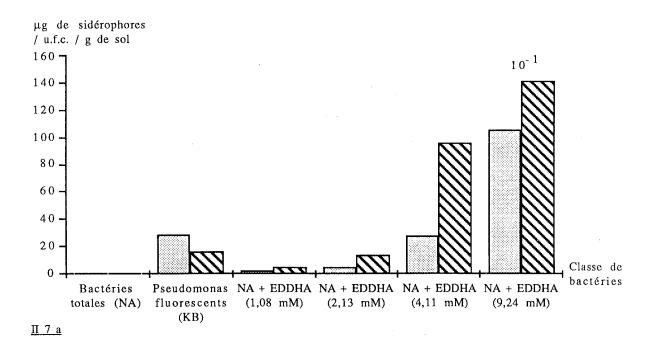
Pour le sol colluvial acide (Tableau II.17.), les écarts de cet indice entre les différentes populations de bactéries sont plus progressifs que dans le cas de la rendzine. Le rapport le plus élevé concerne encore les Pseudomonas fluorescents isolés sur milieu King B. En revanche, les effets rhizosphériques sur ces indices sont nettement plus faibles que pour la rendzine, puisqu'ils vont de 0,09 à 0,36. Quel que soit le groupe bactérien considéré (mise à part la microflore totale), le rapport R/S de cet indice pour la rendzine est toujours supérieur à celui du sol acide.

Tableau II.17.- Indices d'efficacité potentielle des différentes classes de microorganismes du sol colluvial acide à produire des sidérophores.

	Bactéries	Pseudomonas fluorescents (KB)	Bactéries productrices de sidérophores (Na+EDDHA)			
	totales (NA)		1,08m M	2,13mM	4,11mM	9,24mM
Sol rhizosphérique	4,92	296,26	24,49	39,49	130,63	854,17
Sol non rhizosphérique	13,51	3322,19	255,44	483,82	1650,85	2890,67
R/S	0,36	0,09	0,10	0,08	0,08	0,30

Les populations de *Pseudomonas fluorescens* non rhizosphériques du sol acide seraient donc plus efficaces à produire des sidérophores que ceux de la microflore rhizosphérique. Ce serait l'inverse pour la rendzine.

Cette même tendance est aussi observable (même si les rapports R/S sont inférieurs à 1) pour les microflores se développant dans les milieux à plus forte concentration en EDDHA. Les bactéries isolées à plus forte concentration en EDDHA et les *Pseudomonas fluorescens* sont donc les groupes les plus actifs pour respectivement le sol acide rhizosphérique et non rhizosphérique. Pour la rendzine, les *Pseudomonas fluorescens* rhizosphériques seraient relativement plus efficaces à produire des sidérophores que les *Pseudomemas fluorescens* non rhizosphériques (Figure II.7.). Dans ce sol, ce serait, d'un point de vue quantitatif, les microorganismes se développant sur EDDHA aux plus fortes concentrations, qui seraient les plus efficaces. Il serait donc intéressant d'identifier ces bactéries, capables de croître sur les milieux contenant ces fortes quantités d'EDDHA, et de définir leur capacité à produire des sidérophores.



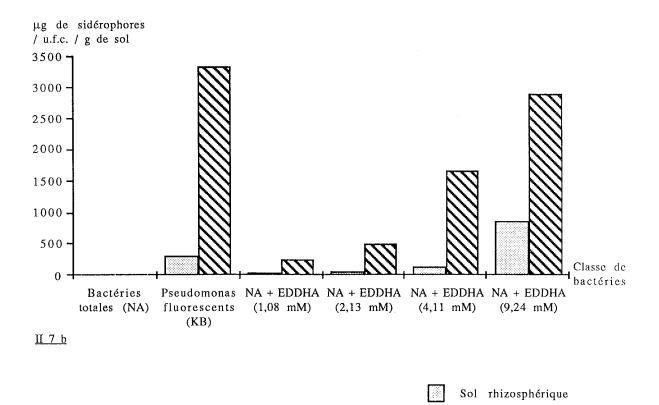


Figure II 7: Rapport de capacité potentielle des microorganismes à produire des sidérophores dans les sols rhizosphériques et non rhizosphériques de la Rendzine (II 7 a) et du sol acide colluvial (II 7 b).

Sol non rhizsophérique

Par ailleurs, tous ces effets rhizosphériques inférieurs à un laissent supposer que les bactéries éloignées de la rhizosphère doivent être plus compétitives que les bactéries rhizosphériques bénéficiant des substrats énergétiques des exsudats racinaires. L'effet rhizosphérique trouvé pour les *Pseudomonas fluorescens* de la rendzine souligne le rôle possible en tant que "PGPR" (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) de ces bactéries, ainsi que leur action potentielle au niveau de la biodisponibilité du fer.

V.- LES SIDEROPHORES DANS D'AUTRES SOLS ACIDES ET CALCIMAGNESIQUES

Les analyses de sidérophores dans les sols ont été effectués dans d'autres sites où se développent d'autres plantes bimodales comme le pin, le pin noir (*Pinus nigra*) et le pin sylvestre (*Pinus sylvestris*). Les sites retenus sont les suivants :

- Pin noir sur le sol brun calcique du Thélod (Meurthe-et-Moselle)
- Pin sylvestre sur le sol brun ocreux du site des Trois-Epis (Vosges)
- Pin sylvestre sur sol brun acide du Col du Haut-Jacques (Vosges)
- Pin sylvestre sur sol brun calcique (Epiez, Meuse).

Pour ces prélèvements, effectués dans l'horizon superficiel, seules les microflores bactériennes totales ont été dénombrées sur milieu gélosé nutritif (Nutrient Agar, Difco). Le dosage des sidérophores s'est fait comme précédemment, par le test biologique utilisant *Arthrobacter flavescens* JG9, sur les extraits hydrosolubles et acidosolubles de ces sols, après extraction organique à l'alcool benzylique. Le tableau II.18. rassemble les résultats obtenus pour les échantillons rhizosphériques et qui représentent la moyenne de deux répétitions par traitement.

Tableau II.18.- pH, microflore totale (u.f.c./g de sol) et quantités de sidérophores (équivalent DFOB) en μ g/g de sol dans les extraits hydrosolubles et acidosolubles des sols après extraction à l'alcool benzylique.

		Pin noir		
	Sol brun ocreux	Sol brun acide	Sol brun calcique	Sol brun calcique
pH-eau	3,5	3,7	6,6	6,9
u.f.c./g de sol	106	10 ⁵	105	3 10 ⁵
μg de sidérophores/g de sol dans les extraits aqueux	0,25	non dosé	0,19	1,8
μg de sidérophores/g de sol dans les extraits acides	0,03	0,03	1,8	2,6

Tout d'abord, des sidérophores décelables par *Arthrobacter flavescens* JG9 sont présents dans les extraits aqueux au pH du sol, en fait dans les solutions du sol, et dans les extraits acides des sols rhizosphériques du pin de ces quatre sols (deux calcimagnésiques et deux acides) prélevés en juin 1987. Les quantités présentes sont du même ordre que celles trouvées précédemment pour la rhizosphère de mercuriale.

La rhizosphère de plantes ectomycorhizées, comme le pin, contient donc des sidérophores d'origine microbienne, qui sont présents en quantité suffisante pour intervenir dans la mobilisation et la biodisponibilité du fer.

VI.- DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE

La recherche des sidérophores dans les sols montre que les sidérophores de type hydroxamate, mais aussi de type phénolate, sont présents, dans les sols acides et les sols calcimagnésiques, dans les principaux compartiments plus ou moins labiles et mobiles des matières organiques de ces sols. Ils ont, en effet, été observés en quantités significatives dans la fraction hydrosoluble au pH du sol, la fraction soluble en milieu acide (fraction fulvique) et la fraction alcalinosoluble (composés humiques et fulviques sensu lato).

Les quantités, d'après l'hypothèse de POWELL *et al* (1980), seraient suffisantes pour pallier significativement les problèmes de chlorose. Ils considèrent, en effet, que des concentrations de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-8} M/g de sol sont suffisantes dans un sol à 10 % d'humidité.

Quantitativement, une grande partie des sidérophores est associée aux composés humiques, donc relativement peu mobile, et sans doute peu labile. Mais dans ce compartiment, les teneurs relatives en matières organiques sont beaucoup plus faibles que celles observées dans la fraction hydrosoluble au pH du sol et dans la fraction acidosoluble. Les teneurs en sidérophores sont, par rapport aux matières organiques de ces fractions, relativement importantes dans la fraction hydrosoluble, au pH du sol, et acidosoluble, respectivement pour le sol colluvial acide et la rendzine. Les sidérophores de ces fractions présentent, en raison de leur mobilité sans doute, un intérêt fonctionnel important, et représentent donc un pool facilement assimilable et/ou efficace pour mobiliser le fer.

Ces teneurs sont sous-estimées dans la mesure où les méthodes utilisées sont plus ou moins spécifiques et ne couvrent pas tout le spectre des sidérophores présents dans les sols. Ce sont essentiellement certains hydroxamates favorisant la croissance d'une bactérie-test, *Arthrobacter fluorescens* JG9, et des composés de type phénolate, qui sont décelés. Des études complémentaires permettraient, en améliorant les méthodes d'extraction et en utilisant une gamme plus large de moyens d'analyse, d'approcher plus précisément l'ensemble des sidérophores.

Les résultats obtenus ne permettent pas de constater une corrélation entre les quantités de sidérophores extraits et les teneurs en matière organique des sols, comme l'ont observé POWELL et al. (1980). Mais ces résultats montrent l'importance du compartiment humique sensu lato pour le stockage des sidérophores, aussi bien en milieu calcimagnésique qu'en milieu acide. Une éventuelle fixation sur les argiles, comme le suggère POWELL (1982), n'a pas été vérifiée dans ce travail, mais, comme nous le verrons par la suite, les sidérophores peuvent aussi se fixer sur les oxyhydroxydes de fer. Une étude pourrait être envisagée, en fonction des charges neutres, alcalines et acides des sidérophores, afin de corréler le type de charge des sidérophores à leur potentialité de rétention par les colloïdes des sols, comme le suggère AKERS (1981). Cette notion de charge est importante car elle influe sur la mobilité des chélates dans le sol et donc aussi sur leur biodisponibilité. Ainsi, la mobilité sera meilleure pour le ferrichrome ferrifié neutre que pour le complexe fer-desféral chargé positivement, ces deux chélates étant testés à molarité identique (REID et al, sous presse). Cette mobilité dépendra aussi du pH et de la composition des solutions du sol.

La quantité des sidérophores dans les sols sont liées d'une part à l'activité des microflores productrices et, d'autre part, à l'activité des microflores biodégradant ces composés. Seules certaines catégories de bactéries potentiellement productrices ont été étudiées. Des populations abondantes de *Pseudomonas fluorescens*, reconnus comme organismes producteurs de sidérophores, et des populations significatives de bactéries croissant dans les milieux relativement carencés en fer, ont été observées dans des sols acides et calcimagnésiques et dans la rhizosphère de plantes bimodales se développant sur ces deux sols.

Des effets rhizosphériques concernant ces populations sont observés dans le sol colluvial acide. Toutefois, l'indice dit de "potentialité" de ces microflores à produire des sidérophores montre que les sols non rhizosphériques, sauf dans le cas des *Pseudomonas fluorescens* pour le sol calcimagnésique, favoriseraient la capacité des microflores à produire des sidérophores, ceci étant sans doute dû aux conditions nutritionnelles plus difficiles des sols non rhizosphériques par rapport aux sols rhizosphériques.

Ces études pourraient être complétées d'abord par des mesures de capacité de production, d'adsorption et de biodégradation des sidérophores par les microflores telluriques. Ensuite, la capacité des plantes à utiliser ces sidérophores ou ce fer mobilisé par les microflores devrait être étudiée en cherchant à déterminer d'éventuelles spécificités dans ces interactions. Ces recherches complémentaires pourraient répondre à diverses questions : quel est vraiment la capacité des microflores du sol, et en particulier des microflores rhizosphériques, à mobiliser le fer et à favoriser sa biodisponibilité pour les plantes ? Les sidérophores immobilisés dans certains compartiments peuvent-ils être réutilisés par les organismes ? Les microflores rhizosphériques modifient-elles fondamentalement les stratégies de mobilisation du fer des plantes ?

Il serait également intéressant d'une part d'exprimer les résultats des dosages des sidérophores en fonction de la densité racinaire des plantes étudiées, ce qui permettrait de comparer entre elles des plantes différentes et complèterait l'étude du rôle des microorganismes sur la mobilité des sidérophores dans les zones de déplétion de la rhizosphère.

Un dernier aspect, sans doute important dans cette étude des sidérophores dans les sols, est lié à la définition des sources minérales de fer, et à leur altérabilité et dissolution, en particulier sous l'influence des sidérophores d'origine microbienne. C'est ce dernier aspect que nous allons maintenant aborder en étudiant la dissolution et l'altération d'oxyhydroxydes de fer sous l'influence de sidérophores d'origine fongique.

TROISIEME PARTIE

ALTERATION D'OXYHYDROXYDES DE FER (goethite) ET DE SILICATE FERROMAGNESIEN (biotite) PAR DES CHAMPIGNONS PRODUISANT DES SIDEROPHORES

ALTERATION D'OXYHYDROXYDES DE FER (goethite) ET DE SILICATES FERROMAGNESIENS (biotite) PAR DES CHAMPIGNONS PRODUISANT DES SIDEROPHORES

I.- INTRODUCTION

Les composés organiques acides et/ou complexants, d'origine végétale ou microbienne, présents dans les sols (BRUCKERT, 1970; STEVENSON et ARDAKANI, 1972), sont des agents efficaces de dissolution et d'altération de divers minéraux (silicates, phosphates, carbonates, oxydes) (BERTHELIN, 1977, 1983, 1988; ROBERT et al., 1979; ROBERT et BERTHELIN, 1986). Mais ces acides aliphatiques et aromatiques peuvent être considérés comme des ligands (ou anions complexants) non spécifiques visà-vis de la complexation et du transport des ions métalliques, alors que des sidérophores comme les composés trihydroxamiques ou tridiorthophénoliques doivent être considérés comme des agents spécifiques de la complexation et du transport du fer ferrique. Peu de travaux, comme ceux de CLINE et al. (1983) concernent la complexation comparée du fer et d'autres ions du sol, par des acides hydroxamiques et aliphatiques. Mais aucune recherche ne concerne la dissolution de minéraux par les sidérophores sensu stricto, alors que ces composés, étant donnée leur spécificité, peuvent sans doute jouer un rôle important dans la dissolution du fer, et en particulier du fer sous forme ferrique, de minéraux du sol et sur sa biodisponibilité pour les microorganismes et les plantes.

C'est pourquoi nous avons effectué, sous diverses conditions de milieu, des études *in vitro* pour observer et déterminer le rôle des microorganismes producteurs de sidérophores dans la dissolution de minéraux, source de fer habituelle dans les sols, d'une part un oxyhydroxyde ferrique (la goethite), et d'autre part un phyllosilicate ferromagnésien (la biotite).

II.- ALTERATION D'UN OXYHYDROXYDE DE FER (la goethite) PAR DES CHAMPIGNONS ECTOMYCORHIZOGENES ET NON MYCORHIZOGENES PRODUISANT DES SIDEROPHORES

Principe: Après sélection des souches fongiques mycorhizogènes, ces champignons ont été cultivés dans divers milieux liquides en présence d'oxyhydroxydes. L'altération du minéral a été suivie par la mesure de la solubilisation des éléments minéraux dans le milieu et par celle de leur accumulation par les microorganismes. Des études complémentaires portaient sur la caractérisation des minéraux résiduels. Enfin, les mécanismes d'altération mis en jeu ont été essentiellement étudiés par l'analyse des produits organiques en solution. Un champignon témoin produisant des sidérophores (ferrichrome et ferrichrome A) a permis des comparaisons avec les champignons mycorhizogènes.

A.- MATERIEL ET METHODES

Un oxyhydroxyde de fer ferrique (la goethite), parfaitement défini et choisi ici comme source de fer insoluble, non biodisponible et représentatif des formes du fer ferrique communément répandues dans de très nombreux sols, a été placé dans divers milieux nutritifs carencés en fer, en présence des microorganismes étudiés. Pour éviter la contamination des microorganismes par des particules de fer, la goethite a été placée dans des sacs à dialyse. Les cultures sont faites en flacons plasma de 250 ml, dans 120 ml de milieu. Les flacons ont été préalablement rincés à l'acide pour éliminer les traces de fer résiduel.

1.- Le minéral : la goethite

La goethite, choisie comme minéral représentatif des formes du fer ferrique dans les sols, a été synthétisée selon la méthode d'ATKINSON (1988), qui conduit à un minéral parfaitement défini et calibré. Pour cette préparation, effectuée à 21 °C, 20,2 g de Fe(NO₃)₃ 9H₂O sont dissous dans 80 ml d'eau, auxquels on ajoute 20 ml de soude 2,5 M. Après un repos de 50 heures à 21 °C, 80 ml de soude 2,5 M préchauffés à 45 °C sont ajoutés et la solution est placée à l'étuve à 62 °C \pm 3 °C pendant trois à quatre jours, en l'agitant trois à quatre fois par jour. Les manipulations se font dans de la vaisselle en matière plastique, afin d'éviter toute contamination par de la silice, qui empêcherait la cristallisation de la goethite.

Cette goethite est consitutée de cristaux de 0,01 à 0,03 μ m d'épaisseur et de 0,1 à 0,4 μ m de longueur. Elle a été calibrée comme étant inférieure à 0,2 μ m. La surface spécifique est de 78 m²/g.

Le diffractogramme de Rayons X permet de vérifier les propriétés et la qualité de cet oxyhydroxyde (Figure III.1). Cette goethite est donc parfaitement cristallisée. C'est là, comme le signalent MILLER *et al.* (1986) un paramètre important pour étudier la dissolution de ce minéral qui, sous forme bien cristallisée, est peu sensible aux acides complexants comme les acides oxalique ou citrique. Il y a lieu de signaler que ce fer ferrique est peu soluble, et donc peu biodisponible, puisque les produits de solubilité de l'hydroxyde ferrique Fe(OH)₃, nettement plus soluble que la goethite (αFeOOH), sont comprises entre 10-35 et 10-38.

2.- Choix du champignon ectomycorhizien

Le choix de microorganismes à étudier s'est porté sur les champignons ectomycorhiziens, parce qu'ils sont, à la différence des champignons endomycorhiziens, cultivables in vitro en culture pure, et que certains d'entre eux ont été reconnus producteurs de sidérophores (SZANISLO *et al.*, 1981).

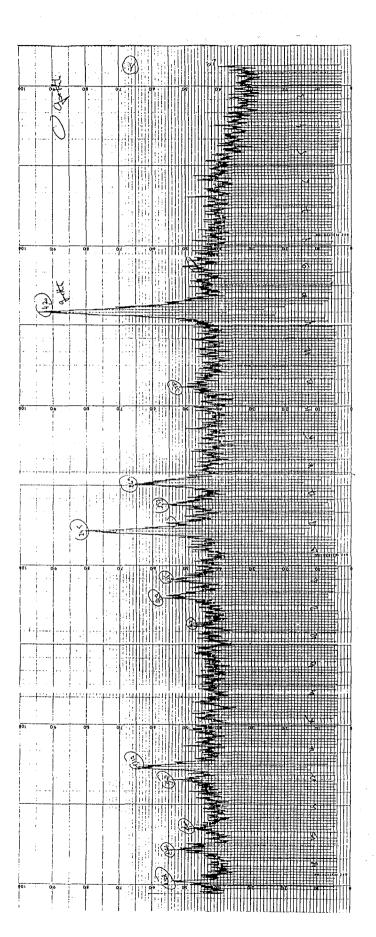


Figure III 1: Diffractogramme Rayons X de la goethite

Par ailleurs, l'action du champignon ectomycorhizien sélectionné sera comparée à celle d'un autre champignon non mycorhizien, *Ustilago sphaerogena*, producteur de sidérophores.

Pour le choix du champignon modèle, différentes expériences préliminaires, dont les principaux résultats sont présentés ci-dessous, ont été effectuées.

2.1. Origine des souches étudiées

Les souches, qui proviennent du Laboratoire de Microbiologie des Sols Forestiers de l'I.N.R.A. (Nancy-Champenoux), sont présentées dans le Tableau III.1.

Tableau III.1.- Caractéristiques des différentes souches ectomycorhiziennes testées.

Champignons mycorrhiziens	Année d'isolement	Type de sol du prélèvement	Plante-hôte	Localisation
Hebeloma crustiliniforme (DOM)	Octobre 1982	Rendzine	Pin sylvestre	Toul (54)
Hebeloma crustiliniforme (STH)	Octobre 1979	Sol limoneux hydromorphe	Feuillus	Basses-Vosges
Hebeloma crustiliniforme (SIV)	1974	Sol brun calcique	Epicea	Forêt de Haye (54)
Suillus granulatus (DOM)	1982	Rendzine	Pin sylvestre	Toul (54)
Suillus granulatus (FROI)	1982	Sol acide de montagne	Epicea	Froide Vaux (Suisse)
Paxillus involutus (MAI)	1980	Sol alluvial argilo-calcaire	Peuplier	Marais poitevin
Paxillus involutus (Q3C)	1980	Podzol tourbeux	Epicea	Québec (Canada)
Tricholoma albobrunneum	1980	Pelouse calcaire	Pin noir	Québec (Canada)

2.2. Influence de la carence en fer du milieu sur la croissance des champignons ectomycorhiziens

Deux expériences ont été effectuées. Dans la première, les champignons sont cultivés sur agitateur rotatif (120 t/min) en flacon sérum de 250 ml, dans 120 ml de milieu nutritif, dit milieu de PACHLEWSKY (Pa), utilisé pour la culture de champignons ectomycorhiziens, dont la composition, rappelée en Annexe XIII, est la suivante : MgSO₄ 7H₂O (0,5 g/l), KH₂PO₄ (1 g/l), tartrate d'ammonium (0,5 g/l), thiamine (5 μg/l), glucose (20 g/l), maltose (5 g/l), pH final 6-6,5.

Deux traitements sont effectués, à raison de trois répétitions par traitement : le milieu est carencé en fer ou contient 3,25 mg de chlorure ferrique par flacon de culture. Chaque flacon reçoit cinq implants identiques découpés sur milieu gélosé et débarrassés du maximum possible de gélose, afin d'éviter des apports de fer. Les résultats concernant la croissance et l'aspect du mycélium sont rassemblés dans le Tableau III.2.

Tableau III.2.- Différences de croissance observées pour les souches ectomycorhiziennes cultivées sur milieu carencé et non carencé en fer.

Souches	Observations effectuees sur la croissance apres deux mois d'incubation
Hebeloma crustiliniforme (DOM)	Pas de différence de croissance. Biomasse assez faible. Croissance lente
Hebeloma crustiliniforme (SIV)	Pas de différence de croissance. Biomasse assez faible. Croissance lente
Suillus granulatus (DOM)	Pas de croissance dans les milieux carencés
Suillus granulatus (FROI)	Croissance dans les deux traitements, mais individualisation de petites boulettes de mycélium nettement plus marquée dans le cas des échantillons carencés
Paxillus involutus (MAI)	Croissance moins importante dans les échantillons carencés et pigmentation variable du champignon dans ces mêmes échantillons
Paxillus involutus (Q3C)	Pas de croissance pour 75 % des échantillons carencés et différence de pigmentation par rapport aux témoins non carencés
Tricholoma albobrunneum	Croissance très faible observée dans les échantillons carencés par rapport aux témoins

Les champignons se comportent différemment selon la souche testée. L'absence de différence de croissance entre les deux traitements peut s'expliquer par l'existence de traces de fer dans l'inoculum, suffisantes pour couvrir les besoins du champignon.

Sous l'effet de l'agitation, les cultures fongiques peuvent ne pas se développer uniformément autour de l'implant, mais se diviser en petites boulettes de mycélium. Dans le cas de *Suillus granulatus* (FROI), cette division en boulettes de mycélium est plus marquée dans les milieux carencés en fer. *Tricholoma albobruneum* semble le plus affecté par la carence en fer.

Dans la seconde expérience, les champignons sont cultivés sur milieu Pa gélosé (20 ml de milieu par boîte de Pétri), carencé en fer, auquel sont ajoutées différentes quantités d'EDDHA, afin de chélater le fer présent en traces dans le milieu. La croissance maximale est atteinte après quatre semaines de culture. Le Tableau III.3. résume les résultats concernant les croissances comparées de ces champignons, qui correspondent au diamètre moyen, en centimètres, de trois cultures par souche considérée.

Comme les inoculums ont initialement 0,75 cm de diamètre, on constate qu'à la plus forte concentration en EDDHA, aucune souche ectomycorhizienne ne s'est développée sur ce milieu gélosé, ou que les mycéliums ne se développent que sur l'implant de l'inoculum. Dans certains cas, comme pour *Paxillus involutus* (MAI), le champignon ne croît même pas sur l'implant, ce qui laisse supposer une certaine toxicité de l'EDDHA, qui diffuserait à travers la gélose jusqu'à l'inoculum. Cette éventuelle toxicité de l'EDDHA aurait pu être vérifiée en ajoutant du chlorure ferrique dans le milieu, afin de pallier la carence en fer due à l'EDDHA.

Pour certaines souches, notées avec un astérisque (*) dans le Tableau III.3., le mycélium fongique, différent du témoin, possède des hyphes beaucoup plus fines et moins denses. Avec *Suillus granulatus* (FROI), la coloration de la gélose disparaît lorsque la quantité en EDDHA augmente. Les souches de Paxillus paraissent plus sensibles que les autres souches à la présence de EDDHA,

mais tous les champignons sont inhibés pour les fortes teneurs, soit complètement, comme les souches de *Paxillus* et d'*Hebeloma* (STH), soit partiellement, avec modification morphologique des filaments, comme les souches de *Boletus* et d'*Hebeloma* (SIV).

Tableau III.3.- Croissance de champignons ectomycorhiziens en conditions de carence en fer : diamètre moyen en cm des colonies de champignons après quatre semaines de culture des différentes souches ectomycorhiziennes.

	Quantité d'EDDHA/boîtes (mg)								
	0	0,1	0,25	0,5	0,75	1			
Hebeloma crustiliniforme STH	1,75	1,75	1,75	1,75	1,3	0,75			
Hebeloma crustiliniforme SIV	2	2	2	2	1,5*	1*			
Suillus granulatus DOM	2	2	2	2	1*	0,75			
Suillus granulatus FROI	3,5	3,5	3,5	3,5	1,5*	0,75			
Paxillus involutus MAI	2,5	2	0,75	0,75	0,75	0,75			
Paxillus involutus Q3C	1,5	1,5	1,5	0,75	0,75	0,75			

^(*) Aspect des hyphes modifiées.

2.3. Production de sidérophores par les souches ectomycorhiziennes testées

Les champignons sont cultivés sur agitateur rotatif en milieu nutritif liquide de Pachlewsky carencé en fer. Les prélèvements effectués en cours de culture sont filtrés à 0,2 µm et les sidérophores sont détectés par le test biologique utilisant la bactérie *Arthrobacter flavescens* JG9. Toutes les souches donnent une réponse positive à ce test, et ce à différents temps d'incubation.

Un autre essai qualitatif de recherche des sidérophores, effectué en disposant des cubes gélosés de culture fongique, carencée ou non en fer, sur un milieu chromazurol (cf. Première Partie "Méthodologie des sidérophores"), conduisait à la mise en évidence d'une décoloration du milieu chromazurol pour toutes les cultures, carencées ou non en fer. La forte concentration d'acides organiques accumulés dans ces fragments de gélose pourrait être aussi responsable, au moins en partie, de ces décolorations.

2.4. Capacité des champignons ectomycorhiziens à solubiliser la goethite

Les champignons sont cultivés en flacon sérum de 250 ml dans 120 ml de milieu nutritif de Pachlesky carencé en fer. La moitié des flacons reçoit un sachet à dialyse (Visking, diamètre des pores : 2,4 nm) contenant 100 mg de goethite de synthèse. Quatre prélèvements sont effectués au cours d'un mois de culture, pour mesurer le fer soluble (Tableau III.4.)

Tableau III.4.- Quantités (μg/flacon) de fer solubilisées dans le milieu et immobilisées dans la biomasse en fin de culture, pH des milieux et croissance (biomasse en g de matière sèche par flacon) pour différentes souches ectomycorhiziennes. Les valeurs reportées sont les valeurs auxquelles ont été retranchées les valeurs des témoins (goethite seule dans le milieu).

	Temps des incubations en jours									
	7		14		21				28	
Souches	Fer solubilisé	pН	Fer solubilisé	pН	Fer solubilisé	pН	Fer solubilisé	рН	Biomasse	Fer immobilisé
Hebeloma crustiliniforme (STH)	4,92	5,1	4,84	4,7	2,9	3,6	7,65	3,8	0,29	27,3
Hebeloma crustiliniforme (SIV)	3,96	4,8	8,36	4,5	1,9	4	2,97	. 3,9	0,36	15,5
Suillus granulatus (DOM)	3,36	5,2	3,52	5,2	0,7	5,2	1,98	4,9	0,15	17,3
Suillus granulatus (FROI)	19,2	4	. 44	3,6	24,9	3,6	nd	nđ	0,36	41,8
Paxillus involutus (MAI)	4,68	5,1	4,84	4,2	5,2	3,1	10,89	3,8	0,25	11,8
Paxillus involutus (Q3C)	3,72	5,2	3,63	4,8	9,3	4,5	4,23	4,2	0,30	10,8

On constate que, même si les quantités sont faibles, les champignons ectomycorhiziens solubilisent dans le milieu et immobilisent dans leurs cellules des quantités significatives de fer. Solubilisation et immobilisation sont sans doute à associer aux faibles croissances obtenues dans cette expérience. Les cinétiques de dissolution ne sont pas identiques pour tous les champignons. Les solubilisations les plus fortes sont souvent observées après 14 jours de culture, mais pour certains, elles n'apparaissent qu'après des temps plus longs, de 21 ou 28 jours. L'évolution des pH révèle une acidification du milieu, qui est significative de la production de métabolites acides par les champignons. La solubilisation et l'immobilisation les plus importantes sont obtenues avec la souche de *Suillus granulatus* (FROI), qui sera retenue pour des expériences ultérieures.

2.5. Capacité des souches ectomycorhiziennes à croître sur un autre milieu de culture

Dans les études plus détaillées de solubilisation de la goethite qui vont suivre, le champignon basidiomycète retenu sera comparé à un champignon unicellulaire, *Ustilago sphaerogena*, connu pour sa production de deux sidérophores, le ferrichrome et le ferrichrome A, de type trihydroxamate. Comme *Ustilago sphaerogena* est cultivé sur un milieu nutritif particulier, des expériences comparatives ont été effectuées afin de vérifier si les champignons ectomycorhiziens se développaient bien sur ce milieu de culture, dont la composition, rappelée en Annexe XIII, est la suivante : K₂SO₄ (0,1 g/l), K₂HPO₄ (4 g/l), acétate d'ammonium (0,3 g/l), acide citrique (0,115 g/l), thiamine (0,2 μg/l), MgSO₄, 7H₂O (800 mg/l), saccharose (20 g/l), 10 ml l d'une solution métallique (0,197 mg CuSO₄; 1,08 mg MnSO₄, H₂O; 88,3 mg ZnSO₄, 7H₂O dans 100 ml d'eau). Le pH est ajusté à 6,8 avec de l'ammoniaque.

Les champignons ectomycorhiziens sont mis en incubation trois semaines dans le milieu de culture de Pachlewsky (Pa) et le milieu pour *Ustilago sphaerogena* (Us).

La croissance des souches de *Paxillus* est nettement plus faible dans le milieu Us. L'*Hebeloma crustiliniforme* ne pousse pas dans le milieu Us, pas plus que la souche de *Suillus granulatus* (DOM). *Suillus granulatus* (FROI) croît de la même façon dans les deux milieux. La croissance de *Tricholoma albobruneum* est très lente et ne fait que débuter dans les deux milieux après trois semaines d'incubation.

Toutes ces expériences préliminaires n'étaient destinées qu'à sélectionner des souches de champignons ectomycorhizogènes pour des expériences de dissolution de la goethite et de croissance en milieu carencé en fer. Elles n'avaient pas pour but de déterminer l'influence de la carence en fer sur le métabolisme et/ou la morphologie, qui peuvent être profondément affectés, comme le montrent déjà certains résultats.

Les expériences nous ont conduit à choisir *Suillus granulatus* (FROI), premièrement pour sa capacité à croître rapidement sur les deux milieux de culture adoptés, deuxièmement pour son adaptation à des milieux carencés en fer et, troisièmement pour sa relative bonne résistance aux chélateurs du fer, qui peuvent exercer une certaine toxicité. Le choix d'une seule souche de champignon ectomycorhizien pour ces expériences d'altération de goethite et de biotite ne doit pas dissimuler que les autres souches peuvent, par exemple comme la seconde souche de *Suillus granulatus* (FROI), isolée d'une rendzine, présenter des caractères intéressants d'un point de vue métabolique et écologique. L'étude de ces souches pourrait être reprise ultérieurement pour préciser leur métabolisme en fonction de leur origine (sols et plantes-hôtes).

Le choix de *Suillus granulatus* (FROI), comme champignon ectomycorhizien capable de dissoudre la goethite, à comparer avec un champignon non mycorhizien, a pu être confirmé par les résultats d'une expérience préliminaire, qui montre que dans leur milieu respectif, *Ustilago sphaerogena* et *Suillus granulatus* peuvent dissoudre des quantités significatives de fer de cet oxyhydroxyde bien cristallisé.

En effet, au cours de culture agitée dans 120 ml de milieu nutritif (milieu Pa pour *Suillus granulatus* et milieu Us pour *Ustilago sphaerogena*), en présence de 100 mg de goethite, ces champignons solubilisent 0,88 μg de fer par mg de matière sèche, après 50 jours de culture pour *Ustilago sphaerogena*, et 0,24 μg de fer par mg de matière sèche, après 44 jours de culture pour *Suillus granulatus*. Dans les témoins sans champignon, les solubilisations de la goethite sont négligeables : 30 ppb pour le milieu Pa et 20 ppb pour le milieu Us.

B.- SOLUBILISATION - ALTERATION DE LA GOETHITE PAR USTILAGO SPHAEROGENA ET SUILLUS GRANULATUS (FROI)

1.- Protocole expérimental et analyses

Les expériences sont conduites dans des dispositifs d'incubation en cuves, semblables à ceux cités précédemment. Des flacons plasma de 250 ml, bouchés au coton et contenant 120 ml de milieu, sont stérilisés par autoclavage 30 minutes à 120°C. La moitié des flacons reçoit 100 mg de goethite de synthèse (ATKINSON, 1988) placés dans un sachet à dialyse (Tube Visking, pore de 2,4 nm) préalablement stérilisé deux fois 30 mn à 120°C, à 12 heures d'intervalle dans de l'eau distillée. Les flacons d'incubation sont ensemencés par les champignons *Suillus granulatus* et *Ustilago sphaerogena* dans les milieux de Pachlewski (désigné par Pa) et du champignon *Ustilago sphaerogena* (désigné par Us) carencé en fer et précédemment décrits (cf. Annexe XIII), et dont les pH sont ajustés à 6,5. Les flacons de culture ont été préalablement lavés à l'acide chlorhydrique 6N et rincés à l'eau distillée pour éliminer le fer. Les cultures sont conduites à 28°C pour *Ustilago sphaerogena*, et à 24°C pour *Suillus granulatus*, à l'obscurité, sur un agitateur rotatif (120 t/mn). Les récoltes sont effectuées après 6, 12, 18 et 22 jours pour *Ustilago sphaerogena*, et après 7, 14, 21 et 32 jours pour *Suillus granulatus*. Chaque récolte comporte trois répétitions et deux types de traitements : culture avec et sans goethite. Un témoin (goethite seule, incubée sans champignon) est effectué pour chaque milieu de culture. Les données seront traitées statistiquement par le test t de Student.

A chaque récolte, la biomasse fongique est séparée du milieu de culture par centrifugation (1200 t/mn pendant 15 mn) et prélevée après rinçage à l'eau distillée. Après séchage, cette biomasse est pesée, puis minéralisée selon la méthode de CLEMENT (1977) (Annexe II) pour analyse des éléments minéraux bioaccumulés. Le pH du surnageant du milieu est mesuré au pHmètre Tacussel PHN78. Les teneurs en fer et autres éléments minéraux tels que P, Mg, Mn, Si, Al en solution et dans les minéralisats de la biomasse fongique sont évaluées par spectrométrie d'émission (ICP, Jobin-Yvon). Le dosage des sucres, selon la méthode au phénol de DUBOIS (1956), et le dosage des diphénols selon la méthode de FOLIN-DENIS (1912) effectués dans les milieux, sont décrits en annexes III et IV. L'acidité libre des surnageants est déterminée par titrimétrie automatique (pHmillivoltmètre Grion 901 digital associé à un Apple IIE) à la soude 0,02N et 0,1N en titrant du pH du surnageant à pH 9,5 (BRUNELOT et al., 1989). La détermination des acides organiques par chromatograhie liquide à haute performance (HPLC) et les dosages enzymatiques du glucose et des acides citrique et malique à l'aide des tests Boehringer Mannheim GMBH sont décrits en annexes V et VI. L'analyse qualitative des hydroxamates par la méthode de CSAKY (1969), le dosage des phénolates selon la méthode d'HATHWAY (1969) et celui des sidérophores par le test biologique utilisant la bactérie Arthrobacter flavescens JG9 sont décrits dans la première partie (Méthodologie des Sidérophores).

2.- Dissolution et bioaccumulation du fer de la goethite

2.1. Par Ustilago sphaerogena

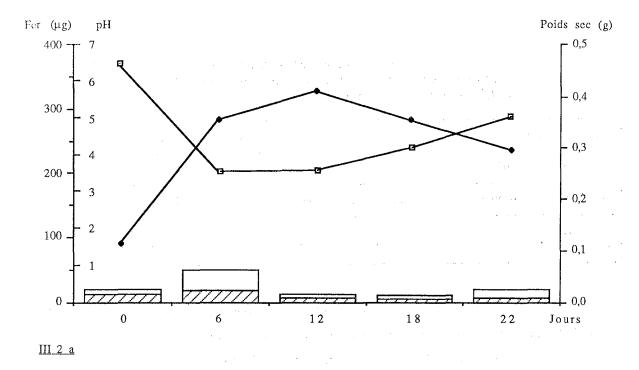
La figure III.2. représente, en fonction du temps, les quantités de fer solubilisé dans le milieu et immobilisé par les cellules *d'Ustilago sphaerogena* choisi comme champignon de référence producteur de sidérophores (ferrichrome et ferrichrome A), incubé dans le milieu Us. La faible dissolution de la goethite par simple action chimique du milieu (20 ppb tout au long de l'expérience) a été retranchée à toutes les valeurs. Les tableaux rassemblant les données de la figure III.2. ainsi que leurs intervalles de confiance se trouvent en Annexe VII.

Dans le milieu de culture Us, les quantités de fer solubilisé et immobilisé par le champignon dans les incubations sans goethite restent, bien sûr, très faibles (Figure III.2a). Celles observées dans les cultures du champignon en présence de goethite sont importantes (Figure III.2b) : 200,5 µg de fer soluble dans le milieu sont dosés par flacon de culture après 12 jours d'incubation. Cette dissolution augmente dans le milieu jusqu'au douzième jour, puis décroît significativement jusqu'au vingt-deuxième jour. En effet, les différences par rapport aux témoins sans goethite sont significatives à 6 jours et hautement significatives à 12 et 18 jours de culture. Pour le fer immobilisé par les cellules fongiques, on observe une cinétique tout à fait différente, avec un accroissement des quantités de fer immobilisé du début à la fin de la culture du champignon, malgré une diminution de la biomasse en fin de culture. Par rapport aux témoins, cette bioaccumulation est hautement significative après 12, 18 et 22 jours de culture.

Jusqu'au douzième jour de culture, la dissolution dans le milieu et la bioaccumulation par le champignon croissent régulièrement. Puis la diminution des quantités de fer en solution semble être compensée par l'immobilisation. Les quantités totales de fer mobilisé (solubilisé et bioaccumulé) restent en effet constantes à partir de ce douzième jour.

Cette immobilisation se poursuit pendant la phase stationnaire de croissance et la phase de déclin, alors que la solubilisation s'est arrêtée en fin de phase exponentielle de croissance.

La courbe cumulative (fer solubilisé dans le milieu additionné du fer immobilisé par le champignon) qui reflète la dissolution totale de la goethite, indique bien une solubilisation rapide et importante pendant les douze premiers jours, puis une décroissance faible en fin d'expérience (Tableau III.5.), qui correspond à une légère insolubilisation du fer, sans doute sur la goethite, ou bien encore dans ou sur le sac à dialyse.



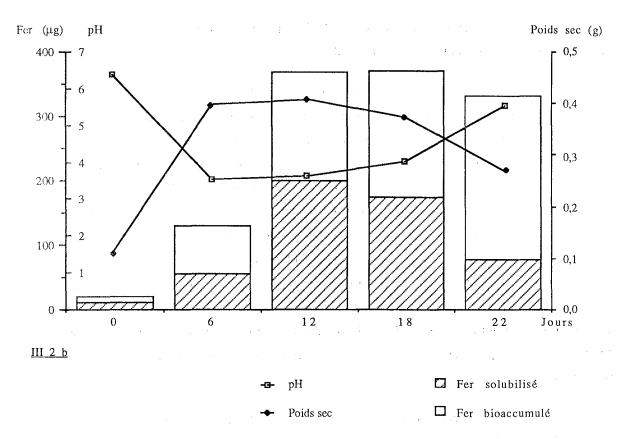


Figure III 2: Evolutions du pH du milieu, de la croissance fongique, et de la solubilisation du fer, par flacon de culture, en présence d' Ustilago sphaerogena en milieu Us, sans (III 2 a) ou avec (III 2 b) goethite.

Tableau III.5.- Quantités totales de fer de la goethite mobilisé, solubilisé et accumulé (en µg par flacon de culture) et dissolution de la goethite initiale (en pourcent) en présence d'Ustilago sphaerogena en milieu Us.

Temps (jours)	0	6	12	18	22
Ustilago sp goethite	21	50,30	13,69	11,13	22,40
Ustilago sp. + goethite	21	129,66	368,50	370,38	331,36
Dissolution de la goethite (en %)	0,03	0,20	0,50	0,52	0,52

Le milieu de culture s'acidifie très rapidement en début de culture (Figure III.2.). Cette acidification se stabilise du 6ème jour au 12ème jour, puis le pH croît légèrement, mais non significativement, au cours de la phase stationnaire et de déclin.

Comme la croissance, l'évolution du pH est relativement identique pour les deux traitements avec et sans goethite (Figure III.2.).

Pour la production de biomasse et la croissance, il n'y a aucune différence significative entre les deux traitements. La croissance se fait en début d'incubation très rapidement jusqu'au 6ème jour, puis plus lentement jusqu'au 12ème jour. Une phase stationnaire, puis de déclin, se manifeste à compter du 6ème jour puis du 12ème jour. Les valeurs de biomasse produite restent très faibles certainement en raison de facteurs limitants, comme les conditions nutritionnelles ou le volume du flacon. Dans les conditions expérimentales adoptées, l'absence de goethite n'entraîne pas d'effet sur la croissance. La carence, dans ce cas, ne semble pas exercer plus d'effet, qu'il y ait ou non adjonction de goethite. L'inoculum utilisé pour cette expérience avait été obtenu à partir de précultures effectuées dans un milieu carencé en fer, mais qui devait toutefois en disposer en quantités suffisantes pour assurer cette faible croissance dans ces milieux. La phase de déclin observée en fin d'expérience est un processus habituel dans de telles cultures et peut s'expliquer par une lyse cellulaire due à l'épuisement du milieu ou à la présence de conditions déstabilisantes pour le champignon.

L'expression des résultats par rapport à la biomasse fongique totale produite indique (Tableau III.6.) que l'immobilisation du fer dans la biomasse augmente considérablement tout au long de la culture, même pendant la phase de déclin et de lyse cellulaire, pour atteindre des teneurs voisines de 1 ‰ en fer de la matière sèche du champignon.

Tableau III.6.- Quantités de fer solubilisé et immobilisé en fonction de la croissance (biomasse totale) dans des incubations d'*Ustilago sphaerogena* dans le milieu Us en présence de goethite (en µg de fer/g de matière sèche).

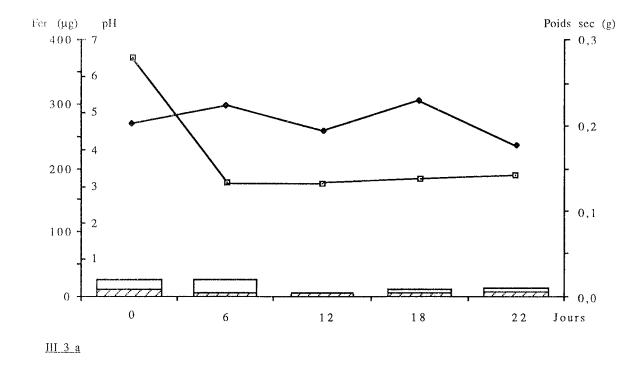
Temps (jours)	0	6	12	18	22
Fer solubilisé dans le milieu Fe _s	106,19	138,65	490,87	463,71	287,00
Fer bioaccumulé Fe _b	79,64	182,47	400,96	525,61	972,62
Fer mobilisé Fe _s + Fe _b	185,,83	321,13	891,84	988,32	1259,62

Dans le milieu de Pachlewski (Pa), les quantités de fer solubilisé dans le milieu sont inférieures, sauf en fin d'incubation après 22 jours de culture, tout en présentant des différences hautement significatives par rapport aux témoins, à tous les prélèvements. Mais les quantités immobilisées sont aussi importantes et hautement significatives à 12, 18 et 22 jours de culture (Figure III.3.). Les deux processus commencent dès le début de la culture du champignon, et se poursuivent tout au long de l'incubation, malgré l'absence d'une croissance significative d'*Ustilago sphaerogena* dans ce milieu. L'évolution du rapport, en fait le transfert entre les formes solubles et immobilisées du fer, est moins net à compter du douzième jour, ou du moins n'apparaît pas comme dans le milieu Us. Là aussi, la plus grande partie du fer mobilisé (solubilisé et immobilisé), égale en fin d'expérience à celle observée dans le milieu Us, l'est dès le 12ème jour d'incubation (Tableau III.7.).

Tableau III.7.- Quantités totales de fer de la goethite mobilisé (en µg par flacon de culture) et dissolution de la goethite initiale (en pourcent) en présence d'*Ustilago sphaerogena* en milieu Pa).

Temps (jours)	0	6	12	18	22
Ustilago sp goethite	28,2	28,51	7,67	13,48	26,33
Ustilago sp. + goethite	28,2	117,12	322,54	346,60	368,53
Dissolution de la goethite (en %)	0,04	0,18	0,51	0,55	0,58

Comme dans le milieu Us, on note une acidification très forte en présence et en l'absence de goethite, en début de culture, mais cette acidification se maintient et les remontées en pH sont très faibles.



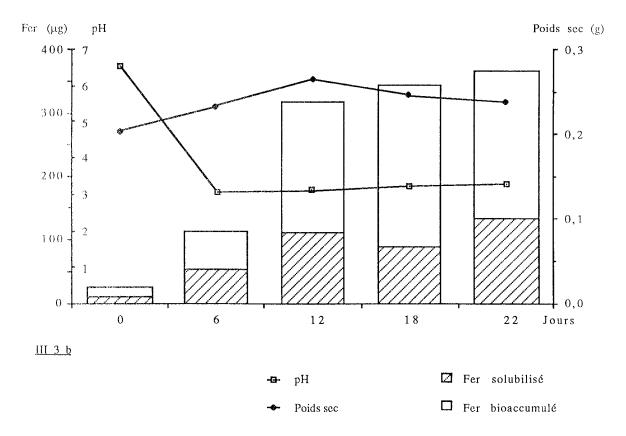


Figure III 3: Evolutions du pH du milieu, de la croissance fongique, et de la solubilisation du fer, par flacon de culture, en présence d'Ustilago sphaerogena en milieu Pa, sans (III 3 a) ou avec (III 3 b) goethite.

Cette acidification et cette dissolution et bioaccumulation très significatives du fer dans ce milieu Pa, sont accompagnées d'une croissance très faible, non significative. L'annexe VIII rassemble toutes les valeurs des quantités de fer solubilisé et immobilisé, des pH et des biomasses pour les incubations d'*Ustilago sphaerogena* en milieu Pa, en les présentant avec leurs intervalles de confiance.

Ce milieu de culture est sans aucun doute moins adapté à la croissance d'*Ustilago sphaerogena*, étant donné la faible biomasse produite au cours de cette expérience. Mais cette absence de croissance n'empêche pas une activité toute aussi forte vis-à-vis de la dissolution de la goethite, grâce à une solubilisation dans le milieu et à une bioaccumulation importante du fer. Exprimées par rapport à la biomasse (Tableau III.8.), les quantités de fer total mobilisé (solubilisé plus immobilisé) ne font qu'augmenter au cours de l'incubation, et sont supérieures aux quantités mobilisées dans le milieu Us (Tableau III.6.).

Tableau III.8.- Quantités de fer solubilisé et immobilisé en fonction de la croissance (biomasse totale) au cours d'incubations d'*Ustilago sphaerogena* dans le milieu Pa en présence de goethite (en µg de fer/g de matière sèche).

Temps (jours)	0	6	12	18	22
Fer solubilisé dans le milieu Fe _s	58,82	233,49	449,97	367,60	562,67
Fer bioaccumulé Fe _b	79,41	252,43	787,38	1039,16	1041,27
Fer mobilisé Fe _s + Fe _b	138,233	435,92	1237,35	1406,76	1603,94

Cette forte bioaccumulation, pour une biomasse aussi faible et pour une croissance presque nulle, est assez étonnante et suggère une bioaccumulation du fer qui dépasse les teneurs de 1‰, sans relation avec la croissance et les besoins nutritionnels du champignon. Ceci avait déjà été suspecté par les résultats précédents, même avec *Ustilago sphaerogena* cultivé dans son milieu spécifique. Le pourcentage de mobilisation totale est aussi, dans ce cas, nettement plus important qu'en milieu Us.

2.2. Par Suillus granulatus

Le champignon *Suillus granulatus*, dans son milieu spécifique (milieu de Pachlewski Pa), semble, lui aussi, efficace pour solubiliser et accumuler le fer de la goethite. Mais les cinétiques de dissolution et de bioaccumulation sont tout à fait différentes de celles observées avec *Ustilago sphaerogena* (Figure III.4.). Pendant les 21 premiers jours, il n'apparaît presque pas de fer soluble dans le milieu, même si les différences avec les témoins (cultivés sans goethite) sont hautement significatives (toutes les données de ces incubations, avec leurs intervalles de confiance,

sont rassemblées en Annexe IX). En revanche, lors des dix derniers jours (du 21ème au 32ème jour de culture), il se produit une très nette augmentation du fer en solution, qui atteint des valeurs voisines de celles observées avec *Ustilago sphaerogena*.

L'immobilisation du fer dans la biomasse se produit plus régulièrement pendant les 21 premiers jours, et ce de façon hautement significative, mais augmente aussi très fortement en fin d'incubation.

Les deux cinétiques de solubilisation et de bioaccumulation évoluent en fait parallèlement. Ces deux processus entraînent une solubilisation globale de la goethite, d'abord légèrement croissante au cours du temps, puis forte en fin d'incubation (Tableau III.9.).

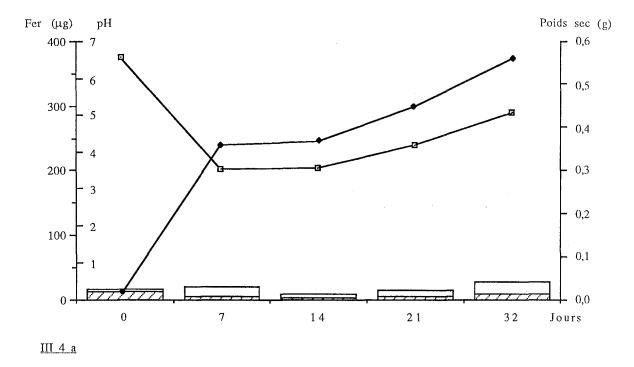
Tableau III.9.- Quantités totales de fer de la goethite mobilisé, solubilisé et accumulé (en μg par flacon de culture) et dissolution de la goethite initiale (en pourcent) en présence de Suillus granulatus en milieu Pa.

Temps (jours)	0	7	14	21	32
Suillus granulatus - goethite	16,23	19,24	8,87	15,13	26,13
Suillus granulatus + goethite	16,23	35,04	39,07	85,75	317,49
Dissolution de la goethite (en %)	0,02	0,05	0,06	0,13	0,50

Il se produit donc une faible dissolution de la goethite dès le début de la culture du champignon, qui s'accompagne aussi d'une faible bioaccumulation du fer pendant les 21 premiers jours. En revanche, pendant les dix derniers jours, la mobilisation globale augmente nettement, mais 62 % du fer restent en solution.

Cette mobilisation du fer se fait en milieu acide. Mais la diminution très forte du pH, semblable à celle observée avec *Ustilago sphaerogena*, est intervenue en début de culture (avant 7 jours d'incubation) et précède la mobilisation du fer, qui ne se fait vraiment qu'après le 21ème jour de culture. Cette acidification diminue d'ailleurs plus ou moins légèrement après le 14ème jour d'incubation.

La croissance de Suillus granulatus dans le milieu Pa, et ce dans les deux traitements (avec ou sans goethite) est plus importante que celle d'*Ustilago sphaerogena*. Elle se maintient tout au long de la culture, jusqu'au 32ème jour, sans qu'il y ait de différence entre les deux milieux.



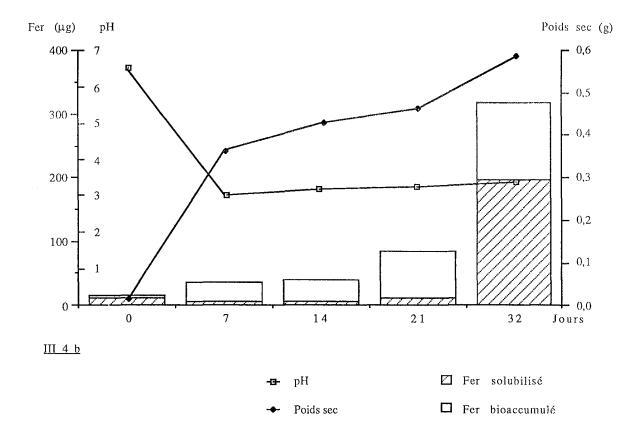


Figure III 4: Evolutions du pH du milieu, de la croissance fongique, et de la solubilisation du fer par flacon de culture, en présence de Suillus granulatus en milieu Pa, sans (III 4 a) ou avec (III 4 b) goethite.

En fin d'expérience, la teneur en fer de la biomasse n'a pas encore atteint sa valeur initiale (Tableau III.10.), ce qui peut laisser suposer, d'une part que la solubilisation par bioaccumulation pourrait encore augmenter, et que, d'autre part, cette bioaccumulation répond sans doute plus ici aux besoins nutritionnels du champignon que pour *Ustilago sphaerogena*.

Tableau III.10.- Quantités de fer solubilisé et immobilisé en fonction de la croissance (biomasse totale) au cours d'incubations de *Suillus granulatus* dans le milieu Pa, en présence de goethite (en μg/g de matière sèche).

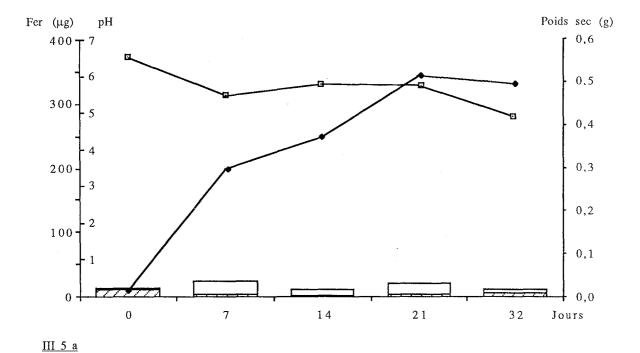
Temps (jours)	0	7	14	22	32
Fer solubilisé dans le milieu Fe _s	8	18,37	15,29	31,01	333,85
Fer bioaccumulé Fe _b	282	76,94	76,32	153,57	205,53
Fer mobilisé Fe _s + Fe _b	1082	95,32	91,61	184,58	539,38

Pour *Suillus granulatus* cultivé dans le milieu Us, les mêmes types de cinétiques de dissolution-bioaccumulation du fer sont observés (Figure III.5.). Pendant les 21 premiers jours d'incubation, les quantités de fer soluble dans le milieu et de fer bioaccumulé ne varient pas ou très peu (aucune valeur n'est significativement différente des témoins). En revanche, pendant les dix derniers jours, ces deux valeurs augmentent nettement et de façon significative (cf. Annexe X pour toutes les données de ces incubations, ansi que leurs intervalles de confiance).

L'évolution de la mobilisation totale suit ces cinétiques, mais atteint des valeurs bien plus faibles d'environ 50 % (Tableau III.11.) que pour les incubations dans le milieu Pa (Tableau III.9.).

Tableau III.11.- Quantités totales de fer de la goethite mobilisé (en µg par flacon de culture) et dissolution de la goethite initiale (en pourcent) en présence de Suillus granulatus en milieu Us.

Temps (jours)	0	7	14	21	32
Suillus granulatus - goethite	16,23	27,64	14,51	22,63	14,27
Suillus granulatus + goethite	16,23	14,70	12,29	15,22	97,89
Dissolution de la goethite (en %)	0,02	0,02	0,02	0,02	0,15



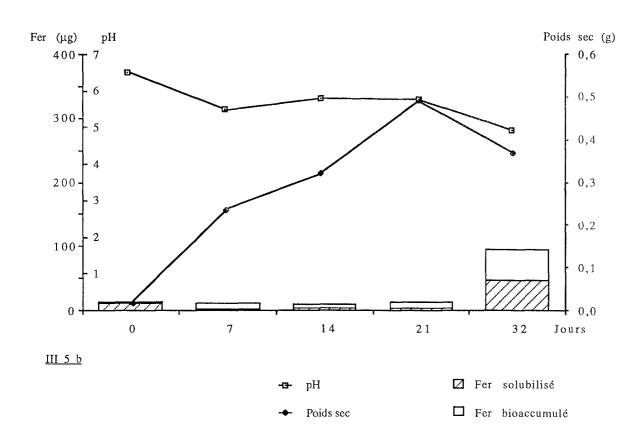


Figure III 5: Evolutions du pH du milieu, de la croissance fongique, et de la solubilisation du fer, par flacon de culture, en présence de Suillus granulatus en milieu Us, sans (III 5 a) ou avec (III 5 b) goethite.

Encore plus que dans l'expérience précédente, il ne se produit aucune solubilisation du fer pendant les 21 premiers jours. Comme le champignon a une bonne croissance pendant cette expérience, des besoins nutritionnels en fer apparaîtront, et ce d'autant plus que les teneurs du mycélium décroissent jusqu'au 21ème jour pour atteindre 22 µg g⁻¹. Ces besoins en fer, qui apparaissent encore plus nettement que pour les cultures en milieu Pa (Tableau III.12.), pourront alors stimuler la production de sidérophores, qui entraîne la solubilisation et la bioaccumulation observées dans la dernière phase d'incubation.

Tableau III.12.- Quantités de fer solubilisé et immobilisé en fonction de la croissance (biomasse totale) au cours d'incubations de *Suillus granulatus* dans le milieu Us en présence de goethite (en µg de fer/g de matière sèche).

Temps (jours)	0	7	14	22	32
Fer solubilisé dans le milieu Fe _s	8	15,69	12,25	8,93	126,81
Fer bioaccumulé Fe _b	282	15,43	26,11	22,29	138,09
Fer mobilisé Fe _s + Fe _b	1082	61,12	38,36	31,22	264,90

La croissance dans ce milieu Us est sensiblement plus faible qu'en milieu Pa et pourrait correspondre à une composition du milieu moins bien adaptée au champignon.

L'acidification du milieu, qui se manifeste aussi dès le début des cultures, est nettement moins importante que dans toutes les expériences précédentes. A une reprise de l'acidification en fin d'expérience (différence significative entre les deux traitements), correspond une reprise de la dissolution du fer (Figure III.5.).

Les résultats de ces quatre séries d'incubations montrent donc que les deux champignons, *Suillus granulatus* et *Ustilago sphaerogena*, peuvent solubiliser un oxyhydroxyde ferrique parfaitement cristallisé, la goethite, et que cette solubilisation, simultanée à une acidification du milieu, ne semble pas toujours être liée aux besoins nutritionnels du microorganisme. Ainsi, la bioaccumulation par *Ustilago sphaerogena* est très importante pour une croissance faible, voire nulle, en milieu Pa.

Les deux champignons semblent mieux croître chacun dans leur milieu, considéré comme spécifique pour leur culture. Mais la différence de milieu n'entraîne pas de fortes modifications des processus de solubilisation, sauf pour *Suillus granulatus* dans le milieu Us. Des expériences annexes (résultats non présentés) montraient que dans des milieux non carencés en fer, les champignons ne solubilisaient pas la goethite, alors que l'on assistait à la même acidification du milieu et ceci pour une production de biomasse du même ordre. Par ailleurs, les quantités de fer accumulé dans les biomasses fongiques produites dans un milieu nutritif non carencé en fer sont nettement moins importantes que celles observées en présence de goethite. En effet, le taux de fer bioaccumulé dans les cellules d'*Ustilago sphaerogena* cultivées en présence de FeCl₃ n'est que de 91 µg de fer par g de matière sèche, alors qu'en présence de goethite, en conditions de carence en fer soluble, il atteint 345 µg/g, ceci pour un même inoculum.

Les dosages d'autres éléments tels que Cu, Mn, Si, Al, Zn présents à l'état de traces ont été effectués pour chaque échantillon, dans les milieux et dans les cellules fongiques, mais aucune relation n'a pu être observée avec les résultats obtenus pour le fer. Des différences significatives ont été trouvées avec *Ustilago sphaerogena* dans les milieux de culture Us : en l'absence de goethite, on observe, après 18 jours de culture, 13 ppb de Cu et Zn, alors qu'en présence de goethite, 114 ppb de Cu et 54 ppb de Zn sont présents dans les milieux.

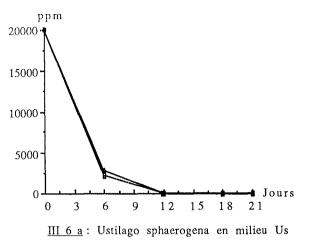
Ustilago sphaerogena incubé dans le milieu Pa absorbe moins Cu, Zn et Al en présence de goethite, puisqu'à 21 jours d'incubation, les teneurs dans les milieux sont respectivement, pour Cu, Zn et Al, de 22, 25 et 57 ppb dans les témoins sans goethite, alors qu'elles sont de 95, 81 et 77 ppb dans les incubations avec goethite.

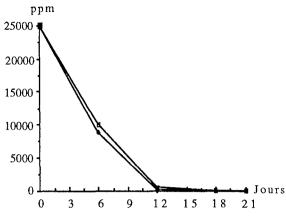
Pour *Suillus granulatus*, des différences significatives sont trouvées pour Zn et Cu à 12 jours, avec des teneurs dans les témoins sans goethite respectivement de 288 ppb et 12 ppb, alors qu'elles sont de 442 ppb et 21 ppb dans les échantillons incubés en présence de goethite. Aucune différence n'a été observée dans les biomasses, et toutes ces valeurs d'éléments en traces citées cidessus sont généralement faibles, parfois à la limite de la validité de la méthode d'analyse adoptée.

3.- Utilisation des sucres, source de carbone et d'énergie

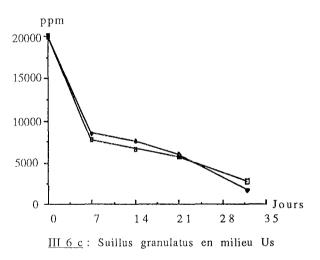
Le dosage des sucres résiduels permet d'observer des relations entre la solubilisation du fer, la croissance des champignons et l'utilisation des substrats carbonés énergétiques.

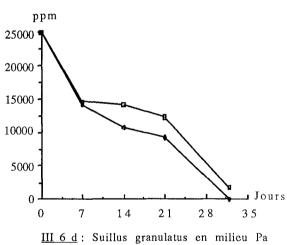
Les résultats pour les deux champignons sont représentés par la figure III.6.





III 6 b: Ustilago sphaerogena en milieu Pa





- goethite + goethite

Figure III 6: Teneurs en glucose en ppm dans les différentes cultures d'Ustilago sphaerogena et Suillus granulatus

Dans le milieu Us, *Ustilago sphaerogena* utilise très rapidement le saccharose présent. Après 6 jours, il ne reste que 11 à 13 % des sucres initiaux présents dans ce milieu, et 35 à 40 % pour le milieu Pa, et seulement 0,1 % et 0,8 à 17 % après 12 jours respectivement dans les milieux Us et Pa.

Les sucres disponibles sont donc utilisés très rapidement, alors que la croissance est faible, ou même très faible. Avant 12 jours d'incubation, *Ustilago sphaerogena* se retrouve dans des milieux pratiquement dépourvus de source de carbone et d'énergie. Les besoins énergétiques et nutritionnels ne peuvent plus être satisfaits. *Ustilago sphaerogena* utilise plus facilement le saccharose du milieu Us que le glucose et le maltose du milieu Pa. A cette phase d'utilisation des sucres correspond la phase d'acidification du milieu et de dissolution importante du fer de la goethite. La dissolution et l'accumulation se font toutefois avec un certain retard, puisqu'elles se manifestent surtout dans la seconde semaine de culture.

L'utilisation des sucres par *Suillus granulatus* est ici tout à fait différente, puisqu'il reste, à 21 jours d'incubation, de 36 à 49 % et environ 28 % des sucres initiaux respectivement dans les milieux Pa et Us. Par contre, à 32 jours, ces teneurs ne sont plus que de 1,2 à 6 % pour le milieu Pa et de 9 à 14 % pour le milieu Us. L'allure des courbes est semblable à celle de la croissance et de la dissolution du fer pour *Suillus granulatus* en milieu Pa. La brusque baisse de la teneur en sucres disponibles en fin d'expérience correspond à l'augmentation du fer solubilisé. Cette consommation de sucres par *Suillus granulatus* dans la dernière phase de culture est plus importante dans les milieux avec goethite. La production de biomasse et la consommation de sucres, plus importantes en fin d'incubation dans le milieu Pa, confirment que ce milieu est mieux adapté à *Suillus granulatus*, même si la consommation de sucres est plus rapide en début de culture en milieu Us.

Dans ces expériences, la solubilisation de la goethite n'est pas vraiment corrélée à la consommation des sucres, sauf pour *Suillus granulatus* en milieu Pa. Cette consommation des sucres est d'abord, pour *Suillus granulatus*, parallèle à la croissance.

Pour *Ustilago sphaerogena*, la phase la plus importante de consommation des sucres correspond à l'acidification du milieu, au début de la solubilisation du fer et à la phase de croissance la plus importante. La seconde phase de croissance, vraiment très faible, correspond à un arrêt de l'acidification, mais à la seconde phase de solubilisation du fer, plus importante que la première. On observe aussi, en milieu Pa, une consommation des sucres disponibles, sans croissance du champignon, malgré une forte mobilisation du fer de la goethite.

Pour *Suillus granulatus*, comme déjà dit, on observe, en milieu Pa, un parallélisme entre la consommation des sucres, la croissance et la mobilisation du fer. En milieu Us, la courbe de consommation des sucres de *Suillus granulatus* a, à peu près, la même allure que celle du milieu Pa, mais n'est pas reliée ici, ni à la croissance, qui diminue en fin de culture, ni à la solubilisation du fer, qui est beaucoup plus faible.

4.- Production de diphénols par les champignons

Les diphénols ont été dosés pour leur capacité à complexer le fer, et ce d'autant plus que certains sidérophores possèdent des groupements diorthophénoliques en tant que site actif de complexation. Les résultats des dosages selon la méthode de Folin-Denis (1912) sont présentés dans les tableaux III.13. et III.14.

Tableau III.13.- Production de diphénols (équivalent acide protocatéchique) en mM/l dans les milieux de culture d'*Ustilago sphaerogena*.

Temps (en jours)		0	6	12	18	21
TRAITEMENTS						
Milieu <i>Ustilago</i>	Ustilago sphaerogena - goethite	0	0,100	0,105	0,114	0,116
	Ustilago sphaerogena + goethite	0	0,111	0,110	0,112	0,090
Milieu Pachlewski	Ustilago sphaerogena - goethite	0	0,051	0,055	0,053	0,056
	Ustilago sphaerogena + goethite	0	0,053	0,060	0,080	0,105

Les teneurs en diphénols restent constantes dans les milieux de culture du sixième au dernier jour d'incubation pour *Ustilago sphaerogena*. Leur production se ferait donc en début d'incubation, excepté pour les incubations en présence de goethite dans le milieu Pa, où la quantité double du 6ème au 21ème jour d'incubation. Mais cette différence est tout à fait minime.

Tableau III.14.- Production de diphénols (équivalent acide protocatéchique) en mM/l dans les milieux de culture de Suillus granulatus.

Temps (en jours)		0	6	12	18	21
TRAITEMENTS						
Milieu Pachlewski	Suillus granulatus - goethite	0	0,055	0,054	0,006	1,47
	Suillus granulatus + goethite	0	0,025	0,032	0,055	1,24
Milieu Ustilago	Suillus granulatus - goethite	0	0,032	0,105	0,112	1,1
	Suillus granulatus + goethite	0	0,055	0,09	0,106	1

Pour *Suillus granulatus*, la production de diphénols augmente nettement dans les deux milieux de culture, en particulier en fin d'incubation dans le milieu Pa. Ceci suggère des voies métaboliques du champignon, qui, en fin de croissance, pourraient intervenir, par production de ces diphénols, dans la solubilisation de la goethite. Cette production de diphénols par le microorganisme pourrait aussi correspondre à des excrétions liées au vieillissement des cellules.

5.- Production de différents types de sidérophores

Les sidérophores ont été analysés selon les méthodes décrites en première partie. Ces analyses permettent de distinguer les hydroxamates et les phénolates par des méthodes chimiques d'une part, et les sidérophores agissant sur la croissance de la bactérie *Arthrobacter flavescens* JG9 d'autre part.

5.1. Hydroxamates décelables par la méthode de CSAKY (1948)

Cette méthode a plutôt été utilisée pour effectuer des tests semi-quantitatifs. Elle permet de constater que les champignons présentent des cinétiques très différentes de production d'hydroxamates. Des réponses nettement positives sont observées à 6 jours pour les incubations d'*Ustilago sphaerogena* en milieu Us et Pa, et même encore, mais de façon moins nette, à 12 jours pour les incubations en milieu Pa. Pour *Suillus granulatus*, des réponses positives au test de CSAKY ne sont obtenues qu'après 32 jours d'incubation pour les cultures en milieu Pa. Une faible réponse est observée dans les prélèvements précédents. Quant aux incubations de *Suillus granulatus* en milieu Us, la production très importante de polysaccharides ne permet pas une lecture satisfaisante de ces dosages. *Ustilago sphaerogena* libère donc dans le milieu ces composés en début de culture, alors que *Suillus granulatus* les produit en fin d'incubation.

Comme le ferrichrome et le ferrichrome A, sidérophores produits par *Ustilago sphaerogena*, sont des trihydroxamates, décelables par ce test, il y a lieu de considérer que ce sont ces composés qui sont décelés dans les milieux de culture de ce champignon. Les sidérophores produits

par *Suillus granulatus* ne sont pas connus, mais les réponses à ce test suggèrent que ce champignon peut produire des hydroxamates, en particulier en fin de phase de croissance exponentielle. Les deux périodes de production des hydroxamates correspondent, pour les deux champignons, aux phases significatives de la solubilisation de la goethite. Ces dosages devraient être améliorés pour préciser les cinétiques de production de ces sidérophores et les quantités produites. Cette production de sidérophores n'est pas surprenante dans ces milieux carencés en fer directement assimilable. EMERY (1971) a déjà mis en évidence une production accrue de sidérophores après 3 jours de culture d'*Ustilago sphaerogena* en milieu carencé en fer. En présence de goethite, dans un milieu carencé en fer, *Ustilago sphaerogena* produit donc des sidérophores en début d'incubation, en utilisant très rapidement les sucres disponibles pour sa croissance. Puis cette synthèse de sidérophores s'arrête, sans doute à cause de la présence de ce fer soluble en quantité suffisante dans le milieu. Avec *Suillus granulatus*, le métabolisme semble différent, la production de biomasse est meilleure, malgré la carence en fer, vis-àvis de laquelle le champignon produirait des sidérophores essentiellement en fin de croissance, quand la carence deviendrait plus sensible.

5.2. Hydroxamates décelables par le test biologique utilisant la bactérie Arthrobacter flavescens JG9

Les résultats précédents se voient confirmés par ce dernier test, qui ne décèle que certains sidérophores, comme le ferrichrome produit par *Ustilago sphaerogena*, qui est excrété de la cellule et intervient dans l'absorption du fer, alors qu'un autre sidérophore, le ferrichrome A, seulement excrété et n'intervenant pas dans le transport intracellulaire, n'est pas décelé par ce test. Cette méthode incomplète permet néanmoins d'observer la présence de sidérophores dans les milieux de culture d'*Ustilago sphaerogena* au cours des 6 premiers jours et décèle, à 6 jours d'incubation, une teneur en sidérophores de 8 µg équivalent DFOB par ml de milieu. En revanche, pour *Suillus granulatus* cultivé en milieu Pa, les réponses sont plus nettes (Tableau III.15.).

Tableau III.15.- Quantités d'hydroxamates en µg équivalent DFOB par ml de milieu de culture pour les incubations de *Suillus granulatus* en milieu Pa.

Temps (jours)	0	7	14	21	32
Suillus granulatus - goethite	0	0,25	0,25	0,30	0,5
Suillus granulatus + goethite	0	0,23	0,005	0,005	0,5

La production plus importante d'hydroxamates en fin de culture dans les deux traitements est ici confirmée. Les résultats montrent que le champignon produit des hydroxamates dès le début de la culture. Les hydroxamates ne sont plus dosés significativement au

14ème et au 21ème jour dans les incubations en présence de goethite, étant probablement absorbés par le champignon, alors qu'ils sont complexés au fer, ce qui expliquerait les différences significatives de quantités totales du fer immobilisé dans la biomasse. *Suillus granulatus* incubé en l'absence de goethite continuerait à produire des sidérophores, ne trouvant pas de fer disponible dans ce milieu. En milieu Us, les productions de sidérophores par *Suillus granulatus* sont plus difficiles à mettre en évidence, à cause de la présence de polysaccharides.

Les dosages, par une méthode plus spécifique de certains sidérophores, confirment donc les résultats précédents, obtenus par la méthode d'analyse des fonctions hydroxamiques, ainsi que les hypothèses d'intervention des sidérophores dans la dissolution du fer de la goethite.

5.3. Les phénolates et les catécholates

Les phénolates sont dosés par le test d'HATHWAY (1969), et les résultats sont rassemblés dans un tableau de l'annexe XI et exprimés en équivalent 2,3 DHBA (acide 2,3 dihydroxybenzoïque), les colorations obtenues ne correspondant pas à la gamme étalon de l'acide salycilique.

En présence d'*Ustilago sphaerogena*, la production de composés de type dihydroxybenzoïque n'est pas décelée dans les milieux de culture. Les teneurs restent constantes, aux environs de 38 micromollaires dans le milieu Us et 20 micromollaires dans le milieu Pa, et ce dans les deux traitements (avec ou sans goethite).

En revanche, pour *Suillus granulatus* incubé dans le milieu Pa, il se produit une nette augmentation de la teneur de ces composés en fin d'incubation : de 20 micromolaires pendant les 21 premiers jours d'incubation, la teneur en phénolates atteint 200 micromolaires au 32ème jour. Les résultats concernant *Suillus granulatus* en milieu Us ne sont pas discutés étant donné leur hétérogénéité, due à une forte production de polysaccharides.

Ces résultats rejoignent et confirment ceux obtenus au cours du dosage des diphénols. La cinétique de production des phénolates, pour *Suillus granulatus*, est semblable à celle des hydroxamates et à la cinétique de solubilisation de la goethite.

Les dosages effectués en utilisant le test d'ARNOW (1937), sensible aux catécholates, n'ont pas présenté de réponses positives, ni pour *Ustilago sphaerogena*, ni pour *Suillus granulatus*. Il semble donc que *Suillus granulatus* produise plutôt des acides diphénols et non pas des acides monophénols ou des diphénols simples.

5.4. Remarques sur ces dosages de sidérophores

Il y a lieu de souligner que ces résultats sont incomplets, car d'une part les sidérophores endocellulaires n'ont pas été dosés, la totalité de la biomasse ayant été minéralisée, et que, d'autre part, aucune autre purification n'a été faite afin de déterminer qualitativement la nature de ces sidérophores produits, en particulier pour *Suillus granulatus*. SZANISZLO *et al.* (1981) ont cependant déterminé que les sidérophores produits par *Suillus granulatus* sont des hydroxamates et des phénolates, tout comme ceux que nous avons décelés dans les cultures de *Suillus granulatus*.

Afin de rassembler les résultats des dosages des sidérophores obtenus et de les relier à la mobilisation du fer, les tableaux III.16. et III.17. représentent schématiquement ces deux processus, respectivement pour *Ustilago sphaerogena* et pour *Suillus granulatus*.

Tableau III.16.- Production de composés complexants du fer et mobilisation du fer de la goethite, en présence d'Ustilago sphaerogena.

Temps (en jours)	0	6	12	18	22
Hydroxamates (méthode de CSAKY)		++	+	0	0
Hydroxamates (sensibles à A. flavescens JG9)	0	++	+	0	0
Phénolates (méthode d'HATHWAY)	0	3	ε	ε	ε
Catécholates (méthode d'Arnow)	0	0	0	0	0
Diphénols (méthode de FOLIN-DENIS)	0	3	ε	ε	3
Mobilisation du fer de la goethite	0	+	++	+++	+++

Tableau III.17.- Production de composés complexants du fer et mobilisation du fer de la goethite, en présence de Suillus granulatus

Temps (en jours)	0	7	14	21	32
Hydroxamates (méthode de CSAKY)	0	0	0	0	+
Hydroxamates (sensibles à A. flavescens JG9)	0	ε	ε	ε	+
Phénolates (méthode d'HATHWAY)	0	3	ε	ε	+
Catécholates (méthode d'ARNOW)	0	0	0	0	0
Diphénols (méthode de FOLIN-DENIS)	0	3	ε	ε	+
Mobilisation du fer de la goethite	0	ε	ε	ε	+

Mais même si ces dosages sont incomplets, ils montrent bien que les cinétiques de production des sidérophores sont parallèles aux cinétiques de dissolution de la goethite. La solubilisation de la goethite apparaît comme liée à la production de ferrichromes par *Ustilago sphaerogena* et à la production d'hydroxamates et de phénolates par *Suillus granulatus*. Cependant, l'acidification des milieux suggère aussi une intervention possible d'acides excrétés dans le milieu, autres que les sidérophores. Ceci nous a conduit à analyser plus précisément ces acides produits, sachant par ailleurs que la production de sidérophores est un processus régulé par la teneur en fer assimilable du milieu, dont la présence réprime cette production.

6.- Evolution de l'acidité des milieux de culture

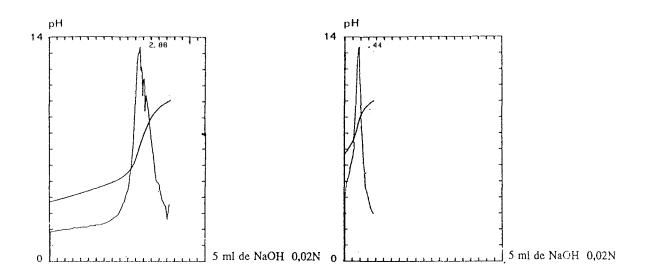
L'évolution du pH a montré que les milieux s'acidifient fortement en début de culture des champignons. De plus, les acides produits par les microorganismes peuvent être impliqués dans ces phénomènes de dissolution. Ceci nous a conduit à étudier, par diverses méthodes (titrimétrie, HPLC), les acides produits dans le but d'établir une éventuelle relation avec la mobilisation du fer.

6.1. Titrage potentiométrique des différentes formes d'acidité

La figure III.7. correspond aux courbes dérivées des titrages effectués sur les milieux de culture d'*Ustilago sphaerogena* en milieu Us après 12 et 22 jours et sur ceux de *Suillus granulatus* dans le milieu Pa, après 14 et 32 jours, ainsi que sur les milieux témoins. Les valeurs des acidités totale, forte (minérale plus carboxylique) et très faible, exprimées en meq l-1, représentées sur la figure III.8., indiquent pour *Ustilago sphaerogena* une production d'acides importante en début de culture, puis une diminution très nette de l'acidité totale, et surtout de l'acidité forte, en fin d'incubation. Pour *Suillus granulatus*, ces acidités continuent à croître jusqu'en fin d'incubation. Le milieu Us initial ne présente pas d'acidité libre (Figure III.8.). Les analyses ne permettent de doser que l'acidité libre.

L'analyse des complexes aurait pu être envisagée pour préciser l'évolution des formes en solution, mais elle n'était guère facile dans des milieux si complexes et si riches en phosphates, apportés par les milieux nutritifs.

Le titrage de l'acidité très faible (de type phénolate) confirme bien les résultats des dosages des phénolates et des diphénols obtenus dans les cultures de *Suillus granulatus*, qui montrent l'augmentation de la production de tels composés en fin d'incubation.



III 7 a: Ustilago sphaerogena à 12 jours

III 7 c: Suillus granulatus à 14 jours

III 7 b: Ustilago sphaerogena à 22 jours

III 7 d: Suillus granulatus à 22 jours

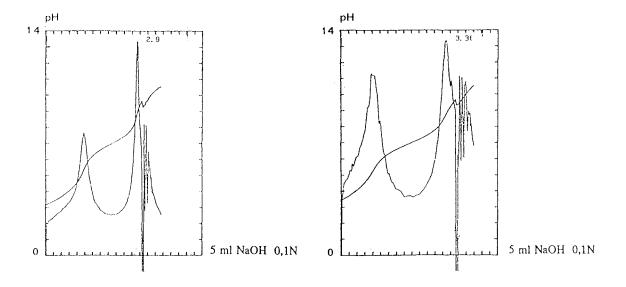


Figure III 7: Evolution des courbes de titrage et des courbes dérivées des milieux de culture d'Ustilago sphaerogena en milieu Us et de Suillus granulatus en milieu Pa

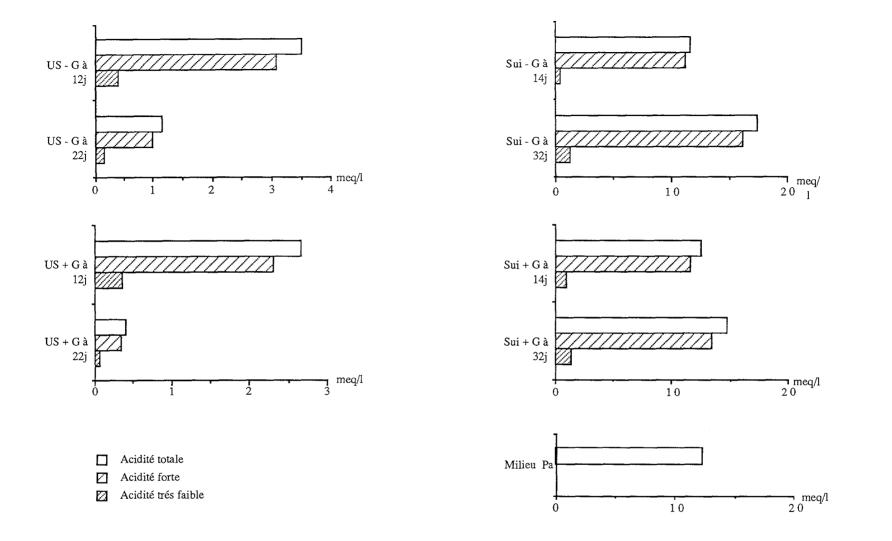


Figure III 8 : Acidité totale, forte et très faible des incubations d'<u>Ustilago sphaerogena</u> et de <u>Suillus granulatus</u>

Pour le milieu Us l'acidité libre est nulle.

6.2. Recherche et dosage des acides aliphatiques (HPLC et dosages enzymatiques)

Les échantillons en HPLC ne subissent aucun prétraitement avant leur passage sur la colonne chromatographique. Seuls certains acides aliphatiques vont être identifiés et quantifiés. L'évaluation de cette acidité organique va permettre d'expliquer les variations des acidités forte et très faible observées précédemment par les méthodes titrimétriques.

Les chromatogrammes de tous les échantillons ne sont pas tous présentés ici, chacun faisant apparaître une dizaine de pics, qui n'ont pas tous été identifiés. Les figures III.9. et III.10. présentent des exemples significatifs de l'évolution des chromatogrammes pour les deux champignons. Les résultats obtenus permettent de faire les constatations suivantes :

En présence d'*Ustilago sphaerogena*, dans les deux milieux de culture, les acides aliphatiques produits en début d'incubation diminuent et sont sans doute consommés pendant les phases stationnaire et de déclin. Certains de ces acides (oxalique, citrique, malique) sont parfaitement bien identifiés dans la plupart des échantillons. Leur concentration diminue avec le temps, en particulier en présence d'*Ustilago sphaerogena*. Certains composés correspondent à des pics qui n'apparaissent pas régulièrement dans les milieux. Ils peuvent être produits, puis consommés, ou disparaître d'une récolte à l'autre. L'apparition et l'augmentation de la teneur en composés à temps de rétention élevés (t = 21,7 mn) pourraient correspondre à une production d'acides faibles de type phénolique, dans les échantillons de *Suillus granulatus* cultivé dans les deux milieux. L'emploi d'étalons de concentration connue a permis de quantifier certains composés comme l'acide oxalique, présent dans les échantillons de culture d'*Ustilago sphaerogena* en milieu Us, et qui atteint 10 ppm après 6 et 12 jours d'incubation.

La complexité des échantillons ne permet pas une définition précise de tous les composés séparés. Mais ces analyses chromatographiques d'acides aliphatiques dans les milieux de culture confirment bien, d'une part la perte d'acidité très forte en fin d'incubation en présence d'*Ustilago sphaerogena*, due à la disparition, et sans doute à la consommation, d'acides organiques forts, et d'autre part, l'augmentation d'acidité très faible, de type phénolique, en présence de *Suillus granulatus* en fin d'incubation.

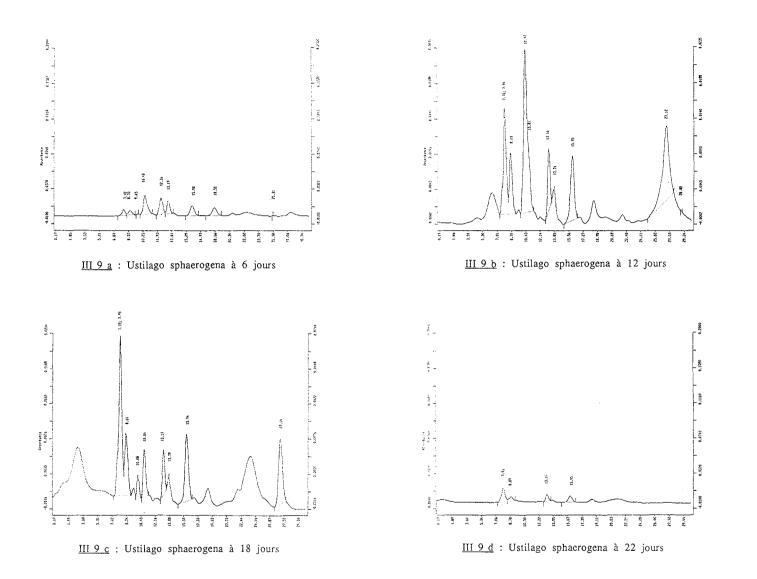


FIGURE III 9: Evolution des chromatogrammes HPLC pour Ustilago sphaerogena en milieu Us



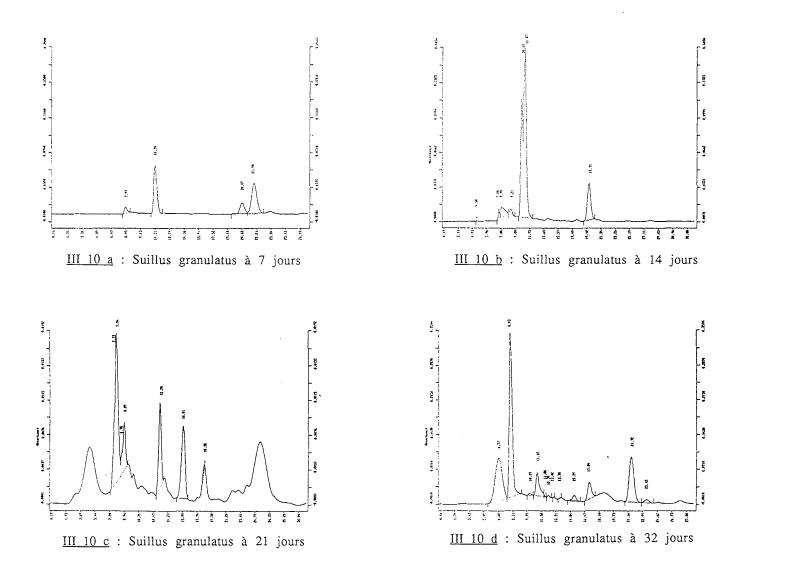


FIGURE III 10: Evolution des chromatogrammes HPLC pour Suillus granulatus en milieu Pa

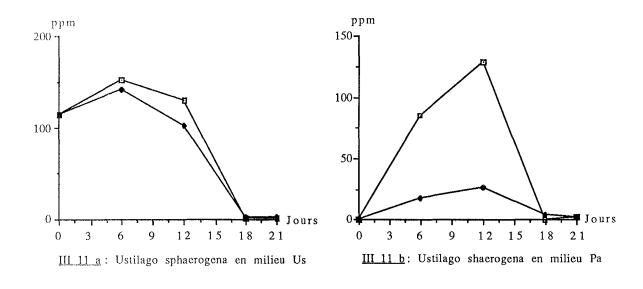
Les dosages enzymatiques d'acides citrique et malique ont été effectués sur tous les échantillons, et les résultats de ces dosages sont représentés sur les figures III.11. et III.12. Ces dosages montrent bien que *Suillus granulatus* et *Ustilago sphaerogena* produisent des acides citrique et malique dans leur milieu de culture, mais que cette production dépend des conditions de milieu. Ainsi, pour *Ustilago sphaerogena*, la production d'acide citrique est très importante dans le milieu Pa en l'absence de goethite. Par contre, dans ce même milieu, elle est beaucoup plus faible en présence de goethite. Dans le milieu Us, où cet acide est déjà apporté par le milieu, la différence entre les deux traitements est moins nette, mais on retrouve la même cinétique de production en début de culture et de disparition en fin d'incubation. Pour *Suillus granulatus*, ces productions d'acide citrique sont beaucoup plus faibles. Cet acide est ensuite consommé en cours de culture par le champignon, qui l'utilise comme source de carbone et d'énergie. En général, le maximum de production correspond à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire de croissance, puis la consommation de cet acide apparaît.

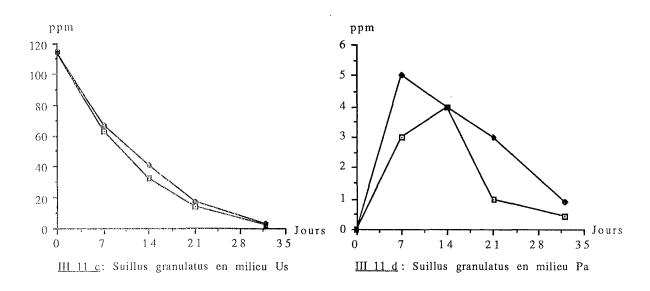
Bien qu'étant un peu moins nets, les résultats des dosages de l'acide malique (Figure III.12.) sont similaires à ceux de l'acide oxalique. Pour les deux champignons cultivés dans les deux milieux de culture, on distingue une première phase de production de l'acide malique, puis une deuxième phase de disparition de cet acide correspondant probablement à son absorption. *Suillus granulatus* produit plus d'acide malique que d'acide citrique.

Les acides organiques sont en fait produits simultanément avec un léger retard par rapport aux sidérophores pour *Ustilago sphaerogena*, mais on observe aussi très tôt la décroissance de leur teneur (dès le 12ème jour). Les comportements des champignons sont différents avec *Ustilago sphaerogena*, il y a diminution de l'acidité à compter du 12ème jour (Figure III.8.) ; avec *Suillus granulatus* il y a augmentation constante de l'acidité et maintien du pH jusqu'en fin d'incubation, malgré la consommation d'acides organiques.

7.- Altération microbienne par *Ustilago sphaerogena* de la goethite en fermenteurs, en conditions de pH contrôlé

Comme le pH du milieu modifie le métabolisme des microorganismes et la biodisponibilité du fer, et qu'un des objectifs de ce travail est de déterminer l'influence de la production de sidérophores sur la solubilisation du fer d'oxyhydroxydes ferriques en milieu calcimagnésique, nous avons effectué des expériences d'altération microbienne de la goethite, semblables aux précédentes, mais en conditions de pH contrôlé, en utilisant des dispositifs de type fermenteurs.





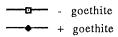
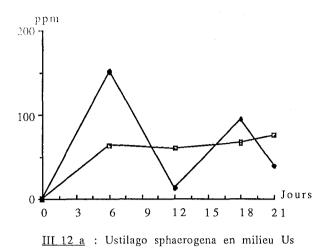
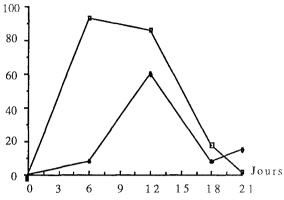


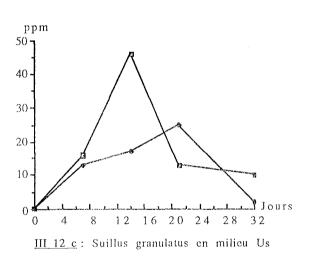
Figure III 11: Teneurs en acide citrique en ppm dans les différentes cultures d'Ustilago sphaerogena et de Suillus granulatus.

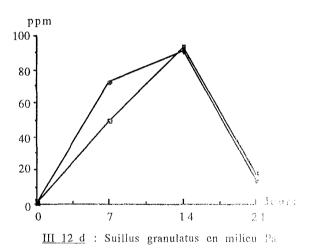
ppm





III 12 b: Ustilago sphaerogena en milieu Pa





- goethite + goethite

<u>Figure III 12</u>: Teneurs en acide malique en ppm dans les différentes cultures d' Ustilago sphaerogena et Suillus granulatus.

Deux fermenteurs Biolafitte contenant 1000 ml de milieu Us carencé en fer sont inoculés par 100 ml d'une préculture d'*Ustilago sphaerogena*, effectuée aussi dans un milieu carencé en fer. Les cultures sont conduites à 30°C en milieu saturé en air. Les mesures et régulations de la teneur en oxygène (pO₂ à saturation) et du pH sont assurées par le dispositif "Biolafitte". La goethite, contenue dans des sachets à dialyse (1 sachet de 100 mg de goethite par fermenteur) est ajoutée au dispositif. *Ustilago sphaerogena* a été retenu pour cette expérience en raison de sa croissance plus rapide.

Une expérience préliminaire, en condition de pH non contrôlé décrite ci-dessous, a été effectuée afin de s'assurer que le champignon avait le même comportement en fermenteur que dans les cultures en flacon plasma. Une culture d'*Ustilago sphaerogena* a été faite pendant huit jours pour les deux traitements suivants :

- (1) culture en milieu Us carencé en fer
- (2) culture en milieu Us carencé en fer, en présence de goethite.

Les résultats obtenus sont effectivement similaires aux résultats obtenus pour les incubations en batch. Une forte acidification se produit en début de culture, et alors que les biomasses produites ne sont pas différentes entre les deux traitements, on note une solubilisation de la goethite de 8 %, dont 13 % sont immobilisés dans la biomasse.

Cette expérience montre donc que le champignon se comporte de la même façon dans les fermenteurs et dans les flacons sérum, et qu'il solubilise la goethite en accumulant dans sa biomasse des quantités de fer nettement supérieures à ses besoins nutritionnels, la teneur en fer bioaccumulé étant de 345 µg par g de matière sèche.

La seconde expérience, à pH contrôlé maintenu à 7, ne s'est poursuivie que sur deux jours, et pour les deux mêmes types de traitements (avec et sans goethite). Les résultats présentés au tableau III.18. montrent une croissance plus importante en présence qu'en l'absence de goethite. Les quantités de fer en solution sont identiques dans les deux milieux ; en revanche, les quantités de fer immobilisé en raison d'une biomasse doublement plus importante sont aussi multipliées par deux.

Tableau III.18.- Biomasse en g, fer en solution et immobilisé en µg par flacon, après deux jours de culture en fermenteur d'Ustilago sphaerogena.

Traitements	Biomasse (g) /flacon	Fe soluble total (μg)/flacon	Fe immobilisé µg/flacon	μg Fe immobil. /g M.S.	Fe total solubilisé (μg)/flacon
Milieu carencé - goethite	2,50	15,6	78,28	31,31	93,88
Milieu carencé + goethite	5,95	15,6	136,93	23,01	152,53

Cette solubilisation et bioaccumulation du fer à des pH neutres (pH 7) ne fait pas intervenir l'acidité du milieu et est sans doute due à la production de sidérophores, qu'un test au chlorure ferrique a bien mis en évidence. La croissance est très faible dans le milieu carencé puisque la biomasse obtenue en fin d'expérience n'est que de 2,5 g, alors que l'inoculum est de 2,2 g, mais elle est accompagnée d'une forte production de polysaccharides (1 mg/ml de milieu). Dans le traitement en présence de goethite, le champignon ne semble donc solubiliser la goethite que pour ses besoins nutritionnels, et augmente sa biomasse en maintenant un taux de fer dans ses cellules proche de celui de l'inoculum, qui était de 22,4 µg de fer par gramme de matière sèche.

8.- Altération abiotique (chimique sensu stricto) de la goethite par des acides aliphatiques produits par les champignons

Comme au cours de leur croissance les champignons *Ustilago sphaerogena* et *Suillus granulatus* produisent des sidérophores mais aussi des acides aliphatiques, il a semblé intéressant de vérifier si de tels acides étaient, en conditions abiotiques (sans microorganisme), impliqués dans la dissolution de la goethite, et interviendraient dans la complexation du fer.

Les acides organiques retenus pour cette expérience sont les acides citrique, malique et oxalique, produits dans les milieux de culture par *Ustilago sphaerogena* et *Suillus granulatus*. Les acides sont utilisés dans des conditions semblables à celles des cultures de champignon, c'est-à-dire en flacon plasma de 250 ml, contenant 120 ml de solution. Les flacons sont bouchés au coton et mis à incuber à 24°C, après un autoclavage de 20 minutes à 120°C. Des prélèvements sont effectués à intervalle de temps régulier, pour mesurer la solubilisation du fer (ICP torche à plasma Jobin Yvon) et le pH. Trois répétitions sont effectuées pour chacun des traitements suivants :

- (1) solution de desféral (sidérophore témoin) à 83 ppm, soit 0,126 mM
- (2) solution d'acide oxalique à 10 ppm, soit 0,079 mM
- (3) solution d'acide malique à 300 ppm, soit 2,23 mM
- (4) solution d'acide citrique à 150 ppm, soit 0,71 mM.
- (5) solution d'acides oxalique, malique et citrique en mélange, respectivement à 10, 300 et 500 ppm.
- (6) solution du traitement (1) mélangée à celle du traitement (5).
- (7) et (8) milieux Us et Pa acidifiés à pH 3 avec HCl 0,1N.

Les résultats des dosages des quantités totales de fer solubilisé au cours du temps (Tableau III.19.) montrent que le desféral solubilise très rapidement et très nettement la goethite, alors que les acides organiques, oxalique, malique et citrique, n'ont pas d'action solubilisatrice importante sur la goethite lorsqu'ils sont testés indépendamment. Ensemble, ces acides complexants dissolvent la goethite, mais cependant moins efficacement que le desféral. En effet, en comparant la solubilisation en fonction des concentrations mises en oeuvre, il y a lieu de souligner que, pour des teneurs de 0,126 mM, avec trois fonctions hydroxamates par mole, le desféral a une action nettement plus rapide et plus efficace que les acides oxalique, malique et citrique apportés au milieu à raison de 0,079 mM, 2,23 mM et 0,71 mM respectivement ; ces acides disposent de deux (oxalique et malique) ou trois citrique) groupements carboxyliques. En termes d'efficacité solubilisatrice, le desféral apparaît aussi plus actif que les trois acides réunis, puisqu'à 28 jours d'incubation, 500 µg de fer seraient solubilisés par millimole de desféral, et seulement 28 µg par millimole de mélange de ces trois acides. L'acide citrique seul, qui paraît le plus efficace, ne solubiliserait que 16 µg de fer par millimole.

A 28 jours d'incubation, il n'y a que 64,8 µg de fer solubilisé dans le flacon, alors que pour une teneur de 0,126 mM de desféral, on pourrait s'attendre à une solubilisation équimolaire de fer soit 840 µg de fer solubilisé. Ceci peut s'expliquer par un effet stéréochimique dû à l'encombrement de la molécule, qui limite le contact avec la goethite, ou à l'encombrement de la surface et des sites de fixation et d'échange.

En début d'incubation (à 2 et 6 jours), la quantité de fer solubilisée par la solution (0,126 millimolaires) de desféral est significativement plus forte que celle solubilisée par le mélange des trois acides (3,02 millimolaires), puis cette tendance s'inverse. Ceci peut s'interpréter comme une action plus rapide et plus spécifique du sidérophore sur le fer ferrique de l'oxyhydroxyde cristallisé, par rapport aux acides organiques.

Les quantités de fer solubilisées sont bien plus faibles dans les expériences d'altération abiotique, avec pourtant des quantités de substances complexantes plus importantes, que les quantités solubilisées dans les milieux de culture : 331 µg et 317 µg de fer mobilisé (solubilisé et assimilé) par flacon de culture pour *Ustilago sphaerogena* et *Suillus granulatus*, dont respectivement 23 et 62 % restaient en solution en fin de culture, le reste étant bioaccumulé.

En effet, ces expériences de solubilisations abiotiques, strictement chimiques, ne tiennent pas compte de l'effet site de fixation et d'accumulation des microorganismes, qui modifie les équilibres chimiques et favorise la réaction dans le sens de la dissolution. Par ailleurs, les quantités d'acides trouvées dans les milieux de culture évoluent au cours de l'incubation et ne sont peut-être pas tout à fait celles qui sont intervenues dans la solubilisation. Il n'en reste pas moins que ces expériences d'altération de la goethite en conditions abiotiques ont mis en évidence la solubilisation efficace de la goethite cristallisée par les sidérophores, et l'effet plus limité des acides organiques. Ceci permet donc d'envisager une dynamique de solubilisation de la goethite en accord avec les résultats trouvés au

cours des incubations avec les deux champignons : une solubilisation initiale forte, sous l'effet des sidérophores produits en premier, puis un relai pris par des acides organiques.

Les résultats (Tableau III.19.) montrent aussi que l'action combinée des sidérophores et des acides organiques entraîne une solubilisation initiale très rapide et importante de la goethite, mais qu'en fin d'incubation, cette action simultanée perd de son efficacité par comparaison avec l'effet séparé des deux types de composés. Les résultats des traitements (7) et (8) (milieux nutritifs Us et Pa acidifiés avec HCl) confirment que la seule acidification n'est pas à l'origine de la dissolution de la goethite.

Tableau III.19.- Quantités de fer solubilisé (en µg Fe/flacon) au cours des altérations abiotiques de la goethite par différents composés complexants ou acides (nd = non dosé).

Temps (jours	2	6	10	15	20	28
DFOB (0,126 mM)	26,6	38,8	38	42,61	51	62,8
A. oxalique (0,079 mM)	nd	ε	ε	ε	ε	ε
A. malique (2,23 mM)	nd	6,4	5,5	6,5	8,5	9,3
A. citrique (0,71 mM)	nd	5,3	ε	ε	ε	11,6
A. ox. + cit. + mal.	14,4	30,6	36	46,8	58,4	85,6
A. $ox. + cit. + mal. + DFOB$	45,9	38,97	44	55,4	102,6	93
Milieu Us + HCl (0,1N)	nd	4	7,5	nd	18,3	30
Milieu Pa + HCl (0,1N)	nd	ε	ε	nd	16,6	29

9.- Evolution de la goethite au cours de l'altération microbienne

Diverses analyses chimiques (extraction par des réactifs spécifiques) et minéralogiques (diffraction des rayons X, spectrométrie Infra-rouge en réflexion diffuse à transformée de Fourier) ont été utilisées pour observer d'éventuelles modifications des propriétés de la goethite.

L'extraction au réactif de TAMM (tampon acide oxalique-oxalate d'ammonium, pH 3) (cf. Annexe XII) a été utilisée pour mettre en évidence des oxyhydroxydes amorphes du fer. Les résultats de ces extractions ne montrent pas de différence interprétable entre la goethite témoin, provenant d'un milieu stérile, et les goethites après incubation en présence d'*Ustilago sphaerogena* et de *Suillus granulatus*.

Les spectres de diffraction des rayons X effectués sur différents échantillons ne montrent aucune différence entre les traitements. Il n'y a, en effet, dans ce type de traitement, qu'un seul minéral, la goethite, sans étalon interne invariant ou peu variant, qui aurait permis une éventuelle comparaison, au moins semi-quantitative.

Les spectres infra-rouge en réflexion diffuse à transformée de Fourier ont été effectués sur les échantillons de goethite incubés en présence d'*Ustilago sphaerogena* dans le milieu Us, et sur des échantillons de goethite incubés avec différents composés complexants, acides, ou composants du milieu nutritif. Les spectres sont déterminés entre 4000 et 600 cm⁻¹ pour des échantillons préparés sous

forme de poudre (70 mg d'échantillon pour 370 mg de KBr). Les spectres présentés figure III.13. permettent d'observer, comparativement à la goethite initiale, une modification du profil spectral entre 2000 et 1000 cm⁻¹, traduisant une légère transformation de la surface du minéral. Trois hypothèses peuvent être dégagées afin d'expliquer l'origine de cette modification superficielle : (1) adsorption de l'acide citrique, probablement sous forme de sel hydraté (bandes 1595-1400 cm⁻¹). Cambier *et al.* (sous presse) ont montré que l'acide citrique s'adsorbe d'autant mieux sur les oxyhydroxydes que ceux-ci sont bien cristallisés ; (2) adsorption des phosphates du milieu nutritif ; (3) formation superficielle d'espèces du type oxyhydroxyde de fer hydraté et mal cristallisé (bandes 1600, 1401 et 1200 cm⁻¹). Cette modification, due à la seule présence des constituants du milieu de culture, peut très bien refléter la réalité des milieux naturels comme les sols, où les minéraux sont au contact avec des solutions chargées en composés organiques et minéraux et en interactions avec les organismes. Les minéraux, comme la goethite, ne sont plus des minéraux parfaitement purs, mais possèdent une surface sensiblement différente. Par ailleurs, dans les sols, le taux de substitution et les défauts de cristallisation de l'oxyhydroxyde amplifieront ce phénomène.

En fin d'incubation, en présence d'*Ustilago sphaerogena* en milieu Us, le spectre de la goethite a perdu deux massifs de pics (1500 et 1300 cm⁻¹, spectre d). L'interprétation va dans le sens d'une certaine amorphisation de la surface. Un spectre identique est d'ailleurs obtenu pour un échantillon de goethite incubé dix jours en présence de desféral (spectre e). Les résultats montrent bien que les acides organiques et les sidérophores peuvent s'adsorber sur la goethite et provoquer des modifications de surface similaires. D'autres résultats, non présentés, ont permis de vérifier que ni l'autoclavage ni le séchage, par comparaison avec une goethite séchée sous azote, effectués au cours de ces expériences, n'étaient responsables de ces modifications.

En conclusion de cette étude de la goethite résiduelle après incubation, on peut constater qu'à la dissolution du fer sous l'effet des champignons, s'ajoute une amorphisation de la goethite qui favorisera la fragilisation du minéral.

10.- Discussion et conclusion

Afin de représenter les processus mis en jeu au cours de ces solubilisations de la goethite, les différents résultats présentés ci-dessus ont été schématisés dans les figures III.14 et III.15. respectivement pour *Ustilago sphaerogena* en milieu Us et pour *Suillus granulatus* en milieu Pa.

Les courbes de mobilisation (solubilisation et bioaccumulation) du fer montrent bien que les deux champignons solubilisent efficacement le fer d'un oxyhydroxyde stable, bien cristallisé, comme la goethite. Cette solubilisation semble faire intervenir divers processus à relier à différentes voies métaboliques (production de sidérophores, d'acides aliphatiques et bioaccumulation par les champignons), mais elle est d'abord simultanée à la production de sidérophores par les deux champignons, et peut-être encore plus avec *Suillus granulatus*.

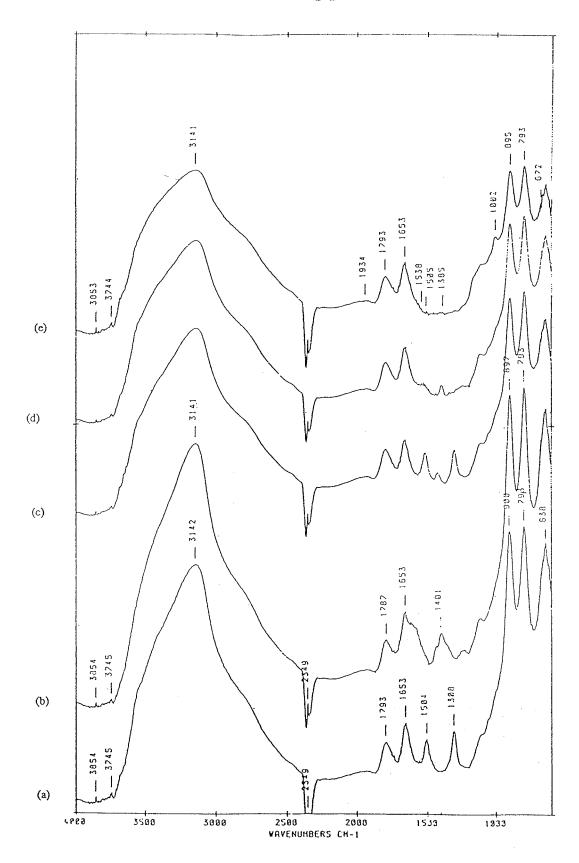
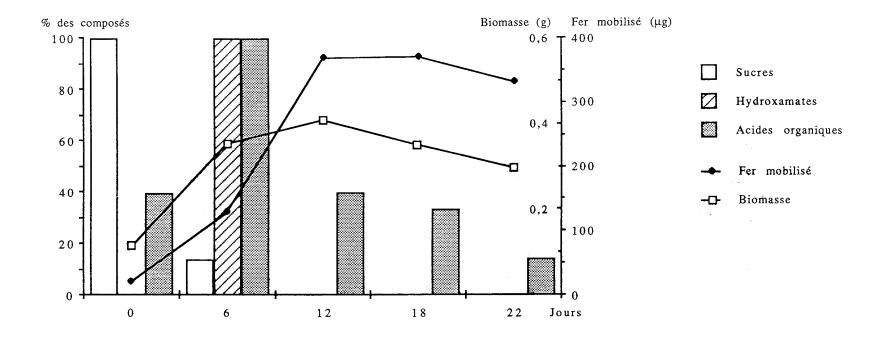


Figure III 13: Spectres Infra Rouge en réflexion diffuse à transformée de Fourrier de la goethite initiale (a), incubèe en présence d'acide citrique (b), d'acétate d'ammonium (c), d'Ustilago sphaerogena en milieu Us (d) et de desfèral (e).



- Les valeurs des hydroxamates correspondent aux dosages des hydroxamates par le test biologique utilisant Arthrobacter fluorescens JG9.
- Les valeurs des acides organiques correspondent aux dosages des acides malique et citrique par les méthodes enzymatiques (Boehringer Manheim).

Figure III 14: Consommation des sucres et production des composés complexants (acides organiques et hydroxamates) exprimées en pourcents de leur teneur maximale dans le milieu, croissance (en g de matière sèche par flacon de culture) et mobilisation du fer (en μg de fer par flacon) pour les incubations d'Ustilago sphaerogena en milieu Us.

L'intervention efficace des sidérophores, comparativement aux acides aliphatiques, a d'ailleurs été démontrée dans des expériences d'altération abiotique, comparant l'action de ces deux types de composés. Les acides aliphatiques n'interviendraient que secondairement dans des processus qui ne concernent que très peu la dissolution des phases bien cristallisées de la goethite. Ils pourraient être plutôt impliqués dans la dissolution de phases amorphes par une acidocomplexolyse non spécifique. Ils ne seraient que des agents de dissolution et de complexation accessoires. Cette production d'acides organiques est parallèle à la consommation des sucres et aux phases initiales importantes de croissance des champignons, alors que la production de sidérophores ne suit pas nécessairement. Elle présente en effet des cinétiques différentes, variables d'un champignon à l'autre, et très voisines de la dissolution et de la bioaccumulation du fer.

Les acides aliphatiques (malate, citrate) sont, avec les deux champignons, réutilisés sans doute comme source de carbone et d'énergie pendant les phases stationnaire ou de déclin. Les sidérophores peuvent être aussi réutilisés, mais alors simultanément à des phases de bioaccumulation du fer, comme observé avec *Ustilago sphaerogena* (Figure III.14.).

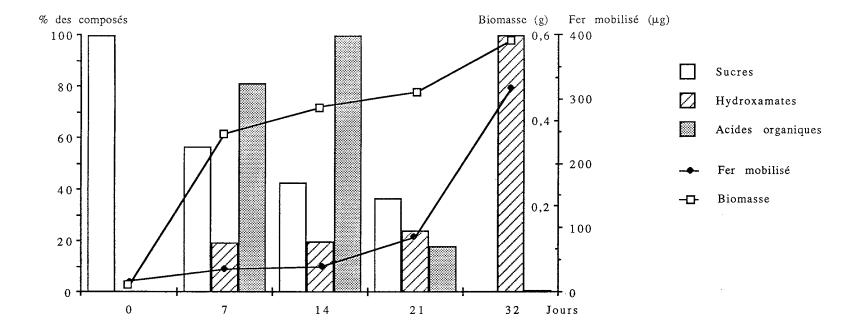
Cette production de sidérophores, liée à la carence en fer dans le milieu, se manifeste de façon très différente selon les champignons. Deux cinétiques sont observées. Avec *Ustilago sphaerogena*, les sidérophores ne sont produits qu'en début de culture, le milieu n'étant plus ensuite carencé en fer. Avec *Suillus granulatus*, les sidérophores sont produits en faible quantité en début de culture, malgré une forte croissance, puis plus fortement après 21 jours, alors que la teneur en fer du champignon est très faible. Les sidérophores produits sont de nature différente : *Ustilago sphaerogena* produit des hydroxamates et *Suillus granulatus* des hydroxamates et des phénolates.

A la dissolution de la goethite dans le milieu, s'ajoute une bioaccumulation qui peut être trois fois plus importante (Tableau III.20.) et dépasser nettement les besoins nutritionnels du champignon, surtout quand elle se manifeste intensément en phase stationnaire ou de déclin.

Tableau III.20.- Rapport des quantités de fer bioaccumulé par les champignons et solubilisé dans le milieu au cours de la croissance d'*Ustilago sphaerogena* et de *Suillus granulatus* dans les deux milieux de culture.

Prélèvements	1	2	3	4
Ustilago sphaerogena en milieu Us	1,32	0,83	1,13	3,23
<i>Ustilago sphaerogena</i> en milieu Pa	1,1	1,79	2,8	1,72
Suillus granulatus en milieu Pa	4,18	4,9	5	0,6
Suillus granulatus en milieu Us	2,92	2,11	2,48	1,08

Remarque: Les prélèvements 1, 2, 3 et 4 correspondent respectivement à 6, 12, 18 et 22 et 7, 14, 21 et 32 jours d'incubation pour *Ustilago sphaerogena* et *Suillus granulatus*.



- Les valeurs des hydroxamates correspondent aux dosages des hydroxamates par le test biologique utilisant Arthrobacter fluorescens JG9, ainsi qu'aux dosages des diphénols (Folin Denis, 1912) et des phénolates (Hathway, 1969).
- Les valeurs des acides organiques correspondent aux dosages des acides malique et citrique par les méthodes enzymatiques (Boehringer Manheim).

Figure III 15: Consommation des sucres et production des composés complexants (acides organiques et hydroxamates) exprimées en pourcents de leur teneur maximale dans le milieu, croissance (en g de matière sèche par flacon de culture) et mobilisation du fer (en μg de fer par flacon) pour les incubations de Suillus granulatus en milieu Pa.

L'allure des cinétiques d'accumulation du fer et son rapport à la solubilisation est aussi différente d'un champignon à l'autre. La bioaccumulation est toujours plus importante que la solubilisation (Tableau III.20.), mais pour *Ustilago sphaerogena*, cette bioaccumulation est nettement plus importante en fin de culture du champignon, en phase stationnaire et même de déclin.

La bioaccumulation pour *Ustilago sphaerogena* est d'ailleurs relativement plus importante quand la croissance est vraiment très faible en milieu Pa. La forme de ce fer immobilisé dans la biomasse n'a pas été déterminée, mais il pourrait y avoir, en fonction du type de sidérophores, formation de complexes organo-minéraux dans les cellules fongiques ou à leur surface. Le fer de ces complexes serait plus disponible que dans la goethite et constituerait alors une réserve plus facilement mobilisable.

Avec Suillus granulatus, la bioaccumulation est relativement très importante en début de croissance et le devient nettement moins en fin de croissance, quand le champignon produit dans le milieu des sidérophores en quantité plus importante. Il serait alors intéressant, dans des incubations de plus longue durée, de vérifier si, en phase stationnaire et de déclin, Suillus granulatus aurait pour les sidérophores en solution et pour la bioaccumulation, un comportement voisin d'Ustilago sphaerogena.

Avec ces deux champignons, la dissolution du fer dépasse leurs besoins nutritionnels. Les faibles croissances observées, en particulier pour *Ustilago sphaerogena* en milieu Pa, n'empêchent pas une forte dissolution du minéral (goethite), et ceci à des périodes différentes de la croissance. Mais la dissolution du fer de la goethite peut être sans doute légèrement décalée et en retard sur la croissance du champignon. Le rendement énergétique, ou l'indice énergétique global (biomasse produite/sucres consommés) est plus élevé pour *Suillus granulatus* que pour *Ustilago sphaerogena* dans les deux milieux et les différentes phases de la croissance, alors que le coefficient énergétique de mobilisation du fer (fer mobilisé/sucres consommés) est plus élevé pour *Ustilago sphaerogena*.

Grâce à leur production de composés de type sidérophore, qui doivent être considérés comme des agents de complexation spécifique du fer ferrique, les microorganismes peuvent dissoudre les oxyhydroxydes de fer, même bien cristallisés, et ensuite stocker ce fer en l'accumulant en quantités très importantes, les acides aliphatiques produits n'étant, dans ces processus de dissolution de la goethite, que des agents accessoires de dissolution-altération, malgré leur production en quantités importantes. Ils seraient plus impliqués dans la solubilisation des phases amorphes et celles d'éléments en traces, souvent présents dans ces oxyhydroxydes.

HI.- ALTERATION D'UN SILICATE FERROMAGNESIEN (biotite) ET D'UN SULFURE (pyrite) PAR USTILAGO SPHAEROGENA ET SUILLUS GRANULATUS OU LEUR PRODUITS DE METABOLISME

Le fer, dans les sols, peut être aussi fourni par d'autres minéraux, comme les silicates et les sulfures, communément rencontrés dans divers milieux. Dans les phyllosilicates ferromagnésiens comme la biotite, et dans les sulfures de fer comme la pyrite, ce fer est à l'état ferreux. La place qu'occupent ces formes du fer dans les sols nous a conduits, à titre de comparaison, à effectuer des expériences d'altération de ces minéraux par les deux champignons utilisés précédemment, et par leurs produits de métabolisme, ou des produits voisins, testés seuls en conditions abiotiques (sans microorganismes).

Il semble en effet important de déterminer, comparativement à leur action sur un oxyhydroxyde de fer (à fer ferrique) qui vient d'être présenté, le rôle que peuvent jouer ces champignons sur un silicate et un sulfure à fer ferreux, dans lesquels le fer est situé respectivement dans les structures octaédriques et cubiques.

A.- Alteration d'une biotite par les champignons Ustilago sphaerogena et Suillus granulatus

1.- Protocole expérimental

Le dispositif expérimental est semblable à celui décrit précédemment. Le champignons *Ustilago sphaerogena* et *Suillus granulatus* sont mis en culture dans 120 ml de milieur nutritif Us et Pa, placés dans des flacons plasma bouchés au coton. Chaque flacon reçoit 100 mg de biotite, placés dans un sachet à dialyse. Les cultures sont effectuées à 28°C et 24°C, à l'obscurité, sui agitateur rotatif (120 t/mn). Des prélèvements effectués régulièrement, dans trois répétitions par traitement, permettent de suivre les éléments fer et aluminium en solution par dosage par LC. l' (Torche à plasma, Jobin-Yvon).

Deux échantillons de biotite de même origine, le granite d'Horodberg, mais de granulométrie différente ($< 50 \, \mu m$ et $< 100 \, \mu m$) ont été utilisés. Leurs analyses chimiques figurent au tableau III.21.

Tableau III.21.- Analyse chimique de la biotite du granite d'Horodberg. Résultats exprimés en %0 (LEYVAL, 1981).

Elements	SiO ₂	Al_2O_3	Fe ₂ O ₃	MnO	MgO	CaO	N ₂ O	K ₂ O	${ m TiO}_2$
Biotite < 50 μm	404	145	186	2,9	138	11,3	1,9	77	31
Biotite < 100 μm	389	148	189	2,8	140	7,9	1,5	87	32

2.- Résultats

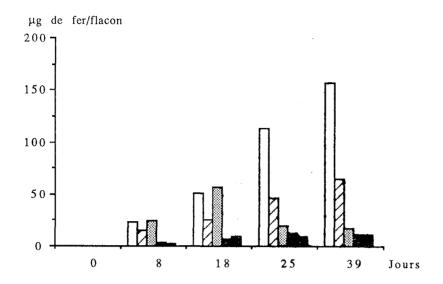
La figure III.16. présente les résultats de solubilisation du fer et de l'aluminium en présence ou en l'absence d'*Ustilago sphaerogena* et de *Suillus granulatus* après différents temps d'incubation, respectivement en milieux Us et Pa.

Les intervalles de confiance ne sont pas représentés sur la figure III.16., mais le test t de Student indique, pour les quantités de fer solubilisées, des différences hautement significatives entre les témoins et les incubations d'*Ustilago sphaerogena* en présence de chacune des biotites, ainsi qu'entre les incubations d'*Ustilago sphaerogena* en présence de biotite de taille inférieure à 50 µm et les incubations d'*Ustilago sphaerogena* en présence de biotite de taille inférieure à 100 µm. Pour *Suillus granulatus*, seuls les prélèvements à 8 et 18 jours présentent, pour le fer, des différences hautement significatives avec les témoins. Pour l'aluminium, les différences sont toujours hautement significatives.

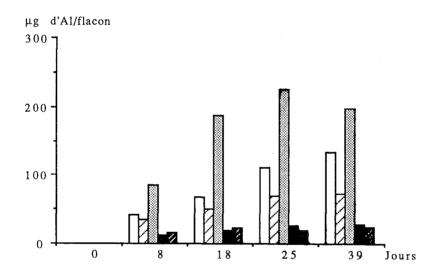
La biotite est plus sensible à l'action du milieu de culture que la goethite, ce qui correspond bien à sa stabilité moindre.

L'importance de la granulométric, déjà soulignée par différents auteurs (BERTHELIN, 1976, 1983) est ici encore mise en évidence, la solubilisation du fer et de l'aluminium de la biotite de taille inférieure à 50 µm étant respectivement 1,5 à 2,5 et 1,2 à 1,8 fois supérieure à celle de la biotite de taille inférieure à 100 µm sous l'action du champignon.

En revanche, la solubilisation du fer et de l'aluminium dans le cas de l'altération abiotique, ne semble pas toujours suivre exactement cette règle, mais les différences sont minimes. La solubilisation très légèrement plus importante de Al pourrait être due à une acidité légèrement plus faible dans les milieux stériles. Par ailleurs, la solubilisation microbienne de l'aluminium est plus importante que celle du fer, si l'on considère leur teneur initiale dans le minéral (cf. Tableau III.21.). Mais ces résultats de solubilisation dans le milieu ne tiennent pas compte des phénomènes d'immobilisation des éléments dans la biomasse. En effet, en fin de culture, Ustilago sphaerogena a immobilisé 2,12 µg et 0,42 µg d'aluminium par gramme de matière sèche, respectivement pour les incubations en présence de la biotite de taille inférieure à 50 µm et en présence de la la biotite de taille inférieure à 100 μm, et Suillus granulatus 133 μg d'Al par gramme de matière sèche. Mais l'immobilisation du fer est plus importante, en particulier pour Ustilago sphaerogena, puisque les taux de fer (en µg par g de matière sèche) sont de 820, 261 et 191 respectivement pour les incubations d' Ustilago sphaerogena en présence de biotite de taille inférieure à 50 µm, d' Ustilago sphaerogena en présence de biotite de taille inférieure à 100 µm et de Suillus granulatus en présence de biotite de taille inférieure à 100 μm. La croissance des deux champignons n'a pas été suivie, mais atteint, en fin de culture, 0,15 g par flacon pour les incubations d'Ustilago sphaerogena en présence des deux biotites, et 0,75 g par flacon pour les incubations de Suillus granulatus.



III 16 a: Quantités de fer solubilisées dans les différents traitements



III 16 b : Quantités d'aluminium solubilisées dans les différents traitements

Ustilago sphaerogena + biotite <50 μm
Ustilago sphaerogena + biotite <100 μm
Suillus granulatus + biotite < 100 μm
Témoin biotite < 50 μm
Témoin biotite < 100 μm

Figure III 16: Quantités de fer (III 16 a) et d'aluminium (III 16 b) solubilisées à partir de la biotite dans les cultures d'Ustilago sphaerogena et de Suillus granulatus.

En fin d'incubation, les quantités totales de fer mobilisées (solubilisées plus bioaccumulées) par flacon atteignent 280 μg (solubilisation de 2 %) pour *Ustilago sphaerogena* et 103 μg (solubilisation de 0,7 %) respectivement en présence de biotite de taille inférieure à 50 μm et de biotite de taille inférieure à 100 μm, alors que les quantités d'aluminium mobilisées par flacon ne sont que de 134 μg (solubilisation de 1,7 %) et 75 mg (solubilisation de 0,09 %) dans ces mêmes traitements. La solubilisation totale de fer à partir des biotites est donc supérieure à celle de l'aluminium, mais sans toutefois respecter le rapport des pourcentages initiaux de Fe₂O₃ et Al₂O₃ de la biotite (cf. Tableau III.21.). Pour *Suillus granulatus*, la mobilisation (solubilisation et bioaccumulation) du fer de la biotite est, cette fois-ci, inférieure à celle de l'aluminium, puisqu'en fin de culture elles atteignent respectivement 161 μg et 298 μg de fer et d'aluminium par flacon, soit des solubilisations de 1,2 et 3,8 %, mais avec une quantité d'élément bioaccumulé plus importante pour le fer (143 μg) que pour l'aluminium (99 μg).

Les actions solubilisatrices des deux champignons, et sans doute les mécanismes impliqués, sont différents puisque *Ustilago sphaerogena* mobilise plus de fer que d'aluminium, alors que c'est l'inverse pour *Suillus granulatus*. En revanche, tous deux bioaccumulent plus de fer que d'aluminium.

La présence de sidérophores (test au chromazurol) n'a été observée que pour les incubations témoins de *Suillus granulatus* menées sans biotite. On peut supposer que la biotite libérant du fer assez facilement n'a pas, de ce fait, provoqué une synthèse accrue de sidérophores, le milieu de culture n'ayant jamais été vraiment carencé en fer.

L'allure des phénomènes de dissolution et de bioaccumulation du fer et de l'aluminium dépend donc du champignon impliqué, de la taille des particules de biotite et de l'élément (Fe ou Al) considéré (cf. Figure III.17.).

La solubilisation du fer dans le milieu est toujours croissante avec *Ustilago sphaerogena*, mais passe par un maximum à 18 jours d'incubation avec *Suillus granulatus*, le fer étant plus mobilisé par *Ustilago sphaerogena*.

Pour l'aluminium, les courbes de dissolution ont la même allure, sauf pour la fin d'incubation avec *Suillus granulatus*, mais la solubilisation, nettement plus importante avec *Suillus granulatus*, conduit à considérer que les produits de métabolisme, excrétés dans le milieu et impliqués dans la solubilisation, sont différents, comme c'est le cas pour les sidérophores qu'ils synthétisent. Par ailleurs, la biotite et les éléments minéraux qu'elle libère dans le milieu peuvent sans doute modifier le métabolisme des champignons, ce qui mériterait d'être vérifié. L'évolution du pH des milieux est un peu différente selon le champignon ; le pH diminue progressivement pour les incubations de *Suillus granulatus* et atteint 4,2 en fin de culture, alors que pour *Ustilago sphaerogena*, le pH ne descend pas en dessous de 4,5 et remonte en fin de culture pour atteindre 5.

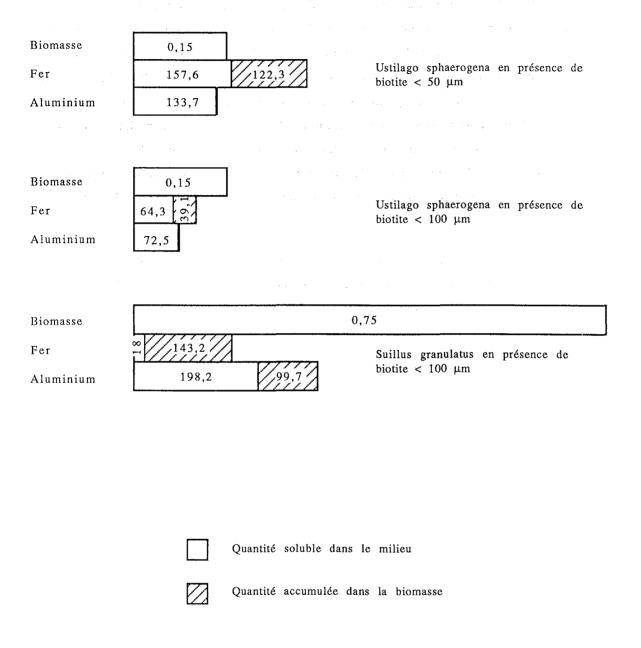


Figure III 17: Représentation schématique de la mobilisation du fer et de l'aluminium de la biotite, en µg de Fe et Al, pour les incubations d'Ustilago sphaerogena et de Suillus granulatus, en fonction de leur biomasse (en g).

B.- ALTERATION ABIOTIQUE DE LA BIOTITE ET DE LA PYRITE PAR DES PRODUITS DU METABOLISME (ACIDES ET SIDEROPHORES)

Le même protocole et les mêmes types de traitements que ceux décrits pour l'altération abiotique de la goethite ont été adoptés pour les études d'altération de la biotite et de la pyrite.

La taille de la biotite choisie est inférieure à $100~\mu m$. Deux pyrites ont été retenues, toutes deux de taille inférieure à $32~\mu m$, l'une, Es, originaire d'Espagne, la seconde, K_2 , des hauts plateaux péruviens.

1.- Altération abiotique de la biotite

Les solubilisations de Fe, Al, Mg, Si et K ont été suivies dans les traitements avec les acides oxalique, malique et citrique respectivement aux concentrations de 10, 300 et 150 ppm, soit des molarités de 0,079 mM, 2,23 mM et 0,71 mM. En ramenant les résultats obtenus à la concentration molaire de l'acide impliqué, on peut noter des actions solubilisatrices différentes des acides selon l'élément considéré.

Ainsi, l'acide citrique est l'agent solubilisateur le plus efficace vis-à-vis du fer : après 6 jours et 36 jours d'incubation, une millimole d'acide citrique a dissous 4,63 et 11,17 mg de fer en présence de 10 mg de biotite, alors que l'acide oxalique n'a dissous, au maximum, que 3,76 mg de fer par millimole, et l'acide malique 2,7 mg de fer par millimole.

En revanche, pour Al, Mg, Si et K, l'acide oxalique les solubilisera en quantités plus importantes et plus rapidement que les acides malique et citrique. La différence pour l'aluminium est très nette : à 6 jours, la quantité d'aluminium solubilisée sera de 6,61, 3,54 et 1,10 mg par millimole d'acide, respectivement pour les acides oxalique, citrique et malique. Cette tendance se confirmera jusqu'au 36ème jour d'incubation. Pour le magnésium, 2,31, 0,9 et 0,37 mg sont solubilisés à 6 jours, respectivement, par millimole d'acide oxalique, citrique et malique. Les acides oxalique et citrique ont à peu près la même action, à long terme, sur le silicium : 12,09 et 12,32 mg par millimole, alors que cette dissolution n'atteint que 2,75 mg par millimole d'acide malique, après 36 jours d'expérience. Enfin, pour le potassium, les différences sont aussi très nettes : à 6 jours, 7,6 ; 2,4 et 0,75 mg de potassium sont solubilisés par millomole d'acide oxalique, citrique et malique.

Le bilan de solubilisation, exprimé en pourcent d'éléments solubilisés par rapport aux teneurs initiales par une millimole d'acide, est résumé dans le tableau III.22.

Tableau III.22. - Pourcentages des différents éléments de la biotite solubilisés par une millimole d'acide citrique, oxalique et malique, après 36 jours d'incubation.

Eléments	Fe	Al	Mg	Si	К
Acide citrique	84,4	45,2	10,7	67,8	33,3
Acide oxalique	28,4	84,4	27,5	66,6	105
Acide malique	20,4	14	4,4	15,15	10,4

Au cours de ces incubations, le pH ne varie guère par rapport au pH initial, respectivement de 3,8, 3,2 et 3,1 pour les acides oxalique, citrique et malique, sauf en présence d'acide oxalique, où le pH remonte d'une unité et demie dès le premier prélèvement à 6 jours (pH final de 5,4).

Les résultats montrent bien une solubilisation de tous les éléments de la biotite par les acides aliphatiques, ce qui correspond à une attaque du réseau cristallin dans son ensemble.

Les sidérophores solubilisent aussi le fer de la biotite, sous forme ferrique ; 2,78 et 11,62 mg de fer sont solubilisés par millimole de desféral à 2 et 21 jours, soit une solubilisation de 21 et 87,8 %. La comparaison de ces chiffres avec les valeurs des solubilisations dues aux acides organiques indique une efficacité du desféral à solubiliser le fer moins importante dans le cas de la biotite que dans le cas de la goethite, mais encore meilleure cependant que les acides aliphatiques, même l'acide citrique, qui apparaît comme le plus efficace.

Le desféral peut aussi complexer l'aluminium : à 2 et 21 jours, 3,2 mg et 6,9 mg d'aluminium respectivement sont solubilisés par millimole de desféral, soit une solubilisation de $40\,\%$ et $88\,\%$ de la quantité d'aluminium initiale.

L'action de ces acides en conditions abiotiques confirme que les champignons solubiliseront facilement les différents éléments de la biotite par ces acides, qui sont des produits de leur métabolisme. A la différence de la goethite, des substances complexantes non spécifiques sont de bons agents d'altération de la biotite. Dans les sols, cette altération par acido-complexolyse est accrue pour les pompes à potassium que constituent les racines des plantes et les microorganismes (LEYVAL, 1981; LEYVAL et BERTHELIN, 1982), qui provoqueront la libération du potassium interfolaire et son échange par divers cations, et par la suite, la destruction du réseau cristallin.

2.- Altération abiotique de la pyrite

Les résultats de l'altération de la pyrite Es, exprimés en µg de fer par flacon pour les différents traitements, sont résumés dans le tableau III.23. Les trois traitements sont les suivants :

- pyrite en présence d'une solution de 0,126 mM de desféral
- pyrite en présence des trois acides organiques, oxalique, citrique et malique, respectivement à 0,079, 0,71 et 2,23 mM
- pyrite en présence du desféral et des acides organiques aux mêmes molarités.

Tableau III.23.- Quantités de fer solubilisées (en µg par flacon) au cours de l'altération de la pyrite Es par différents composés organiques.

Temps (jours)	2	5	9	15	21	28
Pyrite + desféral	59	114	269	180	88	89
Pyrite + ac. organiques	143	250	309	421	460	650
Pyrite + desféral + ac. organiques	152	198	192	255	187	209

Remarque : De ces valeurs ont été retranchées les valeurs des témoins, dues à l'altération de la pyrite dans l'eau.

Les résultats indiquent que la pyrite peut être solubilisée sous l'action des sidérophores avec une efficacité supérieure à celle de la combinaison des trois acides organiques, si les résultats sont exprimés en quantité de fer solubilisé par millimole de ligand. A 2 jours, une millimole de desféral solubilise 3,9 mg de fer de la pyrite, alors qu'une millimole de la solution combinée des trois acides solubilise 0,39 mg ; à 28 jours, ces valeurs seront respectivement de 5,88 mg et 1,80 mg.

Mais, alors que les quantités de fer solubilisées par les acides augmentent de façon constante au cours du temps, celles qui sont solubilisées par le desféral semblent se stabiliser et diminuer. Cette diminution peut s'expliquer par une reprécipitation, ou absorption, des complexes (fer-sidérophore) sur le minéral, diminuant par là même le nombre de sites de dissolution.

L'action combinée des sidérophores et des ligands n'est pas aussi importante que la somme de ces deux actions, considérées séparément, la diminution des sites d'échange et de dissolution pouvant en être la cause. L'altération de la seconde pyrite donne le même type de résultats (résultats non présentés).

Tout comme la biotite, la pyrite est donc une source de fer biodisponible pour les microorganismes, qui, par la production de composés complexants plus ou moins spécifiques, pourront assurer leurs besoins nutritifs en dissolvant ce composé dans des conditions de pH

différentes, liées au type de produits synthétisés.

IV.- CONCLUSION DE LA TROISIEME PARTIE

Les résultats d'expériences d'incubations en cuve d'*Ustilago sphaerogena* et de *Suillus granulatus* en présence d'oxyhydroxyde de fer bien cristallisé, la goethite, montrent bien que les produits de métabolisme de ces champignons peuvent dissoudre très efficacement ce minéral très stable. Parmi les produits excrétés, ce sont les sidérophores, soit de type hydroxamate pour *Ustilago sphaerogena*, soit de type hydroxamate et phénolate pour *Suillus granulatus*, qui sont les agents de dissolution actifs. Les acides aliphatiques n'interviennent que secondairement et seraient plutôt impliqués dans la dissolution des phases amorphes de ce minéral, la complexation d'éléments en traces, souvent présents dans cet oxyhydroxyde, et dans un rôle d'agents de complexation relai pour le fer. Des expériences en conditions abiotiques montrent, en effet, une dissolution plus rapide et plus efficace de la goethite par des sidérophores témoins (desféral) que par des acides aliphatiques complexants di- ou tricarboxyliques.

La comparaison des solubilisations du fer par les sidérophores d'une part et par les acides organiques d'autre part, à partir de la goethite, de la biotite et de la pyrite, suggère plusieurs remarques :

• que ce soit par les acides organiques ou par les sidérophores, l'altération des minéraux est fonction de leur composition minéralogique et géochimique. Sous l'action des sidérophores, l'altération sera croissante dans l'ordre suivant : goethite < biotite < pyrite, alors qu'avec les acides organiques, l'ordre croissant d'altération s'établira ainsi : goethite << pyrite << biotite (cf. Tableau III.24.)

Tableau III.24.- Solubilisation du fer (en mg de Fe) par millimole de ligand après 2 jours d'incubation (* = après 6 jours d'incubation).

	Goethite	Biotite	Pyrite
Desféral (1 mM)	1,76	2,78	3,9
Acides organiques (1 mM)	0,04	4,63*	0,4

Remarque: Pour la goethite et la pyrite, la solubilisation est celle des trois acides combinés, alors que pour la biotite, elle n'implique que l'acide citrique.

• en terme d'efficacité des agents complexants, en exprimant les résultats en mg de fer solubilisé par millimole de ligand, les sidérophores sont les plus efficaces pour les trois minéraux, sauf peut-être pour la biotite, où l'efficacité du desféral est équivalente à celle de l'acide citrique.

Dans le cas de minéraux à composition géochimique plus variée, comme la biotite, les sidérophores dissolvent aussi efficacement les éléments constitutifs, et en particulier l'aluminium.

Les cinétiques de production de ces sidérophores varient avec le type de champignon considéré. Ainsi, elles débutent dès la mise en incubation pour *Ustilago sphaerogena*, alors qu'elles ne se produisent qu'en fin de croissance pour *Suillus granulatus*, quand le champignon a des besoins plus importants en fer. Elles sont voisines de l'allure des cinétiques de dissolution du fer.

Les champignons accumulent aussi d'importantes quantités de fer dès le début de leur mise en culture. Cette bioaccumulation qui, dans les conditions expérimentales adoptées, dépasse quantitativement la solubilisation dans le milieu, peut aussi la précéder, comme c'est le cas pour *Suillus granulatus*, sans doute pour répondre aux besoins nutritionnels du champignon. Elle peut se poursuivre simultanément à la production de sidérophores et à la dissolution du fer, mais elle peut aussi leur succéder, comme observé avec *Ustilago sphaerogena*. Dans ces deux dernières phases, et encore plus dans la dernière, la bioaccumulation n'est plus alors qu'un processus d'accumulation indépendant de la croissance et des besoins nutritionnels et nettement en excès de ces besoins.

La production de sidérophores peut aussi se faire en l'absence de la croissance du champignon, alors que celui-ci consomme quand même des quantités relativement importantes d'énergie, comme pour *Ustilago sphaerogena* en milieu Pa.

Simultanément à l'accumulation de fer, on observe que certains champignons, comme *Suillus granulatus*, peuvent aussi accumuler d'importantes quantités d'autres éléments, comme par exemple l'aluminium.

Enfin, ces résultats permettent de souligner que les microorganismes, et en particulier des champignons mycorhiziens, peuvent, même en conditions de pH différent (acide ou légèrement alcalin), dissoudre des minéraux et se procurer du fer à partir des sources minérales naturelles, grâce à la production de ces agents complexants spécifiques que sont les sidérophores. Des ligands moins spécifiques peuvent aussi intervenir, mais auront une efficacité nettement plus limitée pour certains minéraux comme les oxyhydroxydes.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Les sidérophores d'origine microbienne, agents de complexation très efficaces du fer ferrique et du transport du fer chez les microorganismes eucaryotes et procaryotes (NEILANDS, 1974; EMERY, 1978 ...) n'ont été observés que plus récemment dans les sols (POWELL *et al.*, 1980; REID *et al.*, 1984). Etudiés d'abord pour leur intérêt en biochimie et physiologie microbienne, ils le sont maintenant pour les incidences qu'ils peuvent avoir sur la dynamique des populations microbiennes du sol, en particulier dans la rhizosphère, pour leurs actions synergiques ou antagonistes entre les différentes populations, liées à l'acquisition du fer (KLOEPPER *et al.*, 1980a; CLINE *et al.*, 1984, LEMANCEAU, 1988).

Par rapport à ces diverses études, les résultats présentés dans ce mémoire précisent les teneurs et la répartition de différents sidérophores dans les principaux compartiments des matières organiques de sols rhizosphériques et non rhizosphériques, acides et calcimagnésiques. Cette étude, que l'on peut qualifier d'écologie chimique, est liée à celle de l'écologie des populations bactériennes potentiellement responsables de cette production de sidérophores dans ces mêmes sols.

Les résultats montrent aussi que ces sidérophores à fonction hydroxamique et/ou phénolique, produits en particulier par des champignons ectomycorrhiziens, sont des agents très efficaces de l'altération de minéraux des sols, et en particulier de la dissolution du fer d'oxyhydroxydes ferriques bien cristallisés et très stables comme la goethite.

Deux sols, l'un acide (sol colluvial acide), l'autre calcimagnésique à pH neutre ou légèrement alcalin (rendzine), présentent pour les sols eux-mêmes et pour la rhizosphère d'une même plante, la mercuriale (*Mercurialis perennis*) poussant sur ces deux sols, une distribution sensiblement différente des populations bactériennes potentiellement productrices de sidérophores. Les bactéries se développant en présence de EDDHA sont, dans la rhizosphère, relativement plus nombreuses dans le sol colluvial acide que dans la rendzine. Cet effet rhizosphérique est encore plus marqué pour les *Pseudomonas fluorescens* (rapport R/S de 28 pour le sol colluvial acide et seulement de 0,6 pour la rendzine). Les conditions plus difficiles de mobilisation du fer dans la rendzine favoriseraient peut-être le développement de microorganismes plus efficaces à chélater le fer dans le sol non rhizosphérique, où les conditions nutritionnelles sont plus difficiles pour ces bactéries, que dans le sol rhizosphérique.

Les différences de distribution des microflores dans ces sols et dans les rhizosphères de mercuriale s'accompagnent aussi d'une différence dans la répartition des sidérophores. Il existe un effet rhizosphérique que révèlent des teneurs plus importantes en sidérophores (exprimées par rapport aux matières organiques des sols) dans les sols rhizosphériques que dans les sols non rhizosphériques. Cet effet est plus marqué dans la rendzine que dans le sol colluvial acide.

La plus grande partie des sidérophores se trouve associée aux composés humiques (fraction alcalinosoluble) et constitue un stock important peu biodisponible. Mais, relativement aux quantités de matières organiques, les teneurs en sidérophores sont importantes dans les fractions hydrosoluble et acidosoluble des matières organiques. Elles atteignent 2,6 à 2,7 et 0,7 à 1,6 μ g/mg de carbone respectivement dans les fractions hydrosoluble et acidosoluble des matières organiques du sol colluvial acide, et 1,6 à 2,3 et 14,6 à 17,2 μ g/mg de carbone dans les fractions hydrosoluble et acidosoluble des matières organiques de la rendzine. Ces résultats qui, en raison des méthodes de dosage spécifique utilisées, sous-estiment les teneurs en sidérophores, montrent bien que des sidérophores plus facilement biodisponibles sont présents en plus grandes quantités dans les fractions des matières organiques plus labiles de la rendzine. Par ailleurs, le sol colluvial acide dispose d'un stock plus important en sidérophores (20 à 34 μ g/g de sol contre 4 μ g/g de sol) que la rendzine dans le compartiment alcalinosoluble.

La définition d'un indice de potentialité des microorganismes à produire des sidérophores indiquerait une capacité à une meilleure production de sidérophores pour les microflores non rhizosphériques dans les deux sols. Mais cet indice, qui prend en compte l'ensemble des sidérophores dosés par la méthode biologique et qui ne tient pas compte de la biodégradation, de la bioaccumulation et du stockage dans les compartiments peu biodisponibles des matières organiques, doit être considéré avec prudence et devra être amélioré. Cet indice permet aussi d'observer un effet rhizosphérique sensiblement supérieur dans le sol calcimagnésique.

Les microorganismes et les plantes de ces deux sols pourront donc bénéficier de la production microbienne de sidérophores pour acquérir le fer nécessaire à leurs besoins nutritionnels. Les quantités trouvées dans les fractions hydrosolubles des sols devraient être, selon POWELL *et al.* (1980), suffisantes pour subvenir aux besoins en fer des plantes si celles-ci peuvent facilement utiliser ces formes du fer. Ces microorganismes producteurs de sidérophores pourraient être utilisés aussi dans le développement de méthodes de lutte biologique, en utilisant la compétition pour le fer de microflore non pathogène productrice de sidérophores efficaces contre des microflores pathogènes moins efficientes (SCHER et BAKER, 1980, 1982; LEONG, 1986; SCHROTH et HANCOCK, 1982; BAKKER *et al.*, 1986; KLOEPPER *et al.*, 1980b), ou bien encore par la recherche de facteurs responsables de la receptivité ou de la non réceptivité de sols à certains pathogènes (STÜTZ *et al.*, 1989; LEMANCEAU, 1988).

Les résultats des expériences d'altération de minéraux ferriques (goethite) et ferreux (biotite, pyrite) par des champignons, dont des champignons mycorrhiziens (*Suillus granulatus*), producteurs de sidérophores de types hydroxamate et phénolate, mais aussi d'acides complexants non spécifiques du fer ferrique (oxalique, citrique, malique), montrent bien le rôle très important, et particulièrement efficace, que jouent ces sidérophores dans la dissolution des oxyhydroxydes ferriques, minéraux particulièrement résistants. Ce sont en effet ces sidérophores qui dissolvent le plus efficacement la goethite. Ils dissolvent aussi efficacement les sulfures de fer (pyrite) et les silicates (biotite). Mais leur

efficacité vis-à-vis de la biotite est voisine de celle d'acides complexants comme l'acide citrique, alors qu'elle est encore nettement meilleure pour la pyrite. Dans des minéraux comme la biotite, les autres éléments constitutifs (Al, Mg, K, Si) sont aussi efficacement solubilisés. Ces champignons producteurs de sidérophores (*Suillus granulatus*, *Ustilago sphaerogena*) bioaccumulent aussi d'importantes quantités de fer en excès de leurs besoins nutritionnels, et peuvent ainsi, en parallèle de la solubilisation dans le milieu, stocker le fer sous une forme organo-minérale certainement plus facilement biodisponible.

La production de sidérophores dépend, bien sûr, des conditions nutritionnelles du milieu, en particulier des carences en fer, mais présente aussi, selon les organismes, des cinétiques très différentes. Ces dynamiques variables de la production et de la bioaccumulation du fer sont importantes, car elles peuvent avantager certains microorganismes producteurs de sidérophores aux dépens d'autres microorganismes moins performants.

Par ailleurs, en conditions de pH neutre ou faiblement alcalin, alors que les acides organiques ont peu ou pas d'efficacité sur la solubilisation de certains minéraux et de certains éléments comme, en particulier, le fer, les microorganismes producteurs de sidérophores pourront acquérir le fer nécessaire à leur croissance et pallier ces conditions de carence. Ces propriétés peuvent avoir de nombreuses conséquences sur la mobilisation du fer en milieu neutre ou alcalin et aussi, particulièrement, sur la nutrition en fer des plantes, puisque les microorganismes étudiés sont, pour certains, des champignons mycorrhiziens qui formeront des symbioses racinaires.

Il y aura lieu de déterminer si les plantes mycorrhizées et non mycorrhizées peuvent bénéficier, avec ou sans symbiose, de ces productions de sidérophores microbiens. Certains hydroxamates peuvent en effet subvenir aux besoins en fer de certaines plantes (CROWLEY et al., 1988), même s'il existe, selon les espèces, des différences d'acquisition en fonction des concentrations relatives en fer et en sidérophores dans les solutions du sol (CLINE et al., 1984). Les plantes pourraient alors bénéficier de ces sidérophores, soit indirectement, soit directement. Indirectement dans le cas où la compétition pour le fer dans un même environnement entraîne une pression de sélection au niveau des microorganismes, qui pourrait inhiber certaines populations phytopathogènes, alors que des bactéries favorisant la croissance (PGPR ou Plant Growth Promoting Rhizobacteria) et la mycorrhization seraient stimulées. Directement, si les plantes pouvaient absorber ces sidérophores microbiens ou bénéficier de leur production par la symbiose mycorrhizienne. Ces mécanismes pourraient améliorer la nutrition en fer des plantes, qui a été bien définie par les travaux de MARSCHNER et al. (1989), qui distinguent deux stratégies d'acquisition du fer. La première, réservée aux dicotylédones et monocotylédones autres que les graminées, réside dans l'augmentation d'une activité réductase membranaire (CASTIGNETTI et SMARELLI, 1986), ainsi qu'une excrétion de protons et de composés réducteurs de type phénolique. La deuxième stratégie développée par les graminées consiste dans la production de phytosidérophores particulièrement efficaces en conditions calcaires (TREEBY et al., 1989; ASWAD et al., 1988), conférant ainsi à ces plantes une supériorité vis-à-vis des phénomènes de chlorose (RÖHMELD et MARSCHNER, 1986). Néanmoins, comme les constantes d'affinité de ces phytosidérophores (10¹²) sont plus faibles que celles des sidérophores microbiens, ceux-ci pourraient, dans ce cas, prendre avantageusement le relai, d'autant plus que les phytosidérophores peuvent être bloqués par des métaux comme le cuivre et le zinc (SUGUIRA et NOMOTO, 1984).

Les sidérophores microbiens pourraient aussi être d'un grand intérêt pour pallier la chlorose du premier groupe (stratégie I de MARSCHNER *et al.* (1989)).

Enfin, d'un point de vue altération des minéraux et humification des matières organiques des sols, il y a lieu de souligner les points suivants : les sidérophores d'origine bactérienne et fongique, présents dans les différentes fractions des matières organiques, sont des agents très efficaces de la dissolution des oxyhydroxydes ferriques comme la goethite. Leur action est sans aucun doute, avec la réduction bactérienne, l'un des deux processus particulièrement efficaces de dissolution de ces minéraux dans les sols. Dans les différents compartiments des matières organiques (hydrosoluble, acidosoluble, alcalinosoluble), les seuls sidérophores déterminés par la méthode biologique, qui sous-estime nettement ces composés, représentent des teneurs de 0,3 à 17,2 pour mille.

Il semble donc que ces composés représentent une partie non négligeable fonctionnellement, mais aussi quantitativement, des matières organiques des sols.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- AKERS H.A., 1981 Multiple hydroxamic acid microbial iron chelators (siderophores) in soils. Soil Science, 135, 156-159.
- ALEXANDER M., 1977 Introduction to soil microbiology. J. Wiley New York, 467 p.
- ARNOW L.E., 1937 Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. J. Biol. Chem., 118, 531-537.
- ATKIN C.L., NEILANDS J.B. et PHAFF H.J., 1970 Rhodotorulic acid from species of *Leucosporidium*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Sporidiolobus* and *Sporobolomyces* and a new alanine containing ferrichrome from *Cryptococcus melibosum*. **J. Bacteriol.**, 103, 722-733.
- ATKINSON R.J., POSNER A.M. et QUIRK J.P., 1968 Crystal nucleation in Fe(III) solutions and hydroxide gels. J. Inorg. Nucl. Chem., 30, 2371-2381.
- AWAD F., ROMHELD V. et MARSCHNER H., 1988 Mobilization of ferric iron from a calcareous soil by plant-borne chelators (phytosiderophores). J. Plant Nutr., 11, 701-713.
- BAKKER P.A.H.M., LAMERS J.G., BAKKER A.W., MARUGG J.D., WEISBEEK P.J. et SCHIPPERS B., 1986 The role of siderophores in potato tuber yield increase by *Pseudomonas putida* in short rotation of potato. Neth. J. Pl. Path., 92, 249-256.
- BARBER D.A., 1973 Effects of microorganisms on the absorption of inorganic nutrients by plants. **Pest. Sci.**, 4, 367-373.
- BERGEY's-Manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Williams & Wilkins. 1984, 964 p.
- BERTHELIN J., 1976 Etude expérimentale des mécanismes d'altération des minéraux par des microorganismes hétérotrophes. Thèse Doct. Etat, Univ. Nancy I, 198 p.
- BERTHELIN J., 1977 Mechanisms of transformation of soil minerals by heterotrophic microorganisms. Science du sol, 1, 13-24.
- BERTHELIN J., 1983 Microbial weathering processes. *In*: Microbial Geochemistry (W.E. Krumbein ed.), Blackwell Scient. Publ., Chap. 8, 223-262.
- BERTHELIN J., 1988 Microbial weathering processes in natural environments. *In*: Physical and chemical weathering in geochemical cycles. (A. Lerman et M. Meybeck eds.), Kluwer Academic., 33-59.
- BOSSIER P. et VERSTRAETE W., 1986 Detection of siderophores in soil by a direct bioassay. Soil Biol. Biochem., 18, 481-486.
- BRISON M., 1978 Etude de l'humification par introduction *in situ* de maïs marqué (¹⁴C) comme traceur dans trois types d'humus sous hêtre. **Thèse Doct. 3ème Cycle, Univ. Nancy I**, 66 p.
- BRUCKERT S., 1970 Influence des composés organiques solubles sur la pédogenèse en milieu acide. **Ann. Agron., 21**, 421-452.
- BRUNELOT G., ADRIAN P., ROUILLER J., GUILLET B. et ANDREUX F., 1989 Determination of dissociable acid groups of organic compounds extracted from soils, using automated potentiometric titration. Chemosphere, 19, 1413-1419.

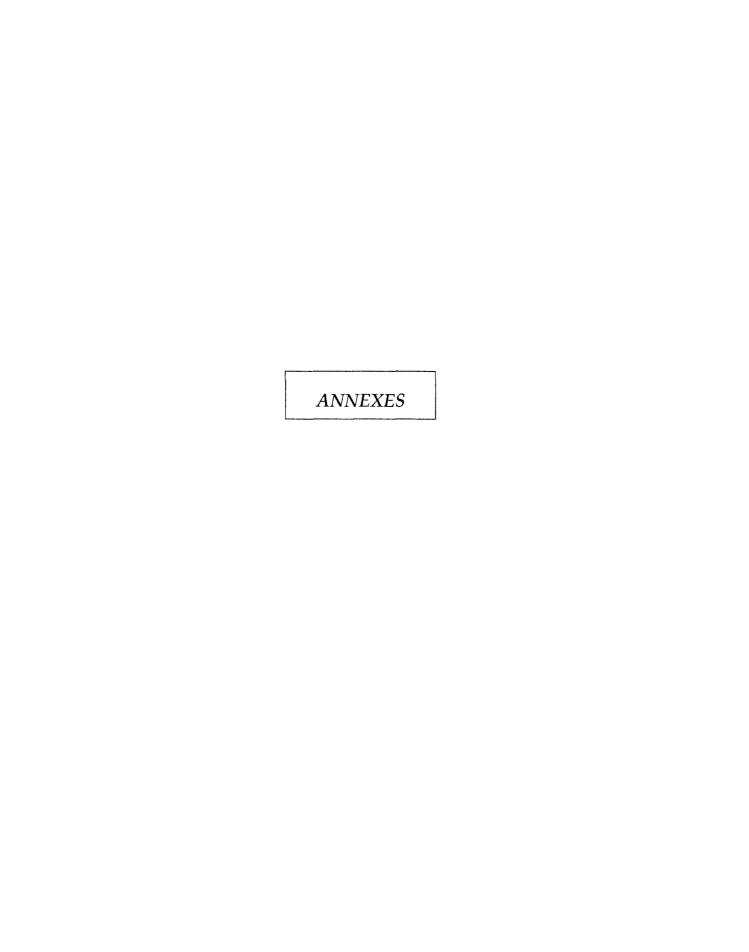
- BYERS B.R. et ARCENEAUX J.E.L., 1977 Microbial transport and utilization of iron. Microorganisms and minerals. M. Dekker New York, 215-249.
- CAMBIER P. et DUCAROIR J. Adsorption d'acide citrique sur les surfaces d'oxydes de fer, de kaolinites et d'un matériau ferrallitique (sous presse).
- CASTIGNETTI D. et SMARELLI J.J., 1986 Siderophores, the iron nutrition of plants, and nitrate reductase. Federation of European Biochemical Societies, 209, 147-151.
- CLEMENT A., 1977 Point sur certaines analyses foliaires. Note technique.
- CLINE G.R., POWELL P.E., SZANISZLO P.J. et REID C.P.P., 1982 Comparison of the abilities of hydroxamic, synthetic and other natural organic acids to chelate iron and other ions in nutrient solution. Soil Sci. Soc. Am. J., 46, 1158-1164.
- CLINE G.R., POWELL P.E., SZANISZLO P.J. et REID C.P.P., 1983 Comparison of the abilities of hydroxamic and other natural organic acids to chelate iron and other ions in soil. Soil Science, 136, 145-157.
- CLINE G.R., REID C.P.P., POWELL P.E. et SZANISZLO P.J., 1984 Effects of a hydroxamate siderophore on iron absorption by surflower and sorghum. Plant Physiol., 76, 36-39.
- COOK R.J. et ROVIRA A.D., 1976 The role of bacteria in the biological control of *Guanomyces* by suppressive soils. **Soil Biol. Biochem.**, **8**, 269-273.
- COOPER S.R., McARDLE J.V. et RAYMOND K.N., 1978 Siderophore electrochemistry: Relation to intracellular iron release mechanism. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75**, 3551-3554.
- CROWLEY D.E., REID C.P.P. et SZANISZLO P.J., 1988 Utilization of microbial siderophores in iron acquisition by oat. Plant Physiol., 87, 680-685.
- CSAKY T., 1948 On the estimation of bound hydroxylamine in biological materials. Acta Chemica Scandinavica, 2, 450-454.
- DOMMERGUES Y. et MANGENOT F., 1970 Ecologie microbienne du sol. Masson, Paris, 796 p.
- DUBOIS M.K.A., GILLES J.K., HAMILTON P.A., REBERS P.A. et SMITH F., 1956 Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem., 28**, 350-356.
- ECKER D.J., PASSAVANT C.W et EMERY T., 1982 Role of two siderophores in *Ustilago sphaerogena* regulation of biosynthesis and uptake mechanisms. **Biochim. Biophys. Acta, 730**, 242-249.
- EMERY T.F., 1967 Biochemistry, 6, 3858.
- EMERY T.F., 1971 Hydroxamic acids of natural origin. *In* : **Advances in Enzymology**, (A. Meister ed.), Interscience Publ., J. Wiley & sons, New York, **35**, 135-185.
- EMERY T.F., 1971 Role of ferrichrome as a ferric ionophore in *Ustilago sphaerogena*. **Biochemistry**, **10**, 1483-1488.
- EMERY T.F., 1974 Biosynthesis and mechanism of action of hydroxamate-type siderochromes. *In* : Microbial iron metabolism. Academic press, 107-123.
- EMERY T.F., 1978 The storage and transport of iron. *In*: **Metal ions in biological systems**, (H. Sigel ed.), Marcel Dekker, 7, 77-126.

- EMERY T.F., 1984 Reaction of cyanide with hydroxamic acid iron complexes to distinguish trihydroxamates from simple monohydroxamates. **Anal. Biochem., 139,** 301-304.
- EMERY T.F. et EMERY L., 1973 The biological activity of some siderochrome derivatives. Biochem. Biophys. Res. Comm., 50, 670-675.
- FEKETE F.A., SPENCE J.T. et EMERY T., 1983 A rapid and sensitive paper electrophoresis assay for the detection of microbial siderophores elicited in solid-plating culture. **Anal. Biochem., 131**, 516-519.
- FOLIN O. et DENIS W., 1912 J. Biol. Chem., 12, 239.
- FREDERICK C.B., SZANISZLO P.J., VICKREY P.E., BENTLEY M.D. et SHIVE W., 1981 Production and isolation of siderophores from the soil fungus *Epicoccum purpurascens*. **Biochemistry**, 20, 2432-2436.
- GEELS F.P., SCHMIDT E.D.L. et SCHIPPERS B., 1985 The use of 8-hydroxyquinoline for the isolation and prequalification of plant growth-stimulating rhizosphere pseudomonads. Biol. Fertil. Soils, 1, 167-173.
- GURY M., 1975. Livret guide. Excursion pédologique Vosges, 36 p.
- HATHWAY D.E., 1969 Plant phenols and tannins. *In* : Chromatographic and electrophoretic techniques (J. Smith ed.), Interscience Publ. Inc. New York, 3rd ed., 390-436.
- HELM D. van der, BAKER J.R., ENG WILMOT D.L., HOSSAIN M.B. et LOGHRY R.A., 1980 Crystal structure of ferrichrome and a comparison with the structure of ferrichrome A. J. Am. Chem. Soc., 102, 4224-4231
- HIDER R.C., 1984 Structure and Bonding. Springer Verlag, Berlin, 58, 25-87.
- KLOEPPER J.W., LEONG J., TEINTZE M. et SCHROTH M.N., 1980a Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. Nature, 286, 885-886.
- KLOEPPER J.W., LEONG J., TEINTZE M. et SCHROTH M.N., 1980b *Pseudomonas* siderophores. A mechanism explaining desease suppressive soils. Current Microbiol., 4, 317-320.
- LANKFORD C.E., 1973 Bacterial assimilation of iron. Critical Reviews in Microbiology, 273-331.
- LEMANCEAU P., 1988 Réceptivité des sols aux fusarioses vasculaires : étude critique des théories proposées. Thèse Université Lyon I, 99 p.
- LEONG J., 1986 Siderophores : their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. Ann. Rev. Phytopathol., 24, 187-209.
- LEYVAL C., 1981 Etude préliminaire de l'altération des minéraux par les microflores rhizosphériques de Graminées et d'Ericacées. Thèse 3ème Cycle, Univ. Nancy I, 116 p.
- LEYVAL C. et BERTHELIN J., 1982 Rôle des microflores symbiotiques et non symbiotiques sur l'altération de la biotite et la croissance du maïs (*Zea mays*) : influence des conditions du milieu. Science du sol, 1, 3-12.
- LEWIN R., 1984 How microorganisms transport iron. Science, 225, 401-402.
- LINDSAY W.L., 1979 Chemical equilibria in soils. Wiley Interscience, New York.
- LINDSAY W.L. et SCHWAB A.P., 1982 The chemistry of iron in soils and its availability to plants. J. Plant Nutr., 5, 821-840.

- LUCKEY M., POLLACK J.R., WAYNE R., AMES B.N. et NEILANDS J.B., 1972 Iron uptake in *Salmonella typhimurium*: utilization of exogenous siderochromes as iron carriers. J. Bacteriol., 111, 731-738
- MARSCHNER H., TREEBY M. et ROMHELD V., 1989 Role of root-induced changes in the rhizosphere for iron acquisition in higher plants. **Z. Pflanzenern. Bodenk., 152**, 197-204.
- MEISTER A., 1971 Advances in enzymology and related areas of molecular biology. Interscience Publ., J. Wiley & Sons, New York, Vol. 35.
- MEYER J.R. et LINDERMAN R.G., 1986 Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular arbuscular mycorhizal fungi and a plant growth promoting bacterium *Pseudomonas putida*. **Soil Biol. Biochem., 18**, 185-190.
- MILLER W.P., ZELAZNY L.W. et MARTENS D.C., 1986 Dissolution of synthetic crystalline and noncrystalline iron oxides by organic acids. **Geoderma**, 37, 1-13.
- NEILANDS J.B., 1952 J. Am. Chem. Soc., 74, 4846-4847.
- NEILANDS J.B., 1973 In: Inorganic Biochemistry. (G. Eichhorn ed.), Elsevier, Amsterdam, 167-202.
- NEILANDS J.B., 1974 Iron and its role in microbial physiology. *In* : **Microbial iron metabolism.** J.B. Neilands ed.), Academic Press, 3-34.
- NEILANDS J.B, 1981 Microbial iron compounds. Ann. Rev. Biochem., 50, 715-731.
- NEILANDS J.B., 1984 Methodology of siderophores. Structure and Bonding, Springer Verlag, Berlin.
- OLIVEIRA V. Lopes de, 1988 Interactions entre les microorganismes du sol et l'établissement de la symbiose ectomycorrhizienne chez le hêtre (*Fagus silvatica* L.) avec *Hebeloma crustuliniforme* (Bull ex Saint-Amans) Quél. et *Paxillus involutus* Batsch. ex. Fr. **Thèse Doct. univ. Nancy** I, 118 p.
- PAGE W.J. et HUYER M., 1984 Derepression of the *Azotobacter vinelandii* siderophore system, using iron-containing minerals to limit iron repletion. **J. Bact., 158, 4**96-502.
- PAYNE S.M., NIESEL D.W., PEIXOTTO S.S. et LAWLOR K.M., 1983 Expression of hydroxamate and phenolate siderophores by *Shigella flexneri*. J. Bact., 155, 949-955.
- PERRY D.A., ROSE S.L., PILZ D. et SCHOENBERGER M.M., 1984 Reduction of natural ferric iron chelators in disturbed forest soils. **Soil Sci. Soc. Am. J., 48**, 379-382.
- PHILIPPS J.M. et HAYMAN D.S., 1970 Improved procedures of clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular fungi for rapid assessment of infection. Trans. Brit. Mycol. Soc., 55, 158-161.
- POCHON J. et TARDIEUX P., 1962 **Techniques d'analyse en microbiologie du sol**. Ed. de la Tourelle, Saint-Mandé, 108 p.
- POWELL P.E., CLINE G.R., REID C.P.P. et SZANISZLO P.J., 1980 Occurence of hydroxamate siderophore iron chelators in soils. **Nature**, 287, 833-834.
- POWELL P.E., SZANISZLO P.J., CLINE G.R., REID C.P.P., 1982 Hydroxamate siderophore in the iron nutrition of plants. J. Plant Nutr., 5, 653-673.
- POWELL P.E., CLINE G.R., REID C.P.P., 1983 Confirmation of occurence of hydroxamate siderophores in soil by a novel *Escherichia coli* bioassay. **Appl. Environ. Microbiol.**, **46**, 1080-183.

- REEVES M.W., PINE L., NEILANDS J.B. et BALOWS A., 1983 Absence of siderophore activity in *Legionella* species grown in iron deficient media. **J. Bacteriol.**, **154**, 324-329.
- REID R.K., REID C.P.P., POWELL P.E. et SZANISZLO P.J., 1984 Comparison of siderophores concentrations in aqueous extracts of rhizosphere and adjacent bulk soil. **Pedobiologia**, **26**, 263-266.
- REID C.P.P., SZANISZLO P.J. et CROWLEY D.E., 1984 Siderophore involvement in plant iron nutrition. *In*: Proc. Nato Adv. Research Workshop: Iron, siderophore and plant desease, 17, 29-42.
- REID R.K., REID C.P.P. et SZANISZLO P.J Effects of synthetic and microbially-produced chelates on the diffusion of iron and phosphorus to a stimulated root in soil (sous presse).
- RIOUX C., CARLYLE JORDAN D. et RATTRAY J.B.M., 1983 Colorimetric determination of catechol siderophores in microbial cultures. **Anal. Chem., 133**, 163-169.
- ROBERT M., RAZZAGHE M.H., VICENTE M.A. et VENEAU G., 1979 Rôle du facteur biochimique dans l'altération des minéraux silicatés. **Science du sol, 2-3,** 153-174.
- ROBERT M. et BERTHELIN J., 1986 Role of biological and biochemical factors in soil mineral weathering. *In*: Interactions of soil minerals with natural organics and microbes. Soil Sci. Soc. Am. Spec. Pub., 17, 453-495.
- ROMHELD V. et MARSCHNER H., 1986 Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. Plant Physiol., 80, 175-180.
- SCHER F.M. et BAKER R., 1980 Mechanism of biological control in a fusarium suppressive soil. **Phytopathol.**, **70**, 412-417.
- SCHER F.M. et BAKER R., 1982 Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. **Phytopathol.**, 72, 1567-1573.
- SCHROTH M.N. et HANCOCK J.G., 1982 Disease suppresive soil and root colonizing bacteria. Science, 216, 1376-1381.
- STEVENSON F.J. et ARDAKANI M.S., 1972 Organic reactions involving micronutrients in soils or micronutrients in agriculture. Soil Sci. Soc. Am.
- SCHWYN B. et NEILANDS J.B., 1987 Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Anal. Biochem.**, 160, 47-56.
- STUTZ E., KAHR G. et DE FAGO G., 1989 Clays involved in suppression of tobacco black root rot by a strain of *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biol. Biochem., 21**, 361-366.
- SUGIURA Y. et NOMOTO K., 1984 Phytosiderophores : structures and properties of mugineic acids and their metal complexes. Structure and Bonding, Springer Verlag, Berlin, 58, 107-135.
- SZANISZLO P.J., POWELL P.E., REID C.P.P. et CLINE G.R., 1981 Production of hydroxamate siderophore iron chelators by ectomycorhizal fungi. Mycologia, 73, 1158-1174.
- TREEBY M., MARSCHNER H. et ROMHELD V., 1989 Mobilization of iron and other micronutrient cations from a calcareous soil by plant-borne, microbial, and synthetic metal chelators. Plant and Soil, 114, 217-226.
- VANCURA V., 1980 Fluorescent Pseudomonads in the rhizosphere of plants and their relation to root exudates. Folia Microbiol., 25, 168-173.

- VANDENBERGH P.A., GONZALEZ C.F., WRIGHT A.M. et KUNKA B.S., 1983 Iron chelating compounds produced by soil Pseudomonads: correlation with fungal growth inhibition. Appl. Environ. Microbiol., 46, 128-132.
- WAID J.S., 1975 Hydroxamic acids in soil systems. *In*: Soil Biochemistry. Chap. 4, 65-101.
- WINKELMANN G., 1979 Surface iron polymers and hydroxy acids. A model of iron supply in sideramine-free fungi. **Arch. Microbiol.**, **121**, 43-51.
- WINKELMANN G., 1984 Iron uptake systems in fungi. *In*: Proc. Nato Adv. Research Workshop: Iron, siderophore and plant desease, 17, 7-20.



ANNEXE I

DENOMBREMENT DES BACTERIES (exprimé en u.f.c. x 10⁶ par gramme de sol) DANS LA RENDZINE DU SITE DE LA CREDENCE (Tableau a) ET DANS LE SOL COLLUVIAL ACIDE DE LONGEMER (Tableau b)

Tableau a. Rendzine

	Bactéries	Pseudomonas	Bactéries productrices de sidérophores (Na+EDDHA)				
	totales (NA)	fluorescens (KB)	1,08mM	2,13mM	4,11mM	9,24mM	
A	28,856	0,433	2,886	1,443	0,173	0,004	
В	35,762	0,397	5,563	1,987	0,722	0,013	
C	32,457	0,155	3,926	1,159	0,247	0,007	
D	10,886	0,295	1,400	0,502	0,047	0,004	
E	8,914	0,408	1,619	0,350	0,087	0,005	
F	9,451	1,018	1,788	1,696	0,093	0,006	

Tableau b. Sol brun acide colluvial

	Particles David		Bactéries productrices de sidérophores (Na+EDDHA)				
	Bactéries totales (NA)	Pseudomonas fluorescens (KB)	1,08mM	2,13mM	4,11mM	9,24mM	
A	3,734	0,396	0,673	0,361	0,098	0,013	
В	3,461	0,425	1,040	0,998	0,446	0,047	
C	5,213	0,035	0,950	0,601	0,194	0,042	
D	4,060	0,002	0,189	0,066	0,035	0,019	
E	4,637	0,046	0,185	0,155	0,105	0,015	
F	1,749	0,005	0,118	0,044	0,010	0,011	

ANNEXE II

METHODE DE MINERALISATION DE LA MATIERE SECHE VEGETALE OU MICROBIENNE (Clément, 1977)

Dans des fioles cylindro-coniques de 125 ml, on introduit 12,5 ml d'eau oxygénée (H_2O_2 Electro RP) pour 500 mg d'échantillon broyé (ou 200 mg pour les racines) et on laisse digérer une nuit.

10 ml d'acide perchlorique RP sont alors ajoutés. Le dispositif antipertes est adapté sur les fioles, et après une nuit au moins, la minéralisation est terminée par une ébullition sur plaque chauffante, jusqu'à ce que l'acide perchlorique prenne un aspect jaunâtre et encore en ébullition. Le minéralisat obtenu est filtré pour éliminer le précipité de silice formé. K, Fe, Mg, Ca, Mn, Al, Na et P sont alors dosés par spectrophotométrie d'émission à plasma.

ANNEXE III

DOSAGE COLORIMETRIQUE DES SUCRES NEUTRES

COLORIMETRIE AU PHENOL (Dubois et al., 1956)

Matériel :

- Tubes à essai
- Bain-marie à 30°C
- Photocolorimètre (485 nm)

Réactifs:

- Phénol (C₆H₅OH), solution à 5 % dans H₂O
- Acide sulfurique (H₂SO₄), 36N
- Glucose (CHO(CHOH)_{4CH2}OH), 100 mg/l dans H₂O

Protocole:

A 2 ml de solution à doser, ainsi que sur une solution étalon de glucose diluée de 1 à 10 fois, on ajoute 1 ml de solution de phénol et on agite.

On additionne alors rapidement 5 ml de $\rm H_2SO_4$, ce qui permet un mélange efficace et une distribution uniforme de la température. Après 10 minutes, on agite les tubes et on les place à 30°C pendant 20 minutes. Les concentrations sont calculées par référence à la courbe étalon obtenue avec le glucose.

ANNEXE IV

DOSAGE DES PHENOLS PAR LE REACTIF DE FOLIN-DENIS

REACTIFS

- Réactif de Folin-Denis pour le dosage des phénols (ne pas prendre le réactif de Folin-Denis pour le dosage de l'acide urique).
- Solution saturée de carbonate de sodium : dissoudre 30 g de Na_2CO_3 anhydre dans 100 ml d'eau, à environ $80^{\circ}C$; laisser refroidir une nuit ; provoquer la cristallisation en introduisant un cristal de Na_2CO_3 10 H_2O ; après cristallisation, filtrer sur laine de verre.

PROTOCOLE

Dans un tube à essais, introduire dans l'ordre :

- 2 ml de solution à doser contenant 0,2 à 1 mM/l de phénol
- 15 ml d'eau
- 1 ml de réactif de Folin-Denis
- 2 ml de solution saturée de Na₂CO₃

Agiter, attendre 10 minutes. Faire la lecture à 750 nm (si on attend trop longtemps, il y a apparition de microcristaux faussant la densité optique).

Gamme étalon: acide protocatéchique 0,2; 0 4; 0,6; 0,8 et 1 mM/l.

COMMENTAIRES

La coloration est variable suivant les phénols. D'autres substances comme les quinones se colorent aussi.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

FOLIN O et DENIS W., 1912 - J. Biol. Chem., 12, 239.

RIBEREAU-GAYON P., 1968 - Les composés phénoliques des végétaux. Dunod Paris, 254 p.

ANNEXE V

ANALYSE DES ACIDES ORGANIQUES ALIPHATIQUES PAR HPLC

Les acides organiques aliphatiques sont analysés par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

La colonne utilisée est garnie avec une résine échangeuse de cations, sous forme H⁺ de type Aminex NH $_2$ 9 µm (Bio-Rad). Les acides aliphatiques séparés par chromatographie d'exclusion et de partage sont détectés par spectrophotométrie à 210 nm sous les conditions suivantes :

éluant: H₂SO₄ 0,010N
débit: 0,5 ml/mn
température: 65°C

ANNEXE VI

DOSAGES ENZYMATIQUES DE SUBSTANCES ORGANIQUES

Les dosages enzymatiques du glucose, de l'acide citrique et de l'acide malique ont été effectués respectivement à l'aide des kits Test-Combination Glucose (Réf. 716 251), Test-Combination Citric Acid (Réf. 139 076) et Test-Combination L-malic Acid (Réf. 139 068) (Boehringer, Mannheim GMBH).

♦ Dosage du glucose

Le glucose est dosé spécifiquement par spectrophotométrie du NADPH formé selon les réactions :

hexokinase

glucose + ATP → glucose 6 P + ADP

glucose 6 Pdéshydrogénase

glucose-6-P + NADP+ \rightarrow gluconate 6-P + NADPH + H+

La quantité de NADPH est proportionnelle à celle du glucose, elle est évaluée par absorption à 365 nm.

♦ Dosage de l'acide citrique

L'acide citrique est dosé spécifiquement par spectrophotométrie du NADH selon les réactions :

citrate lyase

citrate → oxaloacétate + acétate

(l'oxaloacétate peut se décarboxyler en pyruvate)

malate déshydrogénase

oxaloacétate + NADH + H⁺ → L-malate + NAD⁺

lactate déshydrogénase

pyruvate + NADH + H⁺ \rightarrow L-lactate + NAD⁺

La quantité de NADH disparu est proportionnelle à celle du citrate, elle est évaluée par adsorption à 365 nm.

♦ Dosage de l'acide malique

L'acide malique est dosé spécifiquement par spectrophotométrie de NADH formé selon la réaction :

 $\begin{array}{ccc} & & L\text{-malate d\'eshydrog\'enase} \\ L\text{-malate} + NAD^+ & \rightarrow & oxaloac\'etate + NADH + H^+ \end{array}$

L'équilibre de cette réaction est déplacé vers la formation de NADH par la transformation de l'oxaloacétate, en présence de glutamate, en aspartate et α -cétoglutarate selon la deuxième réaction :

Glutamate-oxaloacétate transaminase

oxaloacétate

L-aspartate + α -cétoglutarate

ANNEXE VII

Tableau VII.1. Evolution des quantités de fer solubilisé et immobilisé (en µg par flacon de culture); pH et biomasse (en g/flacon) pour les incubations témoins d'Ustilago sphaerogena en l'absence de goethite en milieu US.

Temps en jours	0	6	12	18	22
Fer total soluble (μg)	12	19,21 ± 8,59	7,84 ± 2,16	5,46 ± 1,42	7,13 ± 0,32
Fer total immobilisé (µg)	9	31,08 ± 16,39	5,84 ± 2,9	5,67 ± 1,17	7,13 ± 0,32
pН	6,5	3,56 ± 0,02	3,59 ± 0,14	4,2 ± 0,03	5,05 ± 1,01
Biomasse (g)	0,113	0,353 ± 0,024	0,409 ± 0,052	0,350 ± 0,016	0,295 ± 0,024

Tableau VII.2.- Evolution des quantités de fer solubilisé et immobilisé pH et biomasse (en g/flacon) pour les incubations témoins d'Ustilago sphaerogena en présence de goethite en milieu US.

Temps en jours	0	6	12	18	22
Fer total soluble (μg)	12	55,85 ± 13,58*	200,51 ± 6,04**	173,75 ± 5,52**	78,19 ± 53,50
Fer total immobilisé (µg)	9	73,81 ± 25,54	167,99 ± 26,54**	196,62 ± 16,19**	253,16 ± 42,61**
рН	6,5	3,60 ± 0,25	3,66 ± 0,12	4,04 ± 0,05*	5,56 ± 0,09
Biomasse (g)	0,113	0,40008 0,024	0,409 ± 0,014	0,374 ± 0,005	0,272 ± 0,048

ANNEXE VIII

Tableau VIII.1. Evolution des quantités de fer solubilisé et immobilisé (en µg par flacon de culture); pH et biomasse (en g/flacon) pour les incubations témoins d'Ustilago sphaerogena en l'absence de goethite en milieu Pa.

Temps en jours	0	6	12	18	22
Fer total soluble (µg)	12	7,52 ± 1,59	7,52 ± 0,69	6,56 ± 1,00	8,10 ± 1,00
Fer total immobilisé (µg)	16,2	20,98 ± 24,03	0,14 ± ε	6,92 ± 7,2	8,22 ± 11,7
рН	6,5	3,11 ± 0,03	3,13 ± 0,03	3,24± 0,04	3,36 ± 0,08
Biomasse (g)	0,204	0,225 ± 0,031	0,195	0,230 ± 0,038	0,177 ± 0,031

Tableau VII.2.- Evolution des quantités de fer solubilisé et immobilisé pH et biomasse (en g/flacon) pour les incubations témoins d'*Ustilago sphaerogena* en présence de goethite en milieu Pa

Temps en jours	0	6	12	18	22
Fer total soluble (μg)	12	55,68 ± 19,10**	115,48 ± 10,53**	90,94 ± 14,80**	135,22 ± 43,7
Fer total immobilisé (μg)	16,2	61,44 ± 29,05	207,06 ± 27,12**	255,66 ± 72,71**	233,30 ± 57,11**
рН	6,5	3,06 ± 0,02	3,10 ± 0,005	3,23 ± 0,01*	3,32 ± 0,02
Biomasse (g)	0,204	0,234 ± 0,051	0,265 ± 0,051	0,246 ± 0,018	0,239 ± 0,056

ANNEXE IX

Tableau IX.1. Evolution des quantités de fer solubilisé et immobilisé (en µg par flacon de culture); pH et biomasse (en g/flacon) pour les incubations témoins de Suillus granulatus en l'absence de goethite en milieu Pa.

Temps en jours	0	7	14	21	32
Fer total soluble (μg)	12	4,85 ± 1,48	3,94 ± 0,08	6,01 ± 0,92	8,89 ± 2,07
Fer total immobilisé (µg)	4,23	14,39 ± 19,6	4,93 ± 2,22	9,12 ± 3	17,23 ± 11,05
рН	6,5	3,03 ± 0,03	3,18 ± 0,02	3,25 ± 0,04	3,38 ± 0,02
Biomasse (g)	0,015	0,359 ± 0,003	0,369 ± 0,012	0,448 ± 0,003	0,560 ± 0,011

Tableau IX.2.- Evolution des quantités de fer solubilisé et immobilisé pH et biomasse (en g/flacon) pour les incubations témoins de Suillus granulatus en présence de goethite en milieu Pa.

Temps en jours	0	7	14	21	32
Fer total soluble (µg)	12	6,76 ± 0,9	6,56 ± 0,27**	13,40 ± 2,65**	197,90 ± 82,39*
Fer total immobilisé (μg)	4,23	28,27 ± 16,8	32,51 ± 4**	70,36 ± 17,69**	119,58 ± 35,47**
рН	6,5	3,05 ± 0,03	3,19 ± 0,01	3,27 ± 0,02*	3,43 ± 0,03
Biomasse (g)	0,015	0,369 ± 0,01	0,432 ± 0,04	0,466 ± 0,11	0,588 ± 0,027

ANNEXE X

Tableau X.1. Evolution des quantités de fer solubilisé et immobilisé (en µg par flacon de culture); pH et biomasse (en g/flacon) pour les incubations témoins de Suillus granulatus en l'absence de goethite en milieu US.

Temps en jours	0	7	14	21	32
Fer total soluble (μg)	12	3,94 ± 1,81	3,44 ± 0,34	4,68 ± 0,56	7,50 ± 2,85
Fer total immobilisé (μg)	4,23	23,70 ± 15,37	11,07 ± 3,15	17,94 ± 13,6	6,77 ± 19,9
рН	6,5	5,46 ± 0,05	5,8 ± 0,02	5,75 ± 0,13	4,88 ± 0,16
Biomasse (g)	0,115	0,299 ± 0,016	0,375 ± 0,03	0,516 ± 0,059	0,496 ± 0,048

Tableau X.2.- Evolution des quantités de fer solubilisé et immobilisé pH et biomasse (en g/flacon) pour les incubations témoins de Suillus granulatus en présence de goethite en milieu US.

Temps en jours	0	7	14	21	32
Fer total soluble (μg)	12	3,75 ± 0,35	3,94 ± 0,6	4,36 ± 0,48	46,70 ± 9,10**
Fer total immobilisé (µg)	4,23	10,95 ± 3,61	8,34 ± 1,55	10,85 ± 4,75	50,89 ± 7,02*
pН	6,5	5,51 ± 0,02	5,85 ± 0,03	5,79 ± 0,01	4,35 ± 0,08*
Biomasse (g)	0,115	0,238 ± 0,013**	0,323 ± 0,029	0,490 ± 0,011	0,370 ± 0,017

ANNEXE XI

TENEURS EN PHENOLATES (équivalent acide 2,3 dihydroxybenzoïque) en mM/l DANS LES DIFFERENTES INCUBATIONS D'USTILAGO SPHAEROGENA et SUILLUS GRANULATUS

Echantillons		Prélèvement 1	Prélèvement 2	Prélèvement 3	Prélèvement 4
Ustilago sphaerogena incubé dans	sans goethite	0,037 ± 0,012	0,049 ± 0,018	0,027 ± 0,020	0,029 ± 0,05
le milieu Ustilago	avec goethite	0,038 ± 0,004	0.044 ± 0.001	0,021 ± 0,027	0,033 ± 0,004
Ustilago sphaerogena incubé dans	sans goethite	0,022 ± 0,019	0,018 ± 0,004	0,020 ± 0,006	0,016 ± 0,007
le milieu Pachlewsky	avec goethite	0,015 ± 0,001	$\textbf{0,024} \pm \textbf{0,007}$	0,026 ± 0,021	0,020 ± 0,008
Boletus suilus incubé dans	sans goethite	0,018 ± 0,001	0,0170 ± 0,0005	0,008 ± 0,005	0,180 ± 0,030
le milieu Pachlewsky	avec goethite	0,016 ± 0,003	0.0153 ± 0.0005	0,023 ± 0,001	$0,200 \pm 0,05$

ANNEXE XII

DISSOLUTION SELECTIVE DE Fe

EXTRACTION: OXALATE pH 3 (TAMM)

1.- Réactif

Dissoudre 10,92 g d'acide oxalique RP ($C_2O_4H_2$, $2H_2O$) + 16,11 g d'oxalate d'ammonium RP (NH_4)₂ C_2O_4 , H_2O dans un litre. Ajuster avec de l'eau déminéralisée.

Le réactif est 0,2 M en oxalate et a un pH 3,0.

2.- Extraction

- Agiter à froid (20°C), à l'obscurité, pendant 4 heures, 1 g de sol broyé modérément avec 40 ml d'oxalate pH 3, dans des pots en verre (pilulier Gravis de 150 ml avec bouchon).
- Centrifuger 5 minutes à 5000 t/minute, sur petite centrifugeuse Jouan.
- Filtration rapide

3.- Dosage

Dilution avec ajout de sodium. Dans des fioles de 50 ml, introduire 20 ml de chaque filtrat d'extraction, ajuster avec NaCl à 39 g/l (0,66 M).

ANNEXE XIII

COMPOSITION DES MILIEUX Pa et Us

Milieu Pa	Glucose Maltose MgSO $_4$ 7H $_2$ 0 KH $_2$ PO $_4$ Tartrate d'ammonium Thiamine Eau distillée	20 g 5 g 0,5 g 1 g 0,5 g 5 mg 1000 ml
	pH après autoclavage	6,5
Milieu Us	Solution métallique Solution concentrée MgSO ₄ 7H ₂ O Saccharose Eau distillée Amené à pH 6,8 avec de l'ammoniaque co	10 ml 100 ml 800 ml 20 g 1000 ml
Solution métallique	88,3 mg de $ZnSO_4$ 7H ₂ O dans 99 ml plus 0,1 ml de A, plus 1 ml de B A = 19,7 mg de $CuSO_4$ 5H ₂ O dans 10 ml B = 10,8 mg de $MnSO_4$ H ₂ O dans 10 ml	
Solution concentrée	K ₂ SO ₄ K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O Acétate d'ammonium Acide citrique non hydraté Thiamine Eau distillée	1 g 4 g 3 g 1,15 g 2 mg 1000 ml

RESUME

Le fer est un élément très peu soluble et très peu biodisponible dans la biosphère. Pour l'acquérir afin de couvrir leurs besoins nutritifs, la plupart des microorganismes synthétisent des molécules complexantes à forte affinité pour le fer ferrique (K $\approx 10^{30}$), les sidérophores, qui le chélateront et le restitueront aux cellules productrices.

Afin de préciser le rôle de ces substances, leur présence a été recherchée dans et hors la rhizosphère de plantes (Mercuriale, Pin) qui croissent dans des sols contrastés, acides et calcimagnésiques. Leur répartition au sein des divers compartiments des matières organiques des sols est différente selon le type de sol. Leur teneur par rapport au carbone organique des fractions est importante dans la fraction hydrosoluble du sol colluvial acide, et encore plus importante dans la fraction acidosoluble du sol calcimagnésique (rendzine). Cette répartition différente indique une accessibilité des sidérophores pour les microorganismes plus forte dans le sol calcimagnésique. Parallèlement, des dénombrements de la microflore potentiellement productrice de ces sidérophores révèlent des différences qualitatives et quantitatives au sein de ces deux sols.

Des études au laboratoire ont mis en évidence la dissolution efficace d'oxyhydroxydes de fer bien cristallisés comme la goethite par des champignons symbiotiques ectomycorhiziens, produisant des sidérophores. D'autres minéraux, tels que la biotite et d'autres éléments comme l'aluminium, peuvent être aussi solubilisés.

Les résultats de dissolution et d'altération abiotique des mêmes minéraux indiquent un pouvoir solubilisateur plus important des sidérophores que des acides organiques vis-à-vis de minéraux tels que la goethite, la biotite et la pyrite. Ces résultats soulignent l'importance et l'intérêt de ce processus dans les mécanismes d'approvisionnement en fer des microorganismes, mais aussi des plantes, en particulier en conditions de pH neutre ou faiblement alcalin.

Mots-clefs: Sidérophores - Biodisponibilité du fer - Microorganismes du sol - Rhizobactéries - Champignons - Ectomycorhizes - Matières organiques des sols - Altération de minéraux - Goethite - Acides organiques.

NOM DE L'ETUDIANT : Madame WATTEAU Françoise

NATURE DE LA THESE: Doctorat de l'Université de NANCY I en Pédologie.

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

NANCY, le 18 JUIN 1950 " " Nerz

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I

M. BOULANGE

NOM DE L'ETUDIANT : Madame WATTEAU Françoise

NATURE DE LA THESE: Doctorat de l'Université de NANCY I en Pédologie.

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

NANCY, 1e 18 JUIN 1990 us Merz

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I

M. BOULANGÉ

NOM DE L'ETUDIANT : Madame WATTEAU Françoise

NATURE DE LA THESE: Doctorat de l'Université de NANCY I en Pédologie.

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPREMER

NANCY, 1e 18 JUIN 1950 " " Nerz

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I

M. BOULANGE

	,			
•				