



**HAL**  
open science

# Les rhizobactéries des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie: Caractérisation, rôle dans l'adaptation des plantes à la contrainte édaphique et interaction avec les champignons mycorhiziens à arbuscules

Alexandre Bourles

► **To cite this version:**

Alexandre Bourles. Les rhizobactéries des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie: Caractérisation, rôle dans l'adaptation des plantes à la contrainte édaphique et interaction avec les champignons mycorhiziens à arbuscules. Interactions entre organismes. Université de la Nouvelle-Calédonie, 2019. Français. NNT: 2019NCAL0002 . tel-02955518

**HAL Id: tel-02955518**

**<https://unc.hal.science/tel-02955518v1>**

Submitted on 2 Oct 2020

**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.



Université de la Nouvelle-Calédonie  
Ecole doctorale du Pacifique ED469  
Institut des Sciences Exactes et Appliquées

Doctorat ès Science en Biologie des organismes

Présenté par **Alexandre BOURLES**

---

---

## **Les rhizobactéries des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie**

---

**Caractérisation, rôle dans l'adaptation des plantes à la contrainte édaphique et interaction avec les champignons mycorhiziens à arbuscules**

Sous la direction de **Hamid AMIR** et **Linda GUENTAS**

Pour une soutenance prévue le 18 juin 2019 devant le jury composé du :

Wafa Achouak, Professeur, Université Aix-Marseille/CEA	Rapportrice
Lionel Moulin, Directeur de recherche, IRD, UMR IPME	Rapporteur
Philippe Jourand, Ingénieur de recherche HDR, IRD, LSTM	Examineur
Philippe Michaud, Professeur, Université Clermont Auvergne	Examineur
Cyrille Goarant, Chercheur HDR, IPNC	Examineur
Linda Guentas, MCF, Université de la Nouvelle-Calédonie	Encadrante
Hamid Amir, Professeur, Université de la Nouvelle-Calédonie	Directeur de thèse





*A ma famille et ma Andréa, pour leurs soutiens et encouragements  
dans tout ce que j'ai pu entreprendre.*



« Une nation qui détruit son sol se détruit elle-même »

*F. D. Roosevelt*



*Tetraria comosa* sur un site minier après exploitation

## Remerciements

Ce manuscrit de thèse est l'aboutissement de trois années durant lesquelles les rencontres et les échanges ont été nombreux. Il m'est impossible de citer la totalité des personnes ayant contribué à l'aboutissement de ce travail, c'est pourquoi je tiens à m'excuser auprès des personnes déçues de ne pas voir leur nom y figurait.

En premier lieu, je tiens à remercier mon encadrante Linda Guentas, merci de m'avoir fait confiance depuis bientôt sept ans (Stage de fin de Licence, cela remonte...). C'est toi qui m'a fait découvrir le monde de la recherche et de la microbiologie. C'est en très grande partie grâce à toi si j'en suis arrivé là. Merci pour ton encadrement, ta disponibilité, ta gentillesse et tes conseils

Ensuite, un grand merci à Hamid Amir, mon directeur de thèse merci de m'avoir embarqué dans cette aventure, merci pour ta confiance, pour tes conseils, tes nombreuses relectures et plus généralement pour avoir permis que cette thèse se passent dans les meilleures conditions.

Merci à Lionel Moulin, Wafa Achouak, Philippe Michaud, Cyrille Goarant et Philippe Jourand d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'évaluer mon travail.

Merci aux différents membres de mes comités de suivi, Eric Vidal, Cyrille Goarant, Maelle Molmeret, Philippe Michaud et Philippe Jourand. Vos conseils et les échanges que l'on a pu avoir ont été très précieux.

Je remercie tout particulièrement Philippe Jourand, pour l'ensemble des conseils concernant la mise en place des expérimentations, l'analyse des résultats, la rigueur et l'écriture scientifique. Merci également pour ta disponibilité et ta réactivité.

Merci à l'ensemble des membres de l'Institut des Sciences Exactes et Appliquées et plus particulièrement aux membres de l'axe Biologie et biomolécules. Merci Valérie (M) pour le support technique, pour tes conseils et tes relectures de mes différents travaux. Merci Clarisse et Yvon pour les nombreux échanges en biologie moléculaire. Merci, Thomas pour les précieux conseils sur les champignons mycorhiziens à arbuscules. Merci Cyril, pour les sessions récupération de sol sur Plum. Je remercie tout particulièrement Valérie (BS) pour les conseils mais surtout les encouragements tout au long de ce travail.

Un grand Merci aux personnels de l'IRD ayant contribué à ce travail : les membres du laboratoire des moyens analytiques (Léo, Jean Louis, Félice, Stéphanie), Laurent Millet, pour les conseils en phylogénie et Farid Juillot pour les analyses des EPS.

Je remercie le Dr. Alexis Bazire de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de biotechnologie et chimie marines.

Merci également à la province Sud de la Nouvelle-Calédonie pour la bourse de thèse et l'accompagnement tout au long de ces trois années.

Un merci tout particulier aux deux potes du Foyer Wallisien ; les docteurs Gensous et Chalkiadakis. Merci à toi Simon pour les conseils et la confiance depuis mon stage de master. Merci à toi Left de m'avoir accueilli dans ton laboratoire et pour ton aide et tes conseils

concernant le monde merveilleux des EPS. Merci à vous deux également pour vos encouragements tout au long de ce travail.

Une pensée pour les différents stagiaires qui m'ont accompagné tout au long de ce travail: Flavie, Gaël, Vanina, Adeline, Léa, Juanita, Alexia, César, Marion. J'espère que tout va bien pour vous et je vous remercie de votre implication et de votre aide. Merci également à Kévin, le rennais pour l'aide en statistiques.

Un grand merci à ma « compagnie de thèse » Emmrick, David, Malik, A-Tena pour les moments détentes. Je pense que maintenant on sait ce que cela veut dire Ponérihouen. Egalement une pensée, à tous les potes doctorants rencontrés le long du chemin : Pauline, Aurélie, Jyef, Anthony, Jannaï, Hugo, Amélie, Emilie, Simon, Subama, Cassandre, Cynthia....

Une pensée pour « les vieux » Jacob, William, Joseph et Soane, ainsi que aux grand frères Léo et Jean rencontré tout au long du chemin sur l'université et sur l'IRD, toujours porteurs de conseils et d'encouragements.

Un grand merci à « La Bande de Feu » : Léna, Sarah Angélique, Baptiste, Nelly, Rachelle pour les soirées et les sorties du weekend.

Un merci également à l'ensemble « des potes » de l'AS Université Futsal, Joe, Azer, Wysh, Jason, Valérian, Greg (Ma César), Wabune, Weda et l'ensemble de l'équipe. Ces entraînements et matchs m'ont toujours permis de décompresser et de penser à autre chose.

Je tiens enfin à remercier affectueusement tous les membres de ma famille, qui m'ont à chaque fois apporté « équilibre et sérénité ». Il m'est impossible de tous vous citer. Cependant, je tiens à particulièrement remercier ma sœur Charlotte, toujours à prendre des nouvelles et la maison de Montravel : Ma grand-mère, toujours à l'écoute et porteuse de nombreux conseils, Rudy, toujours dans le délire, Maguy (la gentillesse incarnée), Denise (pour les parties de massacre), merci à vous pour votre soutien sans faille.

Je tiens également à remercier ma chérie de m'avoir supportée et soutenue plus particulièrement pendant ces trois années de thèse. Merci pour tes encouragements, ton oreille attentive et ton affection. Tu as été pour moi d'un grand soutien dans la réalisation de ce travail.

Pour finir, je tiens à remercier respectueusement mes parents. Je sais bien que je ne le dis pas, mais je ressens une gratitude infinie envers vous. Vous m'avez toujours donné les moyens pour que je puisse réussir. Merci, car sans vous rien de tout cela n'aurait été possible.

Oleti

## **Avant-propos**

Cette thèse de doctorat est le fruit de trois années de travail commencées au Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement devenu Institut des Sciences Exactes et Appliquées (ISEA) au sein de l'Université de la Nouvelle-Calédonie.

Cette thèse a été financée par le prix d'encouragement de la recherche de la Province Sud.

Le contenu de cette thèse est bilingue. L'introduction, la synthèse bibliographique, les introductions aux chapitres et la conclusion sont rédigées en français. Les chapitres présentés sous forme d'articles scientifiques soumis à des revues internationales sont rédigés en anglais.

Les références bibliographiques sont présentées pour chaque article. La mise en page ainsi que la mise en forme des références bibliographiques peuvent différer selon le journal dans lequel le travail a été soumis. Les références présentées à la fin du manuscrit regroupent, la bibliographie utilisée dans l'introduction générale, le chapitre 1, les introductions aux articles et la conclusion générale.



## SOMMAIRE

<b>Introduction générale .....</b>	<b>1</b>
<b>1.Chapitre 1 Synthèse Bibliographique .....</b>	<b>8</b>
1.1. Les sols ultramafiques.....	9
1.2. Bactéries et sols ultramafiques.....	10
1.2.1. Toxicité des métaux pour les bactéries .....	10
1.2.2. Diversité des bactéries sur sols ultramafiques.....	11
1.2.3. Importance de la couverture végétale .....	13
1.2.4. Adaptation des bactéries aux métaux sur sol ultramafique .....	13
1.2.5. Ecotype bactérien relié à la contrainte édaphique.....	15
1.3. Mécanismes de résistance impliqués dans la tolérance aux métaux des bactéries.....	15
1.3.1. La bioaccumulation.....	16
1.3.2. La biosorption par l'intermédiaire de composés de surface.....	16
1.3.3. L'exclusion.....	17
1.3.4. La séquestration extracellulaire.....	17
1.3.5. La détoxification enzymatique des métaux.....	18
1.3.6. Le biofilm.....	18
1.3.7. Les exopolysaccharides bactériens .....	20
1.4. Les bactéries promotrices de la croissance des plantes.....	22
1.4.1. A l'interface du sol et des plantes : la rhizosphère.....	22
1.4.2. Concept et définition.....	23
1.4.3. Diversité des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes .....	24
1.4.4. Mécanismes impliqués dans leurs effets sur la croissance des plantes .....	24
1.4.5. Utilisation des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes .....	29
1.5. Interaction entre bactéries et champignons mycorhiziens à arbuscules.....	31
1.5.1. Les champignons mycorhiziens à arbuscules.....	31
1.5.2. Champignons mycorhiziens à arbuscules et sols ultramafiques .....	33
1.5.3. Interaction des champignons mycorhiziens à arbuscules avec les bactéries.....	33
1.5.4. Mycorrhiza helper bacteria .....	34
1.5.5. Interaction avec les bactéries solubilisatrices du phosphate .....	35
1.6. Adaptation des plantes aux sols ultramafiques .....	36
1.6.1. Les métaux .....	36
1.6.2. Le phosphore.....	37
1.7. Genre bactériens étudiés .....	38

## SOMMAIRE

1.7.1.	Quelques éléments de taxonomie bactérienne .....	38
1.7.2.	Le genre <i>Burkholderia</i> .....	39
1.7.3.	Le genre <i>Curtobacterium</i> .....	40
1.7.4.	Tolérance aux métaux au sein des genres étudiés .....	42
1.7.5.	Effet de promotion de la croissance des plantes au sein des genres étudiés .....	43
1.8.	Contexte néo-calédonien.....	47
1.8.1.	Contexte géographique .....	47
1.8.2.	Histoire géologique .....	48
1.8.3.	Diversité floristique retrouvée sur ces sols .....	48
1.8.4.	Exploitation minière et impact sur l'environnement.....	49
1.8.5.	Restauration écologique en Nouvelle-Calédonie .....	51
1.8.6.	Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes en Nouvelle-Calédonie	52
<b>2.Chapitre 2 Rôle du biofilm et des exopolysaccharides dans l'adaptation à la toxicité métallique de <i>Caballeronia novacaledonica</i> comb. nov. et de <i>Paraburkholderia ultramafica</i> comb. nov., isolées des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie .....</b>		<b>54</b>
2.1.	Introduction.....	58
2.2.	Materials and Methods.....	60
2.2.1.	Bacterial species and phylogenetic analysis .....	60
2.2.2.	Test for tolerance to metal (Inhibition Concentration 50; IC50).....	61
2.2.3.	Ni biosorption and bioaccumulation .....	62
2.2.4.	Biofilm formation assay .....	63
2.2.5.	Quantification of biofilm production .....	64
2.2.6.	EPS production and its gross chemical composition .....	64
2.2.7.	Effect of microbial inoculation in plants under ultramafic conditions.....	66
2.2.8.	Statistical analysis .....	67
2.3.	Results.....	68
2.3.1.	Test for tolerance to metal.....	68
2.3.2.	Ni biosorption and bioaccumulation .....	69
2.3.3.	Biofilm formation assay .....	73
2.3.4.	Quantification of biofilm production .....	75
2.3.2.	Effect of microbial inoculation in plants under ultramafic conditions.....	78
2.4.	Discussion .....	81
2.5.	Conclusions.....	89
2.6.	Acknowledgments.....	90

## SOMMAIRE

2.7.	Disclosure statement .....	90
2.8.	References.....	91
<b>3.</b>	<b>Chapitre 3 Existence au sein de <i>Curtobacterium citreum</i> d'un écotype adapté aux sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie et ayant des effets positifs sur l'adaptation des plantes .....</b>	<b>110</b>
3.1.	Introduction.....	114
3.2.	Materials and Methods.....	117
3.2.1.	Bacterial description and phenotypic characterization.....	117
3.2.2.	Molecular characterization.....	119
3.2.3.	Effects of bacterial strains on plant growth and metal concentration .....	121
3.2.4.	Test for tolerance to metal (Inhibition Concentration 50; IC <sub>50</sub> ) .....	123
3.2.5.	Adsorption and bioaccumulation of Ni by <i>C. citreum</i> BE and <i>C. citreum</i> DSM20528 <sup>T</sup> .....	123
3.2.6.	Kinetic of biofilm formation in presence of Ni by <i>C. citreum</i> BE and <i>C. citreum</i> DSM20528 <sup>T</sup> .....	124
3.2.7.	Exopolysaccharides (EPS) production of <i>C. citreum</i> BE in presence of Ni and characterization by infrared spectroscopy.....	125
3.2.8.	Statistical analysis .....	126
3.3.	Results.....	127
3.3.1.	Bacterial description and phenotypic characterization.....	127
3.3.2.	Molecular Characterization .....	128
3.3.3.	Effects of the bacterial strains on plant growth and metal concentration .....	129
3.3.4.	Test for tolerance to metal (Inhibition Concentration 50; IC <sub>50</sub> ) .....	132
3.3.5.	Adsorption and bioaccumulation of Ni by <i>C. citreum</i> BE and <i>C. citreum</i> DSM20528 <sup>T</sup> .....	132
3.3.6.	Kinetic of biofilm formation in presence of Ni by <i>C. citreum</i> BE and <i>C. citreum</i> DSM20528 <sup>T</sup> .....	135
3.3.7.	EPS production of <i>C. citreum</i> BE in presence of Ni and characterization by infrared spectroscopy.....	136
3.4.	Discussion .....	141
3.5.	Conclusions.....	145
3.6.	Conflicts of interest.....	146
3.7.	Funding .....	146
3.8.	Acknowledgments.....	146
3.9.	References.....	147



## SOMMAIRE

<b>4.Chapitre 4 Effets de la co-inoculation de <i>Curtobacterium citreum</i> BE et de champignons mycorrhiziens à arbuscules sur la croissance et l'adaptation des plantes au sol ultramafique .....</b>	<b>175</b>
4.1. Introduction.....	179
4.2. Materials and methods .....	181
4.2.1. Bacterial strain .....	181
4.2.2. AMF isolates .....	182
4.2.3. Bacterial inoculum .....	182
4.2.4. AMF inoculum.....	182
4.2.5. Ultramafic substrate .....	183
4.2.6. Pots experiment.....	183
4.2.7. Mycorrhizal colonization .....	184
4.2.8. Quantification of AMF viable spores in soil.....	185
4.2.9. Chemical analysis .....	185
4.2.10. Statistical analysis .....	186
4.3. Results.....	186
4.3.1. Mycorrhizal colonization .....	186
4.3.2. Plant height .....	189
4.3.3. Shoot and root biomasses.....	189
4.3.4. Nutrient analysis .....	191
4.3.2. Global analysis.....	198
4.4. Discussion .....	202
4.4.1. Effects of the treatments on mycorrhizal colonization.....	202
4.4.2. Effects of the treatments on plant growth .....	203
4.4.3. Effect of the treatments on plant mineral nutrition .....	204
4.4.4. Effect of the treatments on metal translocation.....	205
4.5. Acknowledgements.....	206
4.6. Conflict of interest .....	206
4.7. References.....	207
<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>225</b>
<b>References.....</b>	<b>232</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>262</b>
<b>Listes des Figures, Tableaux, Figures et Tableaux supplémentaires .....</b>	<b>268</b>

### **Introduction générale**

Selon un rapport établi par le Programme des Nations-Unies pour l'environnement (PNUE, <https://www.unenvironment.org/fr>, consulté en Février 2018) sur la dégradation des sols dans le monde, il est estimé que 25% des terres utilisables sur le globe sont dégradées avec pour principales causes dans l'ordre le surpâturage, la déforestation, la mauvaise gestion des terres agricoles, la consommation de bois de feu, l'industrie et l'urbanisation (construction de route et exploitation minière). Parmi ces sols dégradés, les sols miniers sont particulièrement touchés car la demande de matière première ne cesse d'augmenter au fil des années avec des méthodes d'exploitation particulièrement destructives (e.g. mines à ciel ouvert). De plus, ces sols riches en métaux abritent généralement une biodiversité végétale unique, adaptée à cette contrainte métallique (Isnard et al., 2016 ; Reeves et al., 1996) et des enjeux de conservation et de restauration sont également à considérer (L'Huillier et al., 2010). C'est le cas des sols ultramafiques exploités pour leur teneur élevée en métaux tel que le nickel (Ni), le cobalt (Co) et le chrome (Cr) (Woodell, 1988).

### **Les sols ultramafiques**

Les sols ultramafiques se caractérisent par de faibles concentrations disponibles de macronutriments indispensables pour les plantes (N, P, K), un rapport Ca/Mg déséquilibré (généralement, 1/20) et la présence d'oxydes de fer avec des concentrations élevées en métaux tels que le nickel, le chrome, le manganèse (Mn) et le cobalt (Woodell, 1988). Ces sols contiennent peu de matière organique, une capacité d'échange cationique et de rétention de l'eau faible (Kazakou et al., 2008). Ces conditions édaphiques extrêmes font que de très forts taux d'endémisme sont retrouvés sur ces sols (Isnard et al., 2016). Ces caractéristiques particulières associées à la distribution sous forme de patch isolés sont principalement responsables de l'importante diversité des organismes présents sur ces sols (Chiarucci et Baker, 2007 ; Kazakou et al., 2008). De plus, bien que ces sols soient répartis dans le monde entier, ils ne couvrent que 1% de la surface terrestre (Kazakou et al., 2008). Leur exploitation par l'industrie minière, notamment pour le minerai de nickel, constitue donc une réelle menace pour ces écosystèmes et la biodiversité qu'ils abritent. En effet, le décapage des premiers horizons (à faible teneur en métaux) entraîne une perte de la végétation, mais également une perte (i) des capacités du sol (rétention en eau, CEC, matière organique), (ii) des nutriments, (iii) de la banque de graines, ainsi que la disparition des communautés microbiennes (O'Dell et Claassen, 2009).

### **La restauration écologique**

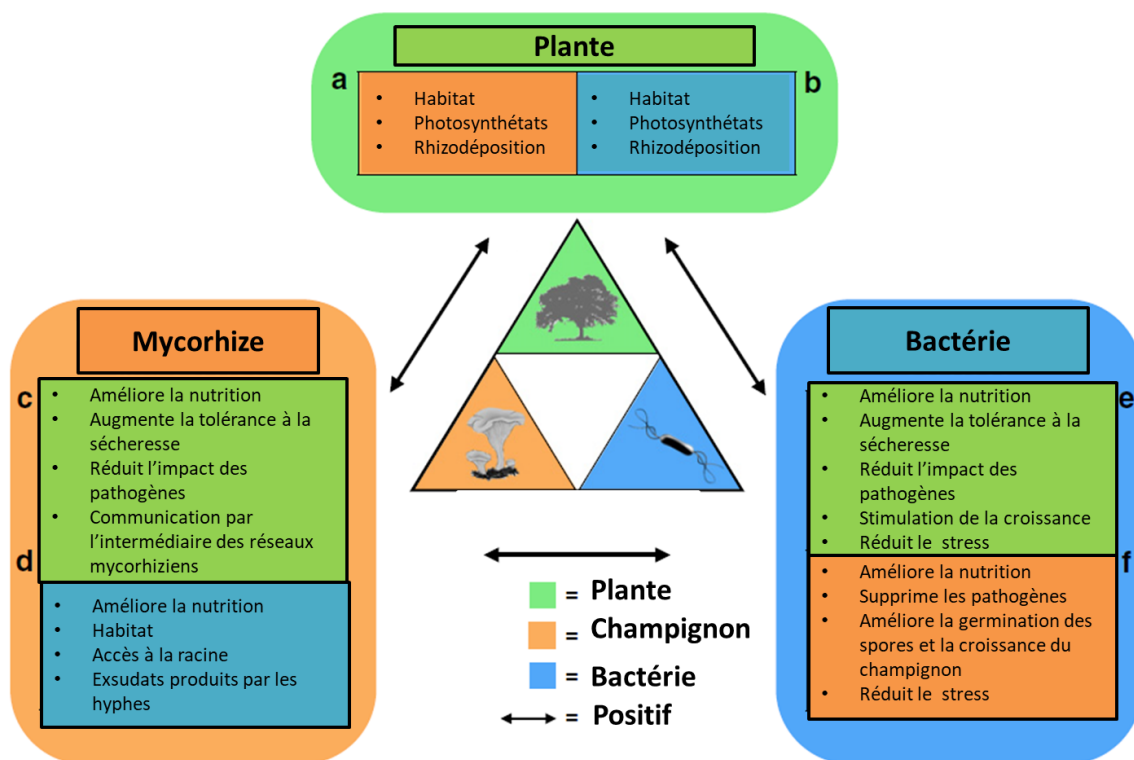
La réhabilitation de ces écosystèmes dégradés est donc un impératif afin de conserver la biodiversité et limiter notamment l'érosion. L'application des principes de la restauration écologique des sites dégradés est largement prônée par les grandes sociétés minières. Elles se sont ainsi regroupées en International Council on Mining & Metals (<https://www.icmm.com/>, consulté en Février 2018) qui a édité un fascicule intitulé « Good Practice Guidance for Mining et Biodiversity » en 2003. Cet ouvrage a pour objectif d'accompagner les entreprises minières pour améliorer la gestion de la biodiversité. Il est à ce jour clairement reconnu que les opérations de revégétalisation des zones impactées doivent avoir pour objectif l'installation à terme d'une couverture végétale qui permet de (i) protéger de l'érosion, (ii) réguler les débits hydriques, et (iii) assurer la reconstitution et la protection de la diversité biologique ainsi que la réintégration des sites impactés dans le paysage. En effet, les activités minières entraînent une incapacité d'installation et de développement d'une couverture végétale pérenne et donc une perte de la résilience des écosystèmes. De plus, sur ces sites, les temps de recolonisation et de développement des espèces d'origine sont très lents ce qui favorise l'installation d'espèces « indésirables » (Bradshaw, 1997). L'intervention de l'Homme pour relancer la résilience est primordiale et nécessaire sur ces zones impactées de manière importante. Dans le contexte des sols ultramafiques, l'apport d'engrais chimiques azotés et phosphorés nécessaires à l'installation d'une couverture végétale peut s'avérer inenvisageable (L'huillier et al., 2010). En effet, ce genre d'amendement chimique est coûteux. De plus, l'apport doit être renouvelé car l'azote assimilable, apporté sous forme de nitrates peut être lessivé ou dénitrifié et le phosphore, très fortement retenu par les oxydes de fer et de chrome des sols ultramafiques, devient indisponible pour la plante. Une alternative est l'utilisation de microorganismes natifs de ces sols présentant des effets bénéfiques vis-à-vis des plantes (Emam, 2016 ; O'Dell et Claassen, 2009 ; Perkins et Hatfield, 2016 ; Wang, 2017 ; Whiting et al., 2004). Ces microorganismes peuvent apporter une aide substantielle à l'implantation et à la survie des plantes en milieux pauvres ou hostiles (Perkins et Hatfield, 2016).

### **Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes**

La microflore du sol regroupe majoritairement des champignons, des archées et des bactéries (Alexander, 1991 *in* Glick, 2014). Cette microflore est capable de dégrader la matière organique, recycler le carbone, l'azote, le phosphore ou le potassium ou encore de rendre indisponible certains contaminants (Revillini et al., 2016). Ils assurent un rôle essentiel dans la formation des sols et leur évolution et constituent donc une composante indispensable au bon

## INTRODUCTION GENERALE

fonctionnement de l'écosystème. Parmi ces microorganismes, des bactéries qualifiées de rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR pour « Plant Growth Promoting Rhizobacteria ») en 1978 par Kloepper et Schroth, vivent au voisinage des racines, utilisent les exsudats racinaires comme éléments nutritifs et exercent en retour des effets bénéfiques sur la plante via divers mécanismes. Ces rhizobactéries peuvent agir sur l'architecture du système racinaire principalement en influençant la balance hormonale de la plante (Vacheron et al., 2013). Certains de ces mécanismes reposent sur la production de molécules telles que des enzymes (ACC-déaminase), des phytohormones (acide indole acétique, acide abscissique, gibbérellines et cytokinines), des sidérophores, des vitamines, mais également via des mécanismes chimiques (solubilisation des minéraux et minéralisation des composés organiques) et physiques permettant une tolérance à certains stress abiotiques, tels que la sécheresse ou la présence de métaux (Vacheron et al., 2013). D'autres mécanismes tels que la formation de biofilm et la production d'exopolysaccharides (EPS) jouent également un rôle dans l'interaction des rhizobactéries avec la plante (Allison, 2003 ; Ferreira, 2011). Ces mécanismes seront abordés dans la synthèse bibliographique. De plus les bactéries sont capables d'interagir avec les champignons mycorhiziens (Fig.1) et notamment les champignons mycorhiziens à arbuscules (AMF, pour « Arbuscular Mycorrhizal Fungi) (Bonfante et Anca, 2009 ; Miransari, 2011). Les échanges entre les microorganismes et la plante sont d'ailleurs décrits par certains auteurs comme une boucle de rétroaction qui maintiendrait la rhizosphère dans un équilibre dynamique (Dessaux et al., 2016). La figure 1 extraite de la revue publiée par Revillini et al. (2016) illustre les interactions tripartites (auxquelles s'intéressent ce travail de thèse) qui peuvent exister entre la plante, les bactéries et les champignons mycorhiziens. Bianciotto et Bonfante (2002) qualifient d'ailleurs les champignons mycorhiziens à arbuscules comme des niches spécialisées pour les bactéries rhizosphériques et endophytes. Certaines de ces bactéries exercent des effets bénéfiques sur les mycorhizes (Fig.1.1), elles sont qualifiées par Garbaye (1994a) de bactéries auxiliaires de la mycorhization (MHB pour « Mycorhiza Helper Bacteria »). Il s'agit de bactéries associées avec les champignons mycorhiziens qui améliorent l'établissement de la symbiose mycorhizienne (Duponnois et Garbaye, 1991 ; Garbaye, 1994b). Les interactions entre ces différents organismes sont peu étudiées en Nouvelle-Calédonie alors qu'elles représentent des applications intéressantes pour la restauration des sites miniers dégradés (Amir et Ducouso, 2010).



**Fig. 1** Illustration de l'interaction tripartite (Bactérie/Plante/Mycorhize). Ce schéma a été repris, traduit et complété à partir de la revue de Revilenni et al. (2016). (a) action de la plante pour la mycorhize, (b) action de la plante pour la bactérie ; (c) action de la mycorhize pour la plante, (d) action de la mycorhize pour la bactérie, (e) action de la bactérie pour la plante et (f) action de la bactérie pour la mycorhize.

### Contexte néo-calédonien

L'archipel néo-calédonien est situé dans le sud-ouest de l'océan Pacifique entre le 18° et le 23° degré de latitude Sud et entre le 163° et le 168° degré de longitude Est. Cet archipel est constitué d'une île principale (la Grande Terre), encadrée par les îles Bélep au Nord, l'île des Pins au Sud et les îles Loyautés à l'Est. Les terres émergées représentent une superficie de 19 100 km<sup>2</sup> et un tiers de la surface de l'archipel est recouvert par des substrats ultramafiques. Ces roches proviennent d'un feuillet du manteau terrestre qui a recouvert la Grande Terre, il y a 37 millions d'années suite à une phase de submersion (Pelletier, 2006). Ces massifs présentent des conditions édaphiques extrêmes, caractérisées par (i) une faible teneur en éléments nutritifs majeurs pour les plantes, (ii) un fort déséquilibre du ratio calcium/magnésium et (iii) une forte concentration en métaux tels que Fe, Ni, Co, Cr et Mn (L'Huillier et Jaffré, 2010). Ces contraintes font que les écosystèmes qui se développent sur ces sols montrent une biodiversité végétale unique avec un taux d'endémisme aux alentours de 85% contribuant ainsi de manière importante au taux d'endémisme total de l'île (75%) (Isnard et al., 2016). Associée à cette

## INTRODUCTION GENERALE

grande diversité floristique, une importante communauté fongique et microbienne a été mise en évidence (Bordez et al., 2016). L'étude de ces microorganismes a montré une grande diversité et une faculté d'adaptation aux contraintes édaphiques (Amir et Ducouso, 2010 ; Chaintreuil et al., 2007 ; Crossay et al., 2018 ; Guentas et al., 2016 ; Hery et al., 2003 ; Jourand et al., 2010 ; Mercky, 1998 ; Perrier et al., 2006).

En Nouvelle-Calédonie, l'exploitation par excavation des massifs ultramafiques comme source de minerai de nickel impacte fortement les écosystèmes terrestres et menace leur équilibre biologique (L'Huillier et Jaffré, 2010). L'impact de ces activités s'exprime par des zones dénudées avec des marques d'érosion importantes. Cette exploitation associée aux forts taux d'endémisme retrouvés sur cette île classe la Nouvelle-Calédonie parmi les hotspots de Biodiversité (Myers et al., 2003 ; 2001). La restauration écologique réalisée en Nouvelle-Calédonie se traduit par la mise en place d'un couvert végétal qui va permettre d'une part de réguler les débits hydriques et diminuer ainsi l'érosion et d'autre part de limiter les impacts paysagers dus à l'exploitation minière. Le principe préconisé consiste à amorcer le processus de succession primaire ou à accélérer le processus de succession écologique secondaire (L'huillier et al., 2010). Depuis les années 70, des travaux concernant la revégétalisation des sites miniers de Nouvelle-Calédonie (Jaffré et Pelletier, 1992 ; Jaffré et Veillon, 1994 ; L'huillier et al., 2010 ; Luçon et al., 1994 ; Sarrailh et Ayrault, 2000) ont peu à peu mis en évidence la nécessité d'une meilleure connaissance (i) des communautés des espèces microbiennes du sol (ii) des mécanismes d'adaptation de ces microorganismes face à la contrainte édaphique, (iii) du mode de fonctionnement de l'interface sol/plante lors de la contrainte édaphique ainsi que (iv) de l'utilisation des plantes endémiques dans les programmes de revégétalisation.

### **Problématique de la thèse**

La prise en compte des interactions plantes-microorganismes pour la restauration des sites miniers dégradés en Nouvelle-Calédonie apparaît comme primordiale (Amir et Ducouso, 2010). En Nouvelle-Calédonie, la grande majorité des études sur ces interactions s'est portée sur l'utilisation des champignons mycorhiziens et peu de travaux se sont intéressés aux rhizobactéries (Amir et Ducouso, 2010). Ce travail de thèse s'attache particulièrement aux rhizobactéries isolées de sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie et à leur rôle dans l'adaptation des plantes à la contrainte édaphique. Il fait suite aux travaux de Lagrange (2009) qui a isolé des bactéries cultivables de la rhizosphère de trois espèces végétales (*Tetraria arundinaceae*, *Chamaedendron nervosa*, *Tetraria raynaliana*). Ces trois espèces appartenaient

au genre *Costularia* (Cyperaceae), genre particulièrement étudié et utilisé en restauration écologique (Wulff et al., 2010). Ces espèces ont été récemment reclassées dans les genres *Tetraria* et *Chamaedendron* (Larridon et al., 2018a, b). L'identification jusqu'au niveau du genre des bactéries (Gonin et al., 2013) a permis de montrer que la rhizosphère de ces plantes était dominée par des Protéobactéries (69%), dont les genres majoritaires sont : *Burkholderia* (28%), *Curtobacterium* (15%), *Bradyrhizobium* (9%), *Sphingomonas* (8%). Gonin et al. (2013) ont montré que ces rhizobactéries étaient adaptées aux conditions édaphiques des sols ultramafiques et présentaient de multiples propriétés promotrices de la croissance des plantes.

C'est dans ce contexte que s'insère ces travaux de thèse dont l'objectif est de mieux appréhender le rôle de ces rhizobactéries isolées des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie dans l'adaptation des plantes à la contrainte édaphique. L'étude, focalisée sur les rhizobactéries appartenant au genre *Burkholderia* et *Curtobacterium* est articulé autour de l'interrogation centrale suivante : « **Quels sont les rôles de ces rhizobactéries dans l'adaptation des plantes à la contrainte édaphique ?** ». Pour répondre à cette problématique le travail a été subdivisé en différents objectifs :

### 1. – Identifier et caractériser les souches appartenant au genre *Burkholderia* et *Curtobacterium*

Le travail de caractérisation des souches bactériennes constitue un prérequis à leur utilisation comme inoculum dans le cadre d'un programme de restauration par revégétalisation des sites ultramafiques post-miniers (O'Dell et Claassen, 2009). La caractérisation des souches appartenant au genre *Burkholderia* par Guentas et al. (2016) a permis d'identifier deux nouvelles espèces bactériennes : *Burkholderia novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> et *Burkholderia ultramafica* STM10279<sup>T</sup>. La taxonomie au sein du genre *Burkholderia* étant en constante évolution (Estrada-de los Santos et al., 2018), une partie du travail s'est attachée à réévaluer la position taxonomique de ces deux espèces. Concernant le genre *Curtobacterium*, Gonin et al. (2013) avaient mis en évidence par comparaison des séquences ADNr 16S que les souches présentaient une forte homologie avec *Curtobacterium citreum*. Une analyse plus approfondie via une étude polyphasique a été réalisée pour caractériser ces souches.

### 2. Evaluer la réponse adaptative des rhizobactéries à la contrainte édaphique

Au fil des ans, l'intérêt pour la communauté bactérienne vivant dans les sols ultramafiques a augmenté de manière importante, en particulier pour l'étude de leur tolérance aux métaux (Mengoni et al., 2010). La compréhension des mécanismes de résistance aux métaux est primordiale, car ils peuvent être responsables de l'évolution des concentrations de

ces éléments toxiques dans les plantes (Etesami, 2018 ; Koechler et al., 2015). Différents mécanismes de résistance aux métaux (bioaccumulation, biosorption, production de biofilm et d'exopolysaccharides) ont donc été investigués dans cette thèse.

### **3. Evaluer l'action promotrice de la croissance des plantes des rhizobactéries et de leur association avec les champignons mycorhiziens à arbuscules.**

L'étude part de l'hypothèse que ces bactéries, de par leur occurrence, leur abondance et leurs traits particuliers (tolérance aux fortes concentrations aux métaux et propriétés promotrices de la croissance des plantes), pourraient jouer un rôle dans l'adaptation des plantes à la contrainte édaphique. Ces rôles potentiels ont été mis en évidence par la réalisation d'expérimentation en serre. De plus, des co-inoculations avec des champignons mycorhiziens à arbuscules ont été testées afin d'évaluer la possible complémentarité des effets de ces microorganismes. Trois plantes ont été utilisées dans cet objectif : le sorgho, choisi comme plante modèle pour sa croissance relativement rapide et sa capacité à croître sur sol ultramafique amendé, *Tetraria comosa* ex *Costularia comosa* (Larridon et al., 2018b) et *Metrosideros laurifolia* ex *Carpolepis laurifolia* (Pillon et al., 2015). *T. comosa* et *M. laurifolia* sont endémiques de la Nouvelle-Calédonie et inféodées aux milieux ultramafiques. Elles appartiennent respectivement aux familles majoritaires de la strate herbacée (Cyperaceae) et arbustive (Myrtaceae) sur milieu ultramafique et sont fréquemment utilisées dans les programmes de restauration écologique pour leur caractère pionnier (première espèce végétale à coloniser le milieu) (Wulff et al., 2010).

### **Présentation du manuscrit**

Ce manuscrit a été subdivisé en quatre parties. Le premier chapitre est une synthèse bibliographique qui s'efforcera de faire un état des lieux des éléments abordés durant ce travail. Les résultats sont présentés sous forme d'articles scientifiques (soumis) au nombre de trois. Le 1<sup>er</sup> article présente les résultats obtenus pour *Burkholderia ultramafica* STM10279<sup>T</sup> et *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup>. Le second article porte sur la caractérisation des isolats appartenant au genre *Curtobacterium*. Le troisième article présente l'effet de la co-inoculation de la souche de *Curtobacterium citreum* BE et de champignons mycorhiziens à arbuscules sur la croissance des plantes. Pour chaque article, une brève introduction rappelant le contexte au sein du travail de thèse est présentée. Enfin une conclusion générale reprenant l'ensemble des résultats du travail et des perspectives pour la restauration écologique des sites miniers de Nouvelle-Calédonie vient clore ce manuscrit.



## **1. Chapitre 1 Synthèse Bibliographique**

## 1.1. Les sols ultramafiques

Dans ce manuscrit le terme « sol ultramafique » est utilisé comme définissant l'ensemble des sols dérivés des roches ultramafiques. Ces roches, aussi appelées roches ultrabasiques, sont très pauvres en silice (moins de 45% de la masse totale) et contiennent des concentrations très élevées en fer et en magnésium. Il s'agit de péridotites ou de roches issues de l'altération de la péridotite comme la serpentine. Ces sols se caractérisent par des conditions édaphiques particulièrement inhospitalières pour la majorité des plantes et qui sont le résultat de trois contraintes majeures (Woodell, 1988). La première contrainte concerne le rapport calcium/magnésium qui est très faible ( $<1$ ), et qui s'explique par les teneurs élevées en magnésium héritées du matériel géologique. La deuxième contrainte est la faible concentration disponible de macronutriments (N, P, K) et la troisième est la présence d'oxydes de fer et de métaux (Ni, Cr, Mn et Co) en concentrations particulièrement élevées (Woodell, 1988). Une étude menée sur des sols ultramafiques au Sri Lanka a montré que le Ni était beaucoup plus labile que le Cr et le Mn et qu'il constituait donc le métal le plus disponible pour les organismes (Vithanage et al., 2014). Concernant le nickel, dans certains sols ultramafiques, des concentrations jusqu'à 10 000 mg kg<sup>-1</sup> de sol sont retrouvées (Echevarria et al., 2006). Cependant, la quantité de métaux totaux mesurée dans les sols ne représente pas la quantité disponible réelle pour les organismes. En effet, le risque éco-toxicologique des métaux pour les organismes dans les sols est contrôlé par leur disponibilité. Echevarria et al. (2006) ont démontré que le Ni extrait via l'acide diéthylènetriamine pentacétique (DTPA pour « diethylenetriaminepentaacetic acid ») est corrélé avec la fraction de nickel biodisponible pour les plantes (Echevarria et al., 2006). Récemment, Pasquet et al. (2018) ont mis en évidence, les quantités maximales de métaux extractibles (via une extraction à l'EDTA : « ethylenetriaminepentaacetic acid ») sur des sols ultramafiques de Nouvelle Calédonie. Bien que moins de 5% du nickel total et entre 5 et 35% du Co et du Mn ont été extraits, cela représente des concentrations particulièrement élevées et toxiques pour les organismes (Pasquet et al., 2018). Cette disponibilité du nickel dans les sols dépend de l'origine géochimique du métal et des caractéristiques du sol telles que le pH, le potentiel redox, la matière organique et la teneur en argile (Echevarria et al., 1998). Les sols ultramafiques contiennent en plus peu de matière organique, de faibles capacités d'échange cationique et de rétention de l'eau (Kazakou et al., 2008). Comme dans la majorité des sols, le pH est une constante importante à considérer, il peut varier entre 6 et 8 sous climats méditerranéens et

dans les sols jeunes (Nkrumah et al., 2016). Cependant dans les régions tropicales, le pH peut être acide : 5,5 (Van der Ent et al., 2013a) et atteindre jusqu'à 4,4 (Amir et Pineau, 2003).

Bien que ces sols soient inhospitaliers pour la majorité des plantes, les contraintes édaphiques ont aussi favorisé le développement d'organismes adaptés (Kazakou et al., 2008) créant ainsi de forts taux d'endémisme au niveau des végétaux (Isnard et al., 2016). La distribution sous forme de patchs isolés contribue à l'importante diversité des plantes présentes sur ces sols (Chiarucci et Baker, 2007 ; Kazakou et al., 2008). De plus, ces sols constituent un véritable modèle d'étude dans les domaines de l'évolution. En effet, l'étude de ces sols et des organismes qui s'y développent a apporté et continue d'apporter des connaissances dans la compréhension des mécanismes d'adaptation, de différenciation écotypique, de sélection naturelle et de spéciation (Brady et al., 2005). Cependant le principal intérêt porté à ces écosystèmes est économique, en effet ces sols représentent des gîtes métallifères reconnus mondialement. Ces substrats sont sources de minerais métalliques à fortes valeurs ajoutées (Ni, Fe, Cr, Co, Mn). L'exploitation des sols ultramafiques par l'industrie minière constitue une réelle menace pour ces écosystèmes et la restauration de ces écosystèmes est apparue comme étant nécessaire et primordiale (Losfeld et al., 2015a ; O'Dell et Claassen, 2009).

### **1.2. Bactéries et sols ultramafiques**

#### **1.2.1. Toxicité des métaux pour les bactéries**

La diversité microbienne retrouvée dans un sol est dépendante de la température, de l'humidité, du pH ou encore de la composition en éléments du sol. Sur sol ultramafique, Mengoni et al. (2010) ont montré que comme pour les plantes (Kazakou et al., 2008) la concentration en métaux est un facteur de sélection pour les microorganismes du sol et notamment les bactéries. Ces métaux sont essentiels pour différents processus chez les bactéries (de l'ordre du nanomolaire) avec une implication (i) comme catalyseurs dans les réactions biochimiques, (ii) comme composants des protéines et de la paroi bactérienne et (iii) dans le maintien de la balance osmotique (Bruins et al., 2000). Cependant à des concentrations de l'ordre du millimolaire, ces métaux sont toxiques pour la majorité des bactéries ce qui se traduit par une altération de la structure des acides nucléiques ainsi que des protéines et une interférence avec la balance osmotique (Bruins et al., 2000). Sur sol ultramafique, le nickel apparaît comme étant l'un des métaux les plus toxiques pour les microorganismes. Aux quantités de l'ordre du nanomolaire, le nickel joue le rôle de cofacteur pour les enzymes telles que les hydrogénases, la superoxyde dismutase ou encore l'uréase (Ragsdale, 1998). Au-delà

du millimolaire il devient toxique pour les processus cellulaires (Nies, 1999, 1992). Au-delà des processus cellulaires, les fortes concentrations en métaux affectent ainsi les communautés bactériennes en réduisant la biomasse totale, leur activité et la composition (Tak et al., 2013). Cependant certaines bactéries natives des sols riches en métaux ont développé des adaptations vis-à-vis de cette contrainte métallique.

### **1.2.2. Diversité des bactéries sur sols ultramafiques**

En se basant sur les travaux publiés jusqu'à la finalisation de ce manuscrit, un récapitulatif des différents phylums bactériens retrouvés sur les sols ultramafiques a été réalisé (Table 1.1). Ce tableau regroupe les différents genres bactériens qui ont pu être isolés des sols ultramafiques naturels (non exploités). Les bactéries majoritairement retrouvées sont des *Proteobacteria*. Au sein des *Proteobacteria*, on retrouve dans l'ordre, les *alphaproteobacteria*, les *betaproteobacteria* et les *gammaproteobacteria*. Après les *Proteobacteria*, les *Actinobacteria* sont majoritaires. .

## CHAPITRE 1

**Table 1.1** Phylums auxquels appartiennent les bactéries majoritairement retrouvées sur sols ultramafiques.

Phylums	Classe	Genre	Référence
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillus, Paenibacillus, Staphylococcus</i>	
	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Aurantimonas, Bradyrhizobium, Caulobacter, Devosia, Inquilius, Mesorhizobium, Methylobacterium, Methylosinus, Phyllobacterium, Rhizobium, Roseomonas, Sinorhizobium, Sphingomonas</i>	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Acidovorax, Alcalagines, <b>Burkholderia</b> ; Cupriavidus, Massilia, Variovorax</i>	(Abou-Shanab et al., 2007a,b, 2003 ; Barzanti et al., 2007 ; Becerra-Castro et al., 2011a,b ; Gonin et al., 2013 ; Héry et al., 2003 ; Idris et al., 2004 ; Ma et al., 2009 ; Mengoni et al., 2004, 2001 ; Navarro et al., 1999 ; Pal et al., 2007, 2004 ; Rajkumar et al., 2009a ; Rajkumar et Freitas, 2008a)
	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Acinetobacter, Pseudomonas, Psychrobacter, Pantoea, Serratia, Stenotrophomonas</i>	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria, Amycolatopsis, Arthrobacter, Clavibacter, <b>Curtobacterium</b>, Frankia, Janibacter, Leifsonia, Microbacterium, Nocardioides, Okibacterium, Rhodococcus, Streptomyces, Streptosporangium, Williamsia</i>	
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Chryseobacterium</i>	

### 1.2.3. Importance de la couverture végétale

Parmi les facteurs qui peuvent influencer la composition de la microflore du sol, on retrouve la couverture végétale (Bordez et al., 2016 ; Gourmelon et al., 2016 ; Herrera et al., 2007). Bordez et al. (2016) ont mis en évidence que la couverture végétale était la principale responsable (43%) de la distribution des microorganismes (bactéries et champignons) sur sols ultramafiques. Les paramètres édaphiques n'expliquant que 31-32% de la variation. Les auteurs vont jusqu'à dire que la richesse, la composition et l'abondance des microorganismes sont liées au type de couverture végétale et à l'espèce végétale dominante. Dans ce sens, Gourmelon et al. (2016) ont montré que « chaque formation végétale échantionnée possède sa propre communauté bactérienne résultant d'interactions multiples entre les facteurs abiotiques et biotiques ». La comparaison, menée par Herrera et al. (2007), des communautés bactériennes (i) d'un sol ultramafique naturel (non exploité), (ii) d'un sol ultramafique après exploitation, et (iii) de deux sols ultramafiques revégétalisés montrés des différences en termes de diversité phylogénétique mais pas en termes d'abondance. Ils ont ainsi mis en évidence une diminution de la diversité au sein des protéobactéries, suite à l'exploitation. De plus, cette étude a souligné des différences significatives en termes de composition phylogénétique entre tous ces systèmes. Les auteurs ont montré qu'en terme de diversité phylogénétique qu'un sol revégétalisé est une situation intermédiaire entre un sol exploité et un sol naturel. Les auteurs ont émis l'hypothèse que l'introduction de plants permettait une augmentation des protéobactéries due aux apports de carbone et d'azote des plantes ce qui a terme aboutirait à la restauration de la communauté microbienne retrouvée sur sol naturel.

### 1.2.4. Adaptation des bactéries aux métaux sur sol ultramafique

Comme pour les plantes qualifiées de métalphytes (Whiting et al., 2004), les bactéries présentes dans les sols ultramafiques présentent des adaptations particulières qui leur permettent de tolérer les concentrations élevées en métaux (Bruins et al., 2000 ; Etesami, 2018 ; Mengoni et al., 2010). Il n'existe pas de seuil de concentration claire mis en évidence pour qualifier une bactérie de tolérante comme cela peut être le cas pour les espèces végétales (Baker et Brooks, 1989 ; Wenzel et Jockwer, 1999). Cependant, au regard de la toxicité des métaux, il apparaît que des bactéries capables de tolérer des concentrations de l'ordre du millimolaire peuvent être qualifiées de tolérante au métal considéré. Ainsi pour *Escherichia coli*, les valeurs de concentrations minimales inhibitrices (plus petite concentration suffisante pour inhiber, au laboratoire, la croissance d'un organisme) pour les métaux sont les suivantes : Ni et Co : 1mM,

## CHAPITRE 1

Cr (Cr<sup>6+</sup>) : 0,2 mM, Mn : 20mM (Mergeay et al., 1985). La table 1.2 reprend les valeurs de concentration minimale inhibitrice pour le Co, le Cr et le Ni de diverses bactéries retrouvées dans la littérature. Très peu de données ont pu être retrouvées pour le Mn. Cette table indique des valeurs particulièrement importantes en comparaison des valeurs retrouvées pour *E. coli*.

**Table 1.2** Concentrations minimales inhibitrices pour diverses bactéries isolées des sols ultramafiques.

Bactéries	CMI (mM)		
	Co	Cr	Ni
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	15	2,5	10
<i>Acidovorax avenae</i>	5	0,5	10
<i>Arthrobacter rhombi</i>	5	5	15
<i>Bacillus niacini</i>	2,5	5	15
<i>Bacillus</i> sp.	-	-	20
<i>Burkholderia terricola</i>	-	-	1
<i>Burkholderia</i> sp.	-	-	20
<i>Burkholderia</i> sp.	-	-	10
<i>Burkholderia</i> sp.	-	-	30
<i>Burkholderia cepacia</i>	10	5	15
<i>Caulobacter cescentus</i>	0,5	0,1	10
<i>Clavibacter xyli</i>	2,5	2,5	15
<i>Curtobacterium</i> sp.	-	10	15
<i>Massilia timonae</i>	5	2,5	15
<i>Mesorhizobium loti</i>	0,1	0,1	5
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	-	-	12
<i>Microbacterium arabinogalactanolyticum</i>	5	5	15
<i>Nocardioides simplex</i>	1	0,1	5
<i>Okibacterium fritillariae</i>	-	-	10
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	1	2,5	2,5
<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>	1	0,5	15
<i>Pseudomonas riboflavina</i>	5	0,5	10
<i>Pseudomonas</i> sp.	-	-	10
<i>Psychrobacter</i> sp.	-	-	15
<i>Rhizobium etli</i>	10	5	15

L'ensemble de ces données ont été extraites des articles suivants : Abou-Shanab et al., 2007b ; Giovanella et al., 2017 ; Idris et al., 2004 ; Ma et al., 2009 ; Rajkumar et Freitas, 2008b ; Stoppel et Schlegel, 1995

Le niveau de tolérance des rhizobactéries aux métaux dans les sols ultramafiques peut être influencé par la couverture végétale. Pour exemple, Schlegel et al. (1991) ont mis en évidence une corrélation positive entre l'abondance de rhizobactéries tolérantes à de fortes concentrations en nickel et la proximité de *Pycnantha acuminata*, espèce reconnue comme étant la plante accumulant le plus de nickel à travers le monde avec un latex constituait à 25%

de nickel (Jaffré et al., 1976a). Dans sa rhizosphère, des bactéries capables de tolérer des concentrations de l'ordre de 30 mM de Ni ont été isolées (Schlegel et al., 1991). Plus récemment, une revue Mengoni et al. (2010) montre que les plantes hyperaccumulatrices sont des niches dans lesquelles sont retrouvées des bactéries extrêmement tolérantes aux métaux.

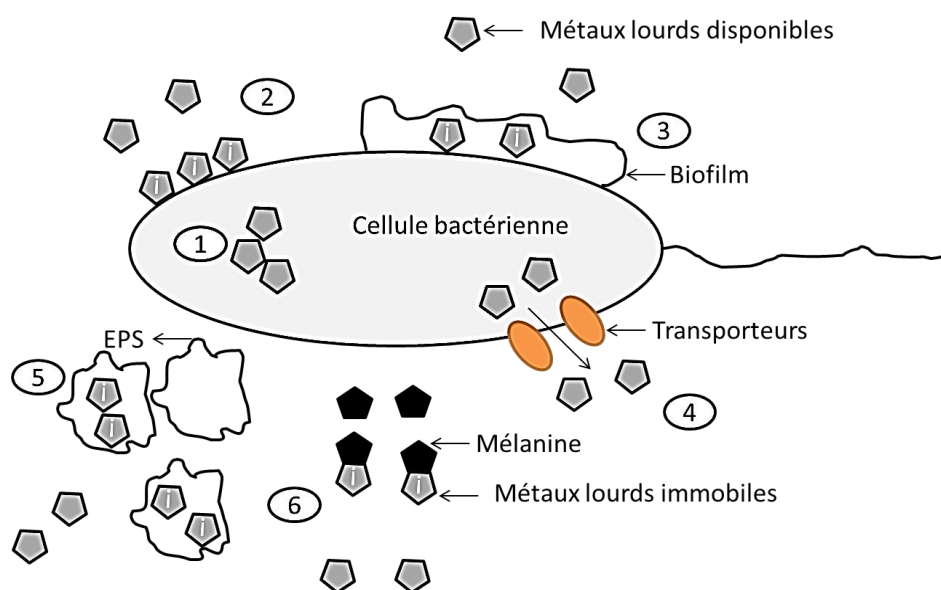
### **1.2.5. Ecotype bactérien relié à la contrainte édaphique**

Les sols ultramafiques constituent un véritable modèle d'étude dans les domaines de l'évolution, l'écologie et la conservation (Kazakou et al., 2008 ; Mengoni et al., 2010 ; Whiting et al., 2004). Comme indiqué dans la Table 1.2, les études sur les communautés microbiennes des sols ultramafiques conduisent bien souvent à l'isolement de souches tolérantes aux métaux. Pour plusieurs auteurs, ces sols fournissent un environnement unique pour étudier les mécanismes favorisant la génération et le maintien des variations intra spécifiques (Kruckeberg, 1986 ; O'Dell et Rajakaruna, 2011). La présence de souches bactériennes tolérantes aux métaux suggère l'existence d'écotypes bactériens (Cohan, 2006) reliés à la contrainte édaphique comme cela a été montré chez les plantes (Chiarucci et Baker, 2007 ; O'Dell et Rajakaruna, 2011 ; Proctor, 2003), les ectomycorhizes (Gonçalves et al., 2009 ; Jourand et al., 2010 ; Moser et al., 2005 ; Panaccione et al., 2001), ou encore les champignons mycorhiziens à arbuscules (Schechter et Bruns, 2008). Cette différenciation en écotype constitue une étape dans les processus de spéciation relié à la contrainte édaphique (O'Dell et Rajakaruna, 2011). De plus, l'existence d'écotype bactérien relié aux propriétés édaphiques a été mise en évidence au sein du genre *Curtobacterium* (Chase et al., 2018, 2017).

### **1.3. Mécanismes de résistance impliqués dans la tolérance aux métaux des bactéries**

Les bactéries tolérantes aux fortes concentrations en métaux ont développé différents mécanismes retrouvés sous le nom de mécanisme de résistance (Bruins et al., 2000) pour tolérer cette contrainte. Ces mécanismes ne sont pas exclusifs et la tolérance des bactéries peut être le résultat de la combinaison de plusieurs de ces processus (Bruins et al., 2000 ; Etesami, 2018). Ces mécanismes sont aujourd'hui étudiés pour une utilisation des bactéries majoritairement dans le domaine de la bioremédiation des sites pollués (Ayangbenro et Babalola, 2017 ; Etesami, 2018 ; Mosa et al., 2016). Parmi ces mécanismes, la bioaccumulation et la biosorption sont particulièrement décrits dans la littérature (Bruins et al., 2000 ; Chojnacka, 2010 ; Ledin, 2000 ; Velásquez et Dussan, 2009) mais d'autres mécanismes sont également impliqués. L'ensemble de ces mécanismes sont schématisés en figure 1.1.





**Fig 1.1** Principaux mécanismes de résistance impliqués dans la tolérance des bactéries aux métaux. 1. Bioaccumulation 2. Biosorption par l'intermédiaire de composés de surface 3. Biosorption par l'intermédiaire d'un biofilm 4. Transport à l'extérieur de la cellule 5 Séquestration extracellulaire par l'intermédiaire d'exopolysaccharides 6. Séquestration extracellulaire par l'intermédiaire de mélanine.

### 1.3.1. La bioaccumulation

La bioaccumulation (Fig 1.1) a lieu lorsque la quantité de métaux absorbée par la cellule est supérieure à celle rejetée, le métal s'accumule donc dans l'organisme (Chojnacka, 2010). Il s'agit d'un mécanisme actif qui demande de l'énergie et qui est partiellement réversible (Velásquez et Dussan, 2009). Le métal est transporté à l'intérieur de la cellule et y est accumulé sous forme chélatée par l'intermédiaire de différents composés bactériens tels que les metallothionéines (Mosa et al., 2016). D'autres mécanismes de séquestration cytosolique sont impliqués dans la protection de la cellule vis-à-vis des métaux. Ainsi, de nombreuses bactéries tolérantes accumulent les métaux sous forme de corps d'inclusion internes, par exemple, les granules de polyphosphate (volutine) qui lient de grandes quantités de cations métalliques (Gonzalez et Jensen, 1998).

### 1.3.2. La biosorption par l'intermédiaire de composés de surface

La biosorption (Fig 1.1) est un processus physico-chimique naturel retrouvé permettant de chélater et concentrer les métaux en surface de la paroi (Mosa et al., 2016). Il s'agit d'un mécanisme passif, réversible et rapide ce qui permet de séquestrer de plus grandes quantités de métaux en comparaison avec la bioaccumulation (Velásquez et Dussan, 2009). Ce mécanisme est principalement influencé par les caractéristiques de la biomasse, les propriétés physico-

chimiques des métaux cibles et le microenvironnement de la solution de contact, y compris le pH, la température et l'interaction avec d'autres ions (Ledin, 2000). Les métaux sont adsorbés sur la surface de ce que l'on appelle le biosorbant. Les bactéries expriment une large gamme de molécules (protéines ou peptides) sur leur paroi cellulaire, qui confèrent une charge nette anionique à la surface cellulaire pouvant être à l'origine de l'adsorption des métaux (Bruins et al., 2000 ; Mosa et al., 2016). Vijayaraghavan et Yun (2008) dressent une liste exhaustive des espèces bactériennes impliquées dans la biosorption de différents métaux. Parmi les nombreux genres bactériens cités, on retrouve majoritairement des bactéries appartenant au genre *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Desulfovibrio*.

### 1.3.3. L'exclusion

Certaines bactéries limitent les concentrations en métaux à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire de transporteurs (Fig 1.1). Un grand nombre de bactéries tolérantes aux métaux, possède des transporteurs qui excrètent les métaux toxiques à l'extérieur de la cellule. Ces transporteurs sont des transport d'efflux soit passifs tels que ceux retrouvés chez *Cupriavidus metallidurans*, soit actifs. Ces derniers peuvent utiliser l'hydrolyse de l'ATP ou des gradients électrochimiques comme source d'énergie pour exporter les métaux à l'extérieur de la cellule. Trois familles de protéines sont impliquées. Les protéines de la famille « résistance, nodulation cell division » qui vont exporter les cations superflus à l'extérieur de la cellule. Les protéines de la famille « cation diffusion facilitator » qui sont des transporteurs membranaires secondaires de type antiport protons/cations, utilisant la force proton motrice ou le gradient en potassium comme source d'énergie. Les protéines de la famille P-type ATPases qui sont capables de chélater les métaux et de transporter les cations métalliques à travers la membrane cellulaire contre leur gradient en utilisant l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie (Nies, 2003).

### 1.3.4. La séquestration extracellulaire

Le processus de séquestration extracellulaire (Fig 1.1) repose sur la capacité des bactéries à excréter des composés possédant de fortes propriétés chélatrices des métaux. Certains organismes bactériens sont capables de garder les métaux à l'extérieur de la cellule en excréant de la mélanine (Ledin, 2000). Ce métabolite secondaire est un chélateur cationique grâce aux fonctions anioniques retrouvées au sein de sa structure comme les groupements carboxyles et les groupements hydroxyles déprotonés (Riley, 1997). Un autre mécanisme

impliqué dans la séquestration extracellulaire des métaux est la production d'exopolysaccharides (Gupta et Diwan, 2017 ; Nocelli et al., 2016).

### **1.3.5. La détoxification enzymatique des métaux**

Certains microorganismes sont capables par différents mécanismes enzymatiques (oxydation, réduction, méthylation) d'immobiliser les métaux (Rajkumar et al., 2009b). Par exemple, une souche de *Bacillus sphaericus* isolée de sols ultramafiques est capable de réduire la forme mobile et toxique du chrome :  $\text{Cr}^{6+}$  en la forme immobile et non toxique  $\text{Cr}^{3+}$  (Pal et Paul, 2004).

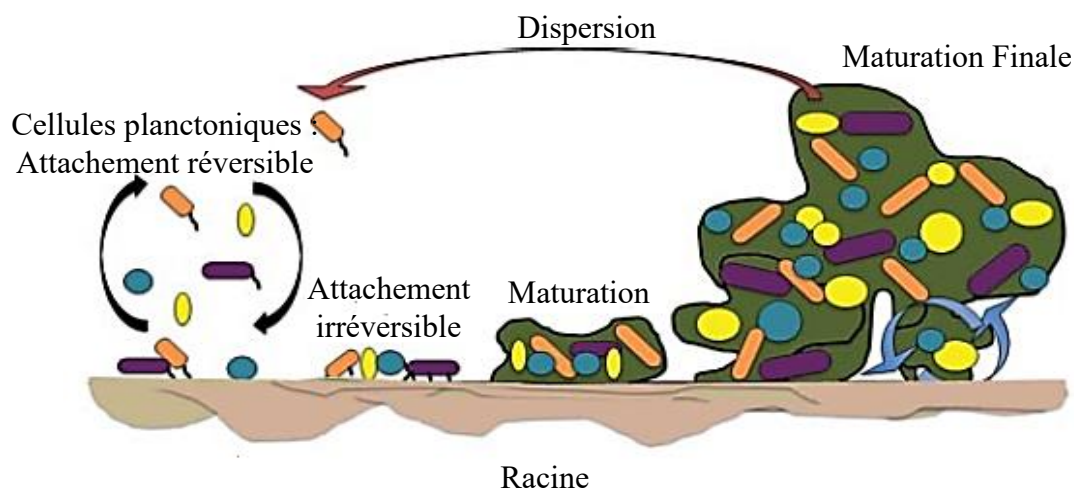
### **1.3.6. Le biofilm**

Ce mécanisme a été investiguée particulièrement au cours de cette thèse. Le biofilm est le mode de vie sessile majoritaire des bactéries. Il est constitué de bactéries enveloppées dans une matrice polymérique fortement hydratée, attachées à un support vivant ou inerte (en mode sessile). Schématiquement le biofilm peut se définir comme un système microbien dynamique structuré composé de pores par lesquels l'eau transporte les nutriments (Costerton, 1999). Physiologiquement, il s'agit de plusieurs couches de bactéries, adhérant à une surface grâce à une matrice de polymère, qui se regroupent et interagissent. La vie sous forme de biofilm offre divers avantages parmi lesquels la tolérance accrue à certaines contraintes environnementales ou encore une protection vis à vis des pathogènes (Danhorn et Fuqua, 2007). De plus, le biofilm joue un rôle majeur dans l'interaction avec les autres organismes et notamment les plantes (Angus et Hirsch, 2013 ; Danhorn et Fuqua, 2007 ; Ramey et al., 2004).

#### **Structure du biofilm**

La figure 1.2 présente le schéma général de mise en place du biofilm. La première étape consiste en une adsorption transitoire entre les cellules planctoniques libres et la surface de la plante via des forces de liaisons faibles (adhésion réversible). Certaines cellules peuvent se détacher sous l'influence de facteurs physiques, chimiques ou biologiques, d'autres s'adsorbent de manière irréversible. L'adsorption irréversible est liée à la production de substances polymériques extracellulaires. Elle induit une cascade de changements physiologiques qui mène à l'excrétion d'exopolymères formant ainsi une matrice. Durant cette phase, le biofilm croit et se développe en micro-colonies. Les bactéries au sein de cette matrice se divisent et forment des macrocolonies qui s'étendent sur le support (maturation du biofilm). Les bactéries expriment au sein du biofilm un certain nombre de gènes impliqués dans la communication

inter-bactérienne, appelé « quorum sensing » (QS). Le QS est responsable de la différenciation cellulaire et n'est exprimé qu'à partir d'une certaine densité cellulaire. Il permet aux cellules de s'adapter aux différents facteurs environnementaux (Kjelleberg et Molin, 2002). Lorsque le biofilm a atteint une certaine densité cellulaire, les cellules bactériennes peuvent se détacher et retourner à une vie planctonique et un autre cycle peut débuter (Angus et Hirsch, 2013).



**Fig 1.2** Schéma de formation de biofilm (adapté de Angus et Hirsch, 2013).

La structure du biofilm bactérien est caractérisée par la présence d'une matrice polymérique extracellulaire, pouvant occuper être 75-95% du volume du biofilm mature. Ces substances polymériques extracellulaires sont composées majoritairement de polysaccharides, de protéines et d'ADN (Costa et al., 2018). Ces éléments participent à la structure du biofilm et sont également responsables de ses propriétés biologiques. Ces substances polymériques extracellulaires sont responsables des interactions attractives et de la force de cohésion lors de la phase d'adhésion irréversible des bactéries à leur support (Angus et Hirsch, 2013 ; Danhorn et Fuqua, 2007). Ces substances sont généralement décrites comme étant des éléments importants dans l'établissement de l'interaction plante/bactérie (Ferreira, 2011 ; Fraysse et al., 2003 ; Nielsen et al., 2011 ; Ramey et al., 2004).

### **Rôle du biofilm dans la tolérance aux métaux**

L'ensemble des éléments abordés dans cette partie sont issus de la revue publiée par Koechler et al. (2015). Dans cette revue, les auteurs font un état des mécanismes impliquant le biofilm dans la tolérance des bactéries aux métaux. La présence de métaux peut induire des changements au niveau physiologique mais également génétique. Au niveau de l'attachement et de l'adhérence du biofilm, la présence de métaux dans la majorité des cas, va augmenter

l'adhésion, la formation et la persistance du biofilm. Dans d'autres cas plus rare, la présence de métaux peut empêcher la formation de biofilm sans agir sur la viabilité de l'organisme (Vega et al., 2014). La présence de métaux peut également entraîner un changement au niveau de la structure et de la maturation du biofilm. La croissance dans un biofilm induit une tolérance plus importante dans le temps. Les mécanismes mis en place sont (i) la séquestration et l'immobilisation des métaux à l'intérieur du biofilm, (ii) l'induction de gènes spécifiques au biofilm ainsi que des changements métaboliques et (iii) la formation de cellules persistantes (Koechler et al., 2015). La séquestration est réalisée par l'intermédiaire des substances polymériques extracellulaires qui vont diminuer la biodisponibilité du métal, retarder sa diffusion et ainsi réduire l'exposition des cellules bactériennes aux concentrations élevées en métaux. Au niveau de l'expression de gènes en présence de métaux, le mécanisme le plus étudié est l'induction de gènes impliqués dans la production de substances polymériques extracellulaires. Concernant les changements métaboliques, des voies métaboliques sont favorisées en présence de métaux, par exemple le processus de méthylation du mercure est plus rapide chez les cellules organisées sous forme de biofilm que chez les cellules planctoniques. Enfin, certaines bactéries sont capables d'entrer dans un état de dormance en présence de métaux. Qualifiées de cellules persistances elles attendent des conditions plus favorables pour leur croissance (Koechler et al., 2015).

### **1.3.7. Les exopolysaccharides bactériens**

#### **Généralités**

Les polysaccharides sont impliqués dans la tolérance aux métaux chez certaines bactéries et jouent également un rôle majeur dans l'interaction plante/bactérie, c'est pourquoi ils ont été particulièrement investigués dans cette thèse (Etesami, 2018 ; Gupta et Diwan, 2017). Généralement les polysaccharides produits par les bactéries sont classés en trois catégories relatives à leurs fonctions biologiques dans l'organisme : les polysaccharides intracellulaires tels que le glycogène, les polysaccharides capsulaires et les polysaccharides extracellulaires aussi appelés exopolysaccharides (EPS). Les EPS sont majoritairement composées de glucides et de quelques substituants non glucidiques comme l'acétate, le pyruvate, le succinate ou le phosphate (Ates, 2015). La composition, la fonction, les propriétés physiques et chimiques des EPS varient d'une espèce bactérienne à l'autre. La majorité des bactéries productrices d'EPS ont été décrites comme capables de produire des homopolysaccharides ou des hétéropolysaccharides (Suresh Kumar et al., 2007). En raison de leur type de liaison et de la

nature des unités monomériques, les homo-polysaccharides peuvent être catégorisés comme des  $\alpha$ -D-glucanes,  $\beta$ -D-glucanes, fructanes et polygalactanes. Les unités de répétitions des hétéropolysaccharides sont généralement le D-glucose, le D-galactose, le L-rhamnose, et le N-acetylglucosamine, le N-acétylgalactosamine, ou l'acide glucuronique (Ates, 2015).

### **Rôle des exopolysaccharides**

Les exopolysaccharides jouent un rôle dans la protection de la cellule, dans l'adhésion des bactéries à une surface et sont impliqués dans l'interaction cellulaire et notamment sur les racines des plantes (Ferreira, 2011 ; Kandel et al., 2017a). Ils peuvent protéger la cellule contre la dessiccation, les antibiotiques, les bactériophages, les stress abiotiques tels que la température, l'intensité lumineuse ou le pH (Ates, 2015). De plus, la nature anionique de la couche extérieure de polysaccharides peut aider à capter les nutriments essentiels. Les EPS contribuent également à chélater certains métaux en raison de leur caractère anionique qui leur confère la capacité de chélater les métaux et les ions (Etesami, 2018 ; Gupta et Diwan, 2017 ; Nocelli et al., 2016). La production d'EPS peut également être impliquée dans l'amélioration de la croissance des plantes (Upadhyay et al., 2011) notamment vis-à-vis de la sécheresse (Naseem et al., 2018). En effet, l'influence des rhizobactéries promotrices de croissance des plantes capables de produire des EPS sur l'agrégation du sol a été reporté par Alami et al. (2000). Ces bactéries sont capables d'augmenter de façon significative le volume de macropore du sol ce qui entraîne une augmentation de la disponibilité de l'eau et des minéraux (Alami et al., 2000 ; Naseem et al., 2018).

### **Production des exopolysaccharides**

La quantité d'exopolysaccharide produit varie en fonction des espèces/souches bactériennes considérées et des conditions de culture. Une étude menée sur l'optimisation de la production d'EPS d'une souche de *Rhizobium* par Sayyed et al. (2011) illustre parfaitement cette complexité. En effet, dans cet article, les auteurs se sont intéressés à sept variables susceptibles d'améliorer la production d'EPS : la quantité de bactéries, le temps d'incubation, le pH, la température, le seuil limite de sel, le substrat carboné et la source d'azote. La production d'EPS est généralement plus importante quand une source de carbone en excès est associée à une limitation des autres nutriments tels l'azote et l'oxygène. La production d'EPS par les bactéries se fait majoritairement en condition aérobie. Pour une production optimale de certains EPS, une aération maximale est requise par contre pour d'autre la synthèse est améliorée suite à une aération minimale, c'est le cas pour les alginates bactériens. L'ajout de

vitamines d'aminoacides est réalisé dans certains cas également pour améliorer la production d'EPS. Cependant, l'ensemble de ces facteurs sont limités par la physiologie de la bactérie. Bien souvent, les perspectives les plus intéressantes pour une amélioration de la production d'EPS se retrouvent dans l'ingénierie métabolique soit par la manipulation des gènes qui codent les enzymes qui catalysent les réactions dans les voies, soit en modifiant les voies régulatrices qui affectent l'expression des gènes et l'activité enzymatique (Ates, 2015 ; Donot et al., 2012 ; Freitas et al., 2011 ; Sayyed et al., 2011). Concernant la phase de croissance durant laquelle les EPS sont produits cela dépend des espèces mais la production a généralement lieu durant la fin de la phase exponentielle et dans la phase stationnaire (Freitas et al., 2011). La production d'EPS peut être augmenté en condition de stress. Citons en exemple le cas du stress métallique chez une souche de *Pseudomonas* dont la production d'EPS est 50% plus importante en présence de 2mM de NiCl<sub>2</sub> en comparaison au témoin sans métaux (Chien et al., 2013).

### **1.4. Les bactéries promotrices de la croissance des plantes**

#### **1.4.1. A l'interface du sol et des plantes : la rhizosphère**

Au début des années 1900, Hiltner, agronome et microbiologiste allemand, observe que le sol au voisinage des racines contient une quantité plus importante de microorganismes que le sol environnant. Il introduit le terme de rhizosphère pour décrire cette zone immédiate de sol autour des racines dans laquelle les microorganismes sont stimulées par les exsudats racinaires. Un article publié par Hartmann et al. (2008) fait état des différents travaux de Hiltner sur la rhizosphère. Hiltner définissait la rhizosphère comme un site avec des interactions uniques entre des microorganismes bénéfiques ou pathogènes attirés par les exsudats racinaires (Hartmann et al., 2008). Ce terme a par la suite été élargi et inclut le sol autour des racines dont les propriétés physiques, chimiques et biologiques sont influencées par l'activité et la croissance racinaire (McCully, 2005). Les travaux de Hiltner sont considérés comme les pionniers dans le domaine de l'écologie microbienne avec une vision globale des interactions plantes-microorganismes comme par exemple l'idée que l'abondance de la microflore au voisinage des racines est dépendante des produits excrétés par la plante (Hartmann et al., 2008). L'étude de la rhizosphère a ensuite été peu à peu abandonnée dans les 50 années qui ont suivi la création du concept. Cependant aujourd'hui les études portant sur cet écosystème unique ont pris une place importante dans la recherche en sciences du végétal (Brink, 2016). En effet, les plantes sont engagées dans des interactions avec une multitude de microorganismes parmi lesquels les bactéries ou encore les champignons mycorhiziens (Partida-Martínez et Heil, 2011). Les plantes

peuvent changer la composition des communautés microbiennes par la sécrétion de composés qui stimulent ou inhibent spécifiquement les microorganismes présents dans la rhizosphère (Bais et al., 2006). La capacité des microorganismes à utiliser ces sources de carbone apparaît comme étant primordiale pour un succès de colonisation (Bais et al., 2006). De manière générale, la plante sécrète plus de 40% de ces photosynthétats dans la rhizosphère (Bais et al., 2006). Cependant, Berendsen et al. (2012) ont montré que même si la rhizosphère abrite une quantité plus importante de microorganismes ( $10^8$  à  $10^9$  par gramme de sol), la diversité y est plus faible que dans le sol environnant où on retrouve les communautés les plus diversifiées ( $10^4$  espèces par gramme de sol). Parmi les microorganismes retrouvés au niveau de la rhizosphère, les bactéries sont les plus abondantes (Saharan et Nehra, 2011). Les bactéries majoritaires généralement retrouvées dans la rhizosphère appartiennent au genre *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* et *Serratia* (Gray et Smith, 2005). Parmi ces bactéries, entre 2 et 5% sont qualifiées de rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (Antoun et Kloepper, 2001).

### 1.4.2. Concept et définition

Dans les années 70, la communauté scientifique a commencé à porter un intérêt pour des bactéries capables de stimuler la croissance des plantes. A cette époque l'hypothèse qu'il existe des bactéries capables d'avoir des effets positifs sur la croissance des plantes était controversée (Kloepper et Schrotch, 1981). C'est en 1978 que deux chercheurs américains Kloepper et Schrotch ont mis en évidence des souches « rhizo-bactériennes » spécifiques capables de stimuler la croissance chez le radis (*Raphanus sativus*). Dans cette étude les auteurs avaient inoculé 53 souches bactériennes individuellement. En comparaison du témoin, la biomasse du radis avait augmenté de 180 à 560% suite à l'inoculation de 11 souches bactériennes indépendamment. Les auteurs ont qualifié ces bactéries de PGPR pour « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » (Kloepper et Schrotch, 1978). Ils définissent les PGPR comme « des bactéries du sol qui colonisent la rhizosphère des plantes, poussant dans, sur ou autour des tissus végétaux et qui stimulent la croissance des plantes par plusieurs mécanismes ». Un flou autour du rôle de ces PGPR a persisté jusque dans les années 90 (Kloepper, 2018). Depuis, de nombreux travaux portant sur ces bactéries capables d'améliorer la croissance des plantes ont été effectués (Bashan et al., 2014) et les différents mécanismes impliqués ont fait l'objet de plusieurs revues (e. g. Rajkumar et al., 2012 ; Vacheron et al., 2013). Au fil des années, et notamment au regard des travaux réalisés sur la rhizosphère, une nouvelle définition



des PGPR a fait son apparition. Les PGPR se définissent comme des bactéries libres de la rhizosphère qui utilisent les exsudats racinaires comme éléments nutritifs et exercent en retour des effets bénéfiques sur la plante via divers mécanismes (Vacheron et al., 2013). Pour ces organismes on parle en général de symbiose associative qu'il faut distinguer des symbioses « vraies » qui ont des organes spécialisés comme les nodules pour les rhizobies ou les frankias ou les arbuscules pour les champignons mycorhiziens.

### **1.4.3. Diversité des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes**

La première souche bactérienne qualifiée de PGPR appartient au genre *Pseudomonas*. Depuis la littérature fait état d'occurrence de PGPR dans un grand nombre de genres. Certains genres sont plus étudiés que d'autres notamment pour leur utilisation dans le domaine de l'agriculture (Pérez-Montaña et al., 2014). Parmi ces genres bactériens, on retrouve :

- Des  $\alpha$ -proteobacteria avec des bactéries appartenant au genre *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Brevundimonas*, *Sphingomonas* et *Rhizobium*.
- Des  $\beta$ -proteobacteria comprenant les genres *Burkholderia*, *Delftia* et *Herbaspirillum*
- Des  $\gamma$ -proteobacteria avec les genres *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, et *Xhantomonas*
- Des Actinobacteria avec le genre *Anthrobacter*.

Dans la littérature des divergences existent concernant la nomenclature qui diffère selon les auteurs (Rodriguez-Diaz et al., 2008). Bashan et Holgun (1998) parlent par exemple de PGPB qui regroupe les PGPR mais également les bactéries qui améliorent la croissance des plantes en l'absence d'une rhizosphère fonctionnelle ainsi que les bactéries endophytes. Gray et Smith (2005) subdivisent les PGPR en deux catégories, les PGPR extracellulaires et les PGPR intracellulaires. Enfin, d'autres auteurs classent les PGPR selon leurs fonctions en deux catégories : les PGPR impliqués dans la protection des plantes et les PGPR qui vont jouer un rôle dans l'amendement des sols (Koeppler, 2018).

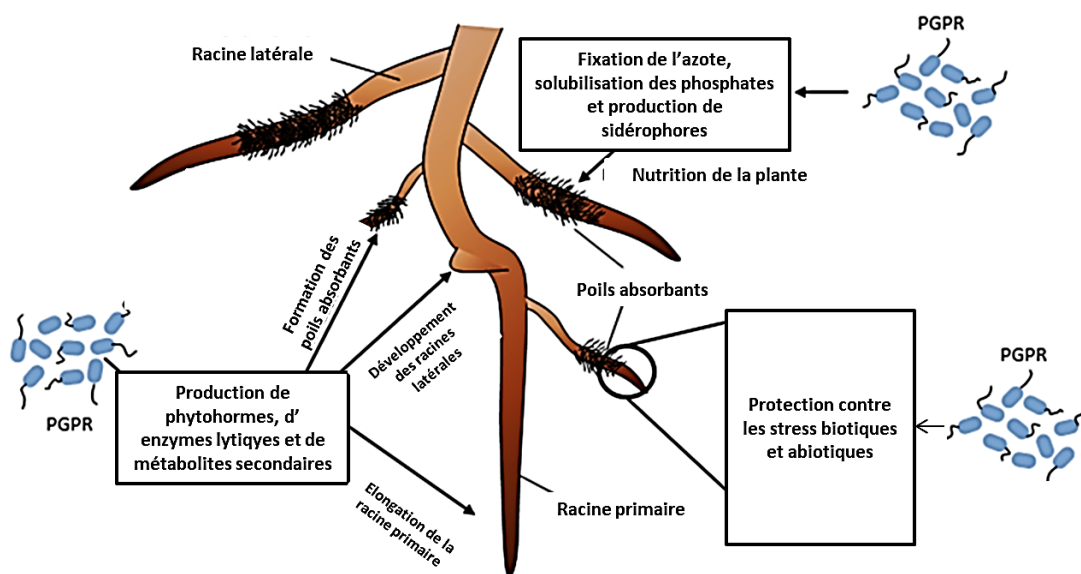
### **1.4.4. Mécanismes impliqués dans leurs effets sur la croissance des plantes**

Dans la littérature, les propriétés des rhizobactéries intervenant dans l'amélioration de la croissance des plantes sont généralement divisées en deux catégories : les mécanismes directs et les mécanismes indirects (Compant et al., 2010 ; Lucy et al., 2004 ; Russo et al., 2012 ; Saharan et Nehra, 2011 ; Solano et al., 2008 ; Vacheron et al., 2013). Ces mécanismes ne sont pas exclusifs et il est admis que les améliorations de croissance observées suite aux inoculations

bactériennes sont le résultat de plusieurs mécanismes. Les principaux mécanismes impliqués sont présentés en figure 1.3.

### Mécanismes directs

Les mécanismes directs sont principalement la synthèse par les PGPR de molécules qui vont favoriser la croissance des plantes. Ces substances sécrétées par les bactéries vont agir à différents stades de la croissance de la plante. Parmi ces substances, figurent des hormones mais également des enzymes.



**Fig 1.3** Principaux mécanismes mis en place par les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (adapté de Vacheron et al., 2013)

### **La production d'auxine**

De nombreuses PGPR sont capables de produire des acides indole-3-acétique (AIA), L'AIA est synthétisé par les rhizobactéries à partir du tryptophane qui est retrouvé à différentes concentrations dans les exsudats racinaires. L'effet de l'AIA sur la plante dépend de sa concentration : de faibles concentrations d'AIA stimulent l'élongation de la racine primaire. A l'inverse de fortes concentrations stimulent la formation des racines latérales, diminuent la longueur de la racine primaire et augmentent la formation de poils absorbants. L'AIA affecte également la division cellulaire, stimule la germination des semences et des tubercules ; augmente le taux de xylème ; contrôle des processus de la croissance végétative, affecte la photosynthèse, la formation de pigments, et confère une tolérance à des conditions stressantes.

## CHAPITRE 1

De nombreux travaux font état d'une corrélation entre l'augmentation de la croissance des plantes et la production d'AIA par les PGPR inoculées (Bal et al., 2013 ; Rajkumar et Freitas, 2008b ; Singh et al., 2013).

### **La production d'ACC déaminase**

Un autre mécanisme est la production d'enzymes et notamment l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique déaminase (ACC déaminase), qui dégrade un précurseur de l'éthylène, l'ACC, en ammonium et  $\alpha$ -kétobutyrate. Cette dégradation permet une réduction du niveau d'éthylène dans les racines de la plante (Glick, 2014 ; Glick et al., 2007). Cette réduction du niveau d'éthylène est primordiale car l'éthylène inhibe l'élongation racinaire et le transport d'auxine, augmente la sénescence et l'abscission de divers organes (Bleecker et Kende, 2000). Comme pour la synthèse d'AIA, cette caractéristique des PGPR est largement étudiée (Bal et al., 2013 ; Saleem et al., 2007).

### **La production de cytokinines**

D'autres PGPR produisent également des cytokinines, phytohormones stimulant la division cellulaire, contrôlant la différenciation des méristèmes, induisant la prolifération de chevelu racinaire mais inhibant la formation des racines latérales et l'élongation de la racines primaire (Riefler, 2006).

### **La production d'acide abscissique et d'acide gibbérellique**

Certaines PGPR produisent aussi de l'acide abscissique ou de l'acide gibbérellique. Ces deux hormones jouent des rôles dans l'architecture racinaire, mais peuvent aussi être impliquées dans des mécanismes de défense ou encore la tolérance à la sécheresse dans le cas de l'acide abscissique (Pieterse et al., 2009).

### **Mécanismes indirects**

Les mécanismes indirects reposent principalement sur l'acquisition des nutriments et la protection vis à vis des stress biotiques et abiotiques.

### **Fixation d'azote atmosphérique**

L'azote constitue le nutriment le plus vital pour la croissance et la productivité de la plante. Bien qu'il soit présent de manière abondante dans l'atmosphère, il est sous une forme inutilisable ( $N_2$ ) pour les plantes. L'azote atmosphérique est converti sous sa forme utilisable pour les plantes par la fixation biologique de  $N_2$  qui change l'azote en ammoniac par

l'intermédiaire de microorganismes fixateurs d'azote. Les organismes fixateurs d'azote peuvent être symbiotiques ou non. Parmi les bactéries symbiotiques fixatrices d'azote, on peut citer les bactéries du genre *Frankia* ou encore celles du genre *Rhizobia* qui forment une symbiose avec les légumineuses. Les bactéries non symbiotiques peuvent être libres dans la rhizosphère, en association avec la plante ou encore endophytes. Les bactéries libres fixatrices d'azote appartiennent à un large éventail de taxons, les genres bactériens majoritaires sont *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum* et *Bacillus* (Vessey, 2003). Les gènes responsables de la fixation de l'azote sont les gènes *nif* retrouvés également chez les bactéries symbiotiques (Chaintreuil et al., 2007). Plusieurs opérons et différents systèmes de fixation d'azote existent car différents types de nitrogénase sont mis en place, par exemple à cofacteur molybdène, vanadium ou fer. Pour la nitrogénase à cofacteur molybdène, le cœur de l'enzyme est codé par les gènes *nifHDK*.

### **Solubilisation des phosphates**

Le phosphore est le second élément limitant la croissance chez les plantes. En dépit de la présence de grands réservoirs dans le sol, le phosphore disponible pour la plante est généralement réduit car il se trouve bien souvent sous forme insoluble. Les deux formes solubles que la plante peut absorber sont la forme monobase  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  et dibasique  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Les bactéries solubilisatrices de phosphate (PSB en anglais pour Phosphate Solubilizing Bacteria) peuvent apporter à la plante du phosphore par divers mécanismes. Par exemple, de nombreuses PGPR ont la capacité de solubiliser les phosphates, grâce aux acides organiques à faibles poids moléculaires (acide gluconique ou citrique), et de minéraliser du phosphore organique, par production de phosphatases (Glick, 2012 ; Miller et al., 2009 ; Richardson et al., 2009). Les bactéries des genres *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* et *Serratia* sont considérées comme les plus efficaces pour la solubilisation du phosphate (Vacheron et al., 2013). Cette capacité des bactéries est largement étudiée notamment dans les cas de co-inoculation avec des champignons mycorhiziens à arbuscules (Barea et al., 2002, Battini et al., 2017 ; Richardson et al., 2009).

### **Production de sidérophores**

Le fer est un nutriment essentiel pour les plantes car il intervient comme cofacteur pour un certain nombre d'enzymes essentielles dans des processus physiologiques importants des plantes tels que la respiration, la photosynthèse et la fixation d'azote. Le fer est abondant dans

## CHAPITRE 1

les sols mais il est souvent retrouvé sous une forme indisponible pour les plantes. La forme oxydée  $Fe^{3+}$  forme des oxydes et des hydroxydes insolubles et donc non disponible pour les plantes. Certaines rhizobactéries sont capables de libérer des molécules chélatant le fer dans la rhizosphère pour le rendre disponible pour la plante. Il s'agit des sidérophores qui sont des composés de faible poids moléculaire généralement inférieurs à 1 kDa. Le complexe fer sidérophore est absorbé par la plante où il est réduit par un système enzymatique présent dans la membrane cellulaire. La production de sidérophore inhibent peut également inhiber la croissance d'autres microorganismes en limitant le fer disponible pour l'agent pathogène, généralement des champignons, qui ne sont pas capables d'absorber le complexe fer-sidérophores (Solano et al., 2008).

### **Protection contre le stress biotique**

Les PGPR peuvent agir directement comme antagoniste des organismes pathogènes. Différents mécanismes sont impliqués comme la production d'antibiotiques, de toxines ou d'enzymes dégradant les parois cellulaires comme la chitinase ou encore la compétition pour la ressource ou pour les sites de colonisation. Certaines PGPR peuvent également activer les mécanismes de résistances systémiques induites et acquises des plantes en réponse à un pathogène. D'autres interfèrent avec le « Quorum Sensing system » des pathogènes empêchant ainsi leur prolifération (Lugtenberg et Kamilova, 2009 ; Pieterse et al., 2009 ; Vacheron et al., 2013).

### **Protection contre le stress abiotique**

#### **La sécheresse**

Pour les plantes, le manque d'eau constitue le stress abiotique le plus important. En effet, la sécheresse influe sur la disponibilité et le transport des éléments nutritifs du sol. La sécheresse peut également accentuer la synthèse de l'éthylène responsable de l'inhibition de la croissance. Les PGPR peuvent réduire ce stress hydrique (Fan et al., 2015 ; Kaushal et Wani, 2016 ; Rubin et al., 2017) en produisant d'une part des phytohormones et d'autre part en excréant des exopolysaccharides (Gouda et al., 2018 ; Vurukonda et al., 2016).

#### **La chaleur**

La chaleur cause des changements de morphologie de la plante qui se traduit par une décoloration, une senescence et une abscission des feuilles ainsi qu'une inhibition de la croissance des parties aériennes et racinaires. Les PGPR par l'intermédiaire d'une réduction des

niveaux d'éthylène dans la plante vont permettre à la plante de maintenir une croissance normale dans des conditions de températures élevées (Saleem et al., 2007).

### **Les métaux**

Certaines bactéries ont développé des mécanismes de tolérance aux fortes concentrations en métaux (voir plus haut). Par l'intermédiaire de ces mécanismes les bactéries vont réguler les concentrations en métaux présents ce qui a un effet bénéfique chez les plantes non adaptées (Burd et al., 1998 ; Etesami, 2018 ; Ma et al., 2015 ; Madhaiyan et al., 2007 ; Pal et al., 2007 ; Wu et al., 2006). Ces bactéries ne sont pas nécessairement qualifiées de PGPR, on parle plutôt de bactéries tolérantes aux métaux (Dell'Amico et al., 2005) qui exercent des effets bénéfiques indirectement sur la plante.

### **1.4.5. Utilisation des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes**

#### **En agronomie**

En 2050, le nombre d'habitants sur la planète devrait dépasser les neuf milliards et il est estimé que la demande en nourriture devrait doubler (Carvalho, 2006 ; Tschardt et al., 2012). Pour nourrir l'ensemble de la population, il est absolument essentiel que la productivité agricole augmente considérablement au cours des prochaines décennies (Timmusk et al., 2017). Dans une optique de réduire l'usage d'engrais chimiques, de limiter la consommation d'eau et d'augmenter la tolérance des plantes agricoles, l'utilisation des PGPR est apparue comme étant une solution biologique durable et respectueuse de l'environnement (De-Bashan et al., 2012 ; Glick, 2014 ; Timmusk et al., 2017). Aujourd'hui ces rhizobactéries sont principalement utilisées en agronomie par les industriels qui dépensent des millions de dollars dans l'utilisation des PGPR (Brink, 2016). Le développement d'inoculum commercial a été initié dans les années 1920 avec l'utilisation de *Bacillus thuringiensis* comme agent pathogène des insectes (Bashan et Holguin, 1998). Le développement et l'utilisation de fertilisant à base de bactéries a ensuite augmenté à travers le monde suite d'une part aux dommages engendrés sur l'environnement par l'utilisation des fertilisants chimiques et d'autre part à l'augmentation des connaissances sur les interactions plantes/bactéries. Dans les années 1950, un véritable marché d'inoculum à base de rhizobactéries voit le jour (Timmusk et al., 2017). En 2014, la part des biofertilisants (terme utilisé pour les fertilisants à base de microorganismes) représentait 5% du marché des fertilisants (Timmusk et al., 2017). Concernant les biopesticides le chiffre d'affaires a été estimée à environ cinq milliards USD en 2011 (Timmusk et al., 2017) ce qui représente environ 2,5% du marché mondial des pesticides. L'industrie agricole se tourne de plus en plus vers ces

technologies (Kloepper, 2018). Des interactions fortes ont été mises en place entre les acteurs de la recherche et les compagnies et maintenant la formulation d'un produit à base de PGPR prend entre 2 et 4 ans (Kloepper, 2018). Les PGPR sont très majoritairement utilisées dans les domaines liés à l'agriculture et leurs effets particulièrement documentés. (Hayat et al., 2010).

### **Autres secteurs d'utilisation**

#### **Revégétalisation**

Peu de travaux font état de l'utilisation des PGPR pour la revégétalisation (Bashan, 2018 ; De-Bashan et al., 2012). La majorité des travaux retrouvés sur l'utilisation des PGPR en revégétalisation sont l'œuvre de l'équipe du Pr Yoav Bashan (1952-2018) qui travaillait sur l'utilisation de ces PGPR dans les déserts (Bashan et al., 2018, 2014, 1999 ; Bashan et Holguin, 2002, 1998 ; De-Bashan et al., 2012 ; Galaviz et al., 2018 ; Puente et al., 2009). Bashan et al. (1999) ont mis en évidence que l'inoculation de PGPR permettait de favoriser l'implantation des cactus ce qui permettait une meilleure stabilisation du sol. Bashan et Holguin (2002) font état de l'utilisation de PGPR isolées de la rhizosphère de mangrove pour améliorer la revégétalisation de cet écosystème. Grandlic et al. (2008) ont montré que l'inoculation de PGPR stimulait la croissance des plantes et permettait de réduire l'amendement en compost. De-Bashan et al. (2012) font un état des lieux de l'utilisation des bactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPB) pour la revégétalisation. L'utilisation des PGPR permet (i) de diminuer la quantité d'engrais et de composts, (ii) l'établissement des plantes dans des zones érodées (où les plantes étaient déjà présentes), (iii) améliore la vigueur et la croissance des plantes dans les zones érodées et (iv) augmentent leur tolérance à la sécheresse et à la salinité (Bashan, 2018 ; De-Bashan et al., 2012). L'utilisation des PGPR pour la restauration doit permettre d'augmenter la survie des plants après leur transplantation sur le site (Bashan et al., 2018).

#### **Phytoremédiation**

Les propriétés développées par les PGPR sont largement utilisées dans les procédés de phytoremédiation (Becerra-Castro et al., 2013 ; De-Bashan et al., 2012 ; Glick, 2003 ; Khan, 2005 ; Ma et al., 2016 ; Mishra et al., 2017 ; Rajkumar et al., 2009b). La phytoremédiation peut être définie comme étant un mécanisme qui utilise les plantes pour extraire, séquestrer ou détoxifier des polluants présents dans un milieu. Le terme de phytoremédiation inclut la phytotransformation qui réduit la toxicité des contaminants, la phytoextraction qui repose sur l'absorption et le stockage des contaminants du sol par la plante et la phytostabilisation qui réduit leur mobilité en diminuant notamment leur biodisponibilité (De-Bashan et al., 2012). Les

plantes qui se développent sur ces sols sont relativement tolérantes aux contaminants de l'environnement mais restent souvent de faible taille en présence de contaminants. Pour améliorer ce processus, l'inoculation de PGPR qui favorise la croissance des plantes, rend la phytoremédiation plus rapide et plus efficace (Glick, 2003). Cela peut également se traduire par une augmentation des concentrations en métaux dans les parties aériennes due à (i) une amélioration de la croissance de la plante et donc une augmentation des quantités de métaux extraits mais également (ii) une augmentation de la disponibilité des métaux ce qui va permettre une accumulation plus importantes des métaux par la plante (Rajkumar et al., 2009b). L'utilisation des PGPR pour améliorer la phytoextraction sur sols ultramafiques constitue une perspective intéressante car cette phytoextraction peut être associée à des projets de revégétalisation dans les cas où uniquement la litière est d'un intérêt. Les retombées économiques qu'offrent ce procédé ne sont pas négligeables notamment en ce qui concerne le nickel (Nkrumah et al., 2016). En Nouvelle-Calédonie, le Laboratoire de Chimie Bio-inspirée et d'Innovations Ecologiques du Dr. Claude Grison (CNRS), développe des catalyseurs dérivés de végétaux en récupérant la litière des plantes reconnues comme accumulant les métaux et utilisées pour la revégétalisation (Losfeld et al., 2015a,b, 2012).

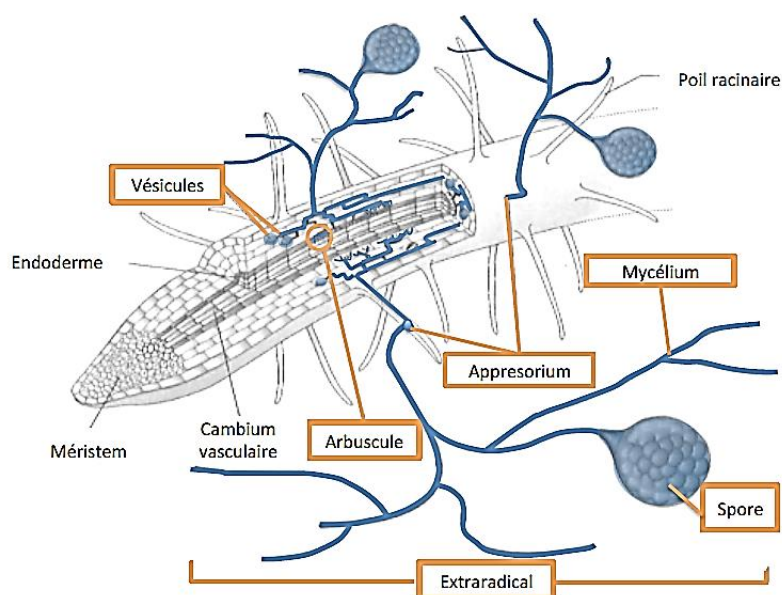
### **1.5. Interaction entre bactéries et champignons mycorhiziens à arbuscules**

#### **1.5.1. Les champignons mycorhiziens à arbuscules**

Les mycorhizes sont le résultat d'une symbiose entre des racines d'une plante avec un champignon (Smith et Read, 2008). Le champignon fournit les éléments nutritifs qu'il capte dans le sol et la plante fournit le carbone que le champignon ne peut pas produire seul (Gamalero et al., 2009 ; Smith et Read, 2008). Selon les auteurs la plante alloue entre 4 et 20% des photosynthétats aux champignons (Lerat et al., 2003). Plus de 80% des plantes dans le monde développent des associations symbiotiques avec au moins un type de mycorhizes (Brundrett, 2009) et ce nombre peut monter jusqu'à 95% sur les sols ultramafiques (Hopkins, 1987). Il existe cinq principales associations mycorhiziennes mais dans ce travail l'intérêt est porté sur une seule d'entre elle mis en place par les champignons mycorhiziens à arbuscules (AMF). Les champignons mycorhiziens à arbuscules sont des symbiotes obligatoires, qui développent leur mycélium dans le sol et pénètrent dans les racines en s'insérant dans les tissus pour arriver jusqu'aux cellules corticales racinaires (Smith et Read, 2008). Le champignon développe alors un organe spécialisé l'arbuscule, à l'intérieur des cellules par invagination des membranes



(Bucher, 2007). Une représentation schématique des différentes structures endomycorhiziennes est présentée en figure 1.4.



**Fig 1.4** Représentation schématique d'une coupe de racine présentant les différentes structures endomycorhiziennes adaptée de Fortin et al. (2008)

Ces structures permettent d'augmenter la surface de contact entre le champignon et la plante et sont le siège des échanges entre les deux partenaires. Il existe également d'autres structures développées par les champignons mycorhiziens à arbuscules : les pelotons et les vésicules. Les vésicules, de formes variables sont situées entre les cellules ou dans les cellules et assurent un rôle de stockage de grandes quantités de lipides. Les pelotons qui correspondent à du mycélium enroulé dans les cellules corticales, sont impliqués dans le transport d'éléments minéraux (Karandashov et Bucher, 2005 ; Smith et Read, 2008). Le rôle des AMF le plus étudié est la contribution à la nutrition minérale de la plante en phosphore, en azote, en calcium, et en potassium (Smith et Smith, 2011). Dans certains cas, les AMF apportent 100% du phosphore à la plante (Smith et Smith, 2011). Ces champignons interviennent également dans la tolérance au stress hydrique (Augé, 2001), aux pathogènes (Smith et Read, 2008) ou encore dans la stabilisation des agrégats du sol (Demenois et al., 2017a). Sur sols riches en métaux, ils peuvent être impliqués dans la tolérance des plantes aux métaux (Amir et al., 2013 ; Del Val et al., 1999 ; Gaur et Adholeya, 2004 ; Javaid, 2011 ; Leyval et al., 1997 ; Turnau et Mesjasz-Przybyłowicz, 2003). Les AMF sont largement étudiés dans les domaines de l'agriculture (Basu et al., 2018) et la restauration écologique des sites dégradés (Bi et al., 2018 ; Wang, 2017). Concernant la

restauration écologique Wang (2017) a réalisé une méta-analyse comprenant 101 études sur l'effet des AMF en vue de leur utilisation pour la restauration des sites miniers dont 22 sur le terrain et 79 en laboratoire. Il a montré que pour 95% d'entre elles, l'inoculation des AMF a des effets positifs significatifs, comme l'augmentation de la survie, de la croissance et de la nutrition des plantes, l'amélioration de la structure et de la qualité du sol, et la réimplantation des plantes. Dans leur revue, Asmelash et al. (2016) mettent en évidence les effets bénéfiques des AMF pour la restauration écologique des sites dégradés. Les auteurs préconisent d'utiliser des AMF natifs des sites à restaurer et des consortiums d'AMF plutôt que des espèces uniques.

### **1.5.2. Champignons mycorhiziens à arbuscules et sols ultramafiques**

Sur sols ultramafiques, les AMF sont en association avec la majorité des plantes (Hopkins, 1987). Comme pour les bactéries les contraintes édaphiques des sols ultramafiques ne limitent pas forcément la diversité des AMF (Fitzsimons et Miller, 2010) et des AMF originaux sont retrouvés sur ces sols. Ainsi, Crossay et al. (2018) ont décrit quatre nouvelles espèces de champignons mycorhiziens à arbuscules isolées des sols ultramafiques en Nouvelle-Calédonie : *Acaulospora saccata*, *A. fragilissima*, *Scutellospora ovalis* et *Rhizophagus neocaledonicus*. Certains AMF présentent des adaptations à cette forte concentration en Ni (Amir et al., 2008). En effet, des AMF isolés à partir des racines de plantes hyperaccumulatrices de Ni en milieu ultramafique ont montré des profils de tolérance au Ni plus élevés que les AMF provenant des racines de plantes non hyperaccumulatrices (Amir et al., 2007). Ces auteurs ont révélé que cinq isolats de *Glomus* spp. provenant de sol ultramafique étaient capables de germer sur un milieu contenant jusqu'à 30 ppm de Ni, alors que les isolats provenant de milieu non-ultramafique ne germaient plus à partir 15 ppm de Ni. Cependant de fortes concentrations en Ni peuvent entraîner des diminutions de la sporulation (Amir et al., 2008) ainsi que du taux de colonisation des racines par les AMF (Amir et al., 2013). Sur ces sols pauvres en éléments nutritifs, les AMF améliorent la nutrition minérale (Ca, K, P), le ratio Ca/Mg et réduisent les teneurs en métaux dans les plantes (Amir et al., 2019, 2013 ; Gensous, 2014 ; Lagrange, 2011).

### **1.5.3. Interaction des champignons mycorhiziens à arbuscules avec les bactéries**

Les AMF interagissent dans le sol avec de nombreux microorganismes, parmi lesquelles de très nombreuses bactéries (Bonfante et Anca, 2009 ; Miransari, 2011). La coexistence d'AMF et de bactéries dans la rhizosphère a été mise en évidence par Janse en 1896, suite à l'observation de ces deux organismes sur une même section de racine de légumineuse. Des travaux sont venus confirmer la présence de bactéries coexistant avec des AMF (Ames, 1989 ;

Linderman, 1991 ; Meyer et Linderman, 1986). Dès 1959, les bactéries du sol retrouvées en association avec les AMF ont été étudiées pour leurs capacités à affecter la germination des spores d'AMF et la croissance des hyphes (Mosse, 1959). En 1996, une bactérie à l'intérieur des cellules d'un champignon endosymbiotique a été observée (Bianciotto et al., 1996a). Dans la mycorrhizosphère (rhizosphère des racines mycorrhizées), divers assemblages de communautés bactériennes vivant strictement associées aux spores, au mycélium extraradriculaire des AMF sont retrouvés. Récemment, Turini et al. (2018) ont publié une revue portant sur l'interaction entre les AMF et les bactéries qui leur sont associées (Turrini et al., 2018). Les auteurs ont répertorié les genres principaux associés aux spores d'AMF, il s'agit des genres *Cellvibrio*, *Chondromyces*, *Flexibacter*, *Lysobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Herbaspirillum*, *Massilia*, *Rhizobium* et *Sinorhizobium*.

### **1.5.4. Mycorrhiza helper bacteria**

Des travaux ultérieurs ont confirmé le rôle fonctionnel de bactéries dans la promotion de l'activité mycorrhizienne (Azcón, 1989) et ont qualifiées ces bactéries de Mycorrhiza Helper Bacteria (MHB) (Duponnois et Garbaye, 1991 ; Garbaye, 1994b). Garbaye (1994b) définit ces organismes comme étant des bactéries associées avec les champignons mycorrhiziens qui améliorent l'établissement de la symbiose mycorrhizienne ainsi que son développement et son activité. Les AMF constituent des niches spécialisées pour les bactéries rhizosphériques et endophytes (Bianciotto et Bonfante, 2002). Certaines MHB peuvent être champignons-spécifiques (Khan, 2008 ; Minerdi et al., 2002). Cette interaction est présente à différentes étapes de la vie des organismes impliqués (Tarkka et Frey-Klett, 2008) et est influencée par différents paramètres tels que l'espèce d'AMF, la souche bactérienne, la plante hôte, la rhizosphère ou encore les conditions environnementales (Miransari, 2011). De plus, certains effets de ces MHB sont accrus lorsque les conditions environnementales sont particulièrement rudes (Vivas et al., 2006). Ces bactéries facilitent l'établissement et le fonctionnement de la symbiose mycorrhizienne en stimulant la germination des spores, la croissance mycélienne, la colonisation racinaire ou la sporulation, mais aussi en réduisant les stress qui pourraient affecter la symbiose (Frey-Klett et al., 2007). Plusieurs mécanismes sont décrits dans la littérature quant à l'amélioration de la germination des spores (Frey-Klett et al., 2007). Certaines bactéries ont la capacité de décomposer des biopolymères insolubles comme la chitine et le chitosane, les deux principaux constituants des parois des spores AMF, ce qui favorise la germination des spores (Ames et al., 1989 ; Battini et al., 2016 ; Roesti et al., 2005). Un autre mécanisme repose

sur une amélioration de la germination par l'intermédiaire de composés volatiles ou non-sécrétés par les bactéries et qui peuvent également être responsable d'une stimulation de la croissance des hyphes extra-radicales. Parmi ces composés on retrouve l'AIA (Battini et al., 2017). Cette augmentation de croissance des hyphes est directement responsable de la stimulation de l'établissement de la symbiose (Frey-Klett et al., 2007). Un autre rôle essentiel joué par les bactéries associées aux AMF est la solubilisation du P, un nutriment peu disponible pour les plantes dans certains sols et notamment les sols ultramafiques, du fait de son immobilisation et de sa précipitation avec d'autres minéraux du sol. D'autres avantages indirects sont également retrouvés ainsi, chez certaines MHB, une stimulation de la formation de racines latérales a été relevée ce qui va augmenter les points de rencontre entre le champignon et la plante (Tarkka et Frey-Klett, 2008). La présence d'AMF peut également permettre de stimuler l'action des PGPR via une augmentation de la colonisation des racines (Boddey et al., 1991). Les auteurs expliquent que les PGPR se fixent sur les hyphes d'AMF et peuvent ainsi se répandre de manière plus importante et explorer de nouvelles rhizosphères. Cette hypothèse a ensuite été confirmée avec l'observation de bactéries adhérentes aux spores et aux hyphes d'AMF (Bianciotto et al., 1996b). Des études indiquent que les exopolysaccharides sont impliqués dans l'association bactérienne avec des spores et des hyphes d'AMF (Artursson et al., 2006 ; Bianciotto et al., 2001 ; Danhorn et Fuqua, 2007 ; Selvakumar et al., 2016 ; Miransari, 2011). Bianciotto et al. (2001) ont montré que les bactéries mutantes altérées dans leur production d'EPS ne pouvaient plus s'associer efficacement aux racines colonisées par l'AMF contrairement au phénotype sauvage.

### **1.5.5. Interaction avec les bactéries solubilisatrices du phosphate**

L'interaction entre les bactéries solubilisatrices du phosphate et les AMF est particulièrement étudié (Richardson et al., 2009). Étant donné que le mycélium externe des AMF agit comme un lien entre les racines et le sol environnant, le champignon peut aussi interagir en synergie avec les microorganismes du sol qui mobilisent le P du sol, soit par solubilisation ou minéralisation (Richardson et al., 2009). Les premiers travaux ont démontré des interactions microbiennes synergiques entre les bactéries solubilisatrices du phosphate (PSB) et les champignons mycorrhiziens (Azcon et al. 1976 ; Kucey 1987). Cette interaction continue à être investiguée (Richardson et al., 2009 ; Taktek et al., 2015).

## 1.6. Adaptation des plantes aux sols ultramafiques

### 1.6.1. Les métaux

Bien qu'ils soient considérés comme des oligo-éléments biologiquement nécessaires pour la plante, Ni, Co, Cu, Cr Mn et Zn sont des métaux qui même à de très faibles concentrations, sont toxiques pour les organismes (Adriano, 2001). Parmi ces métaux, le nickel est celui le plus toxique pour les plantes non adaptées, en effet sa biodisponibilité est en générale suffisante pour créer un stress physiologique (Rajkumar et al., 2009b). Pour exemple, sur les sols ultramafiques néo-calédoniens, le Ni est l'élément le plus toxique pour les organismes telluriques comparativement aux autres éléments métalliques (L'Huillier et Edighoffer, 1996). En effet, le Ni peut entraîner une altération de la conformation des protéines, des acides nucléiques ou des polysaccharides rendant certaines enzymes inactives allant jusqu'à réduire la viabilité de l'organisme. Pour les plantes, bien que le Ni à l'état de trace soit nécessaire pour le développement (Adriano, 2001), voir essentiel chez certaines espèces endémiques des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie (Fogliani, 2002), en quantité trop importante il devient toxique pour l'organisme. La plante résiste aux fortes concentrations en métaux en réduisant les effets négatifs sur ses tissus par divers mécanismes (Van der Ent et al., 2013b).

Trois stratégies sont mises en place par les plantes, pour faire face à cette contrainte. On distingue les espèces excluantes, les espèces indicatrices, et les espèces accumulatrices (Baker, 1981). Les espèces excluantes vont maintenir une concentration métallique constante dans les tiges quelle que soit la concentration retrouvée dans le sol. Ces plantes peuvent concentrer les métaux dans leur racine (facteur de translocation tige/racine  $< 1$ ) ou empêcher leur entrée par l'intermédiaire de sécrétion d'exsudats racinaires. Les exsudats racinaires responsables de cette immobilisation des métaux dans la rhizosphère sont en majorité des acides organiques à faible poids moléculaire. La sécrétion de ces composés varie d'une plante à l'autre et dépend des caractéristiques du sol (Chen et al., 2017). Les espèces indicatrices reflètent quant à elle, la concentration retrouvée dans le sol (facteur de translocation tige/racine = 1). Les espèces accumulatrices ont une capacité à transloquer et à accumuler de fortes concentrations en métaux dans les parties aériennes (facteur de translocation tige/racine  $> 1$ ). Au sein de ces espèces on distingue les plantes accumulatrices, des plantes hyperaccumulatrices sur la base des concentrations en métaux retrouvées dans les parties aériennes ( $> 10\ 000\ \text{mg kg}^{-1}$  pour le Mn et le Zn,  $>1000\ \text{mg kg}^{-1}$  pour le Cu, Co, Cr, Ni et le Pb et  $>50\ \text{mg kg}^{-1}$  pour le cadmium (Baker et Brooks, 1989 ; Wenzel et Jockwer, 1999).

Sur sols ultramafiques, les études dans le domaine de l'interaction bactérie/plante sont principalement tournées vers les aspects de phytoextraction (Mengoni et al., 2010 ; Rajkumar et al., 2009a) ainsi que les techniques visant à améliorer les rendements de production. Peu de travaux font état d'une utilisation des bactéries afin de réduire les effets toxiques des métaux pour la croissance des plantes (Etesami, 2018). Concernant les AMF, plusieurs études ont mis en évidence une amélioration de la tolérance aux fortes concentrations en métaux par l'intermédiaire d'une inoculation par des AMF (Amir et al., 2013 ; Lagrange et al., 2011). Le Ni est immobilisé dans le mycélium du champignon. Ce dernier agit comme une barrière contrôlant la quantité de Ni provenant du sol vers l'intérieur des racines, notamment via la production de glomaline (Bedini et al., 2010). Amir et al. (2013) suggèrent également que les structures intracellulaires des champignons réduisent également la quantité de Ni transloquée des racines vers les parties aériennes.

### **1.6.2. Le phosphore**

Sur les sols ultramafiques la quantité de phosphore disponible est limitante pour la croissance des plantes (Jaffré et L'huillier, 2010) en raison de la forte adsorption de cet élément par les oxydes et les hydroxydes de fer (Woodell, 1988). Dans ce contexte, les stratégies d'acquisition du phosphore par les plantes sont diverses et variées (Kazakou et al., 2008). Parmi ces adaptations, on peut citer (i) la modification du système racinaire (López-Bucio et al., 2003) (ii) la mise en place de symbioses mycorhiziennes (Smith et Read, 2008) ou encore (iii) l'interaction avec des bactéries solubilisatrices du phosphate (Kaushal et Wani, 2016 ; Yang et al., 2012). Au niveau de la modification du système racinaire, certaines espèces appartenant à la famille des Cyperaceae peuvent aller jusqu'à la formation de racines spécialisées : les racines dauciformes (Lambers et al., 2006 ; Lamont, 2003, 1974). Ces racines jouent un rôle fondamental dans l'amélioration de l'assimilation des nutriments notamment du phosphore par l'exsudation en grande quantité d'acides carboxyliques tels que l'acide malique ou l'acide citrique (Playsted et al., 2006 ; Shane et al., 2006, 2005). Ces racines vont également favoriser les interactions sol/plante avec l'augmentation de la surface d'exploration ou encore la présence de polysaccharides à la surface de ces racines (Lamont, 2003). La mise en place de ces structures spécialisées est corrélée avec des quantités faibles de phosphore disponibles pour la plante dans le sol (Lamont, 2003 ; Shane et al., 2005). Shane et al. (2005) ont montré que les racines dauciformes étaient plus efficaces que les mycorhizes dans les sols où le phosphore est présent sous forme minérale. Ces deux stratégies ne sont cependant pas excluant (Shane et al., 2006). Muler et al. (2014) ont montré que la présence de ces racines particulières facilitait

l'acquisition du phosphore par les espèces végétales voisines en augmentant sa disponibilité dans le sol. De plus, des travaux ont mis en avant le rôle des rhizobactéries dans la mise en place de ces structures via la synthèse de grande quantité d'AIA (Lamont et al., 2015).

### **1.7. Genre bactériens étudiés**

#### **1.7.1. Quelques éléments de taxonomie bactérienne**

La systématique bactérienne a commencé de la même manière que la systématique des animaux et des plantes. Cette systématique apparaît à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle et repose sur l'observation des caractères phénotypiques tels que la morphologie des cellules ou des colonies bactériennes ainsi que sur les tests biochimiques, physiologiques et immunologiques (Cohan, 2006). La découverte de la technique de réaction en chaîne de la polymérase (Mullis et al., 1986) a révolutionné la taxonomie, depuis il a fallu trouver un trait représentatif de la divergence évolutive des organismes. Ce caractère a été trouvé dans l'ARN ribosomal, molécule utilisée par toutes les cellules vivantes (Woese, 1987). Les séquences génétiques de la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal ont été utilisées depuis pour comparer les similitudes évolutives entre les souches. Il a été proposé qu'une similarité inférieure à 98,7-99% sur une analyse UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean) des séquences d'ADNr 16S de deux souches bactériennes soit suffisante pour les considérer comme appartenant à des espèces différentes (Stackebrandt et Gobel, 1994). Cependant, il est possible que deux souches présentent des similitudes de séquence d'ADNr 16S supérieures au seuil de 98,7% soient finalement deux espèces différentes. Dans ce cas une hybridation ADN-ADN des génomes entiers doit être réalisée et les souches qui présentent une similarité inférieure à 70% peuvent être considérées comme des espèces différentes (Johnson, 1973). De plus en plus, en taxonomie bactérienne, il est demandé de réaliser une approche polyphasique qui englobe l'ensemble des caractères phénotypiques, biochimiques et génotypiques des souches considérées et permet une caractérisation robuste des souches bactériennes (Vandamme et Peeters, 2014). En effet, au niveau phénotypique, les espèces bactériennes peuvent maintenant être distinguées par les composants d'acides gras (Vandamme et al., 1992) et plus récemment par spectrométrie de masse à désorption laser assistée par matrice couplée à un détecteur à temps de vol (MALDI-TOF), qui permet la caractérisation à haut débit des protéines de la paroi (Keys et al., 2004 ; Nacef et al., 2017 ; Suwantararat et al., 2016). Cette approche polyphasique est cependant remise en cause par certains scientifiques qui estiment qu'il s'agit d'une méthode contre-productive à la lumière du grand nombre d'espèces bactériennes qui attendent une description et une

dénomination formelle. Ils proposent donc qu'à l'ère de la génomique, une séquence génomique complète ainsi qu'une description minimale des caractéristiques phénotypiques soient suffisantes (Vandamme et Peeters, 2014).

### 1.7.2. Le genre *Burkholderia*

#### Taxonomie

Auparavant rattaché au genre *Pseudomonas*, le genre *Burkholderia* de la famille des *Burkholderiaceae* a été proposé par Yabuuchi et al. (1992). Ce genre compte aujourd'hui environ 90 espèces (Beukes et al., 2017). Les membres du genre sont décrits comme des bacilles, Gram négatif, aérobies stricts, non sporulants, non fermentaires et à catalase positive (Yabuuchi et al., 1992). Vandamme et Peeters (2014) le qualifient de « genre qui contient des bactéries présentant des propriétés à la fois bénignes et dévastatrice ». En effet, une revue publiée en 2012, indique en s'appuyant sur les analyses phylogénétiques que ce genre peut être divisé en deux clusters (Suárez-Moreno et al., 2012). Le premier cluster comprend les *Burkholderia* pathogènes pour l'Homme, l'animal ou les plantes incluant l'espèce *Burkholderia cepacia* ATCC 25416<sup>T</sup>. Le second cluster comprend les espèces non pathogènes, qui sont dans la majorité des bactéries associées avec les plantes et considérées comme bénéfiques pour la croissance de ces dernières (Suárez-Moreno et al., 2012). Cette séparation en deux clusters a conduit des auteurs à proposer la division du genre *Burkholderia* en deux genres (Sawana et al., 2014). Le genre *Burkholderia sensu stricto* contenant uniquement les espèces pathogènes pour l'Homme, l'animal et les plantes et le genre *Paraburkholderia* hébergeant les espèces qualifiées d'environnementales dont l'espèce type est *Paraburkholderia graminis* ATCC 700544<sup>T</sup> (Sawana et al., 2014). Cette proposition visant à scinder le genre *Burkholderia* a été critiquée par certains scientifiques qui ont déclaré que le but principal des changements proposés était la séparation du groupe pathogène de celui qui contient des bactéries bénéfiques pour les plantes. Ces dernières pouvant ainsi être utilisées dans diverses expérimentations sans traiter des questions de sécurité concernant les infections humaines causées par des membres de ce genre (Vandamme et Peeters, 2014). Pour répondre aux préoccupations en matière de sécurité, une étude du potentiel pathogène des espèces symbiotiques associées aux plantes du genre *Burkholderia* a été menée (Angus et al., 2014). Les auteurs ont montré qu'il était hautement improbable qu'elles puissent infecter les mammifères (Angus et al., 2014). Dobritsa et Samadpour (2016) ont classé dans le genre *Paraburkholderia*, onze nouvelles espèces qui avaient été caractérisées comme *Burkholderia* durant la période 2014-2015. Ils ont également proposé un nouveau genre pour classer douze espèces appartenant aux genres *Burkholderia* et



*Paraburkholderia* qu'ils ont appelé *Caballeronia* en hommage à J. Caballero-Mellado un microbiologiste mexicain, pionnier dans le domaine des bactéries en association avec les plantes (Dobritsa et Samadpour, 2016). L'espèce type est *Caballeronia glathei* ATCC 29125<sup>T</sup>. Plus récemment, des révisions taxonomiques ont été réalisées et ont abouti à la création de trois nouveaux genres (*Mycetohabitans*, *Trinickia* et *Robbsia* ; Estrada-de los Santos et al., 2018 ; Lopes-Santos et al., 2017). Tout au long de cette synthèse bibliographique le terme *Burkholderia* a été utilisé pour renvoyer à l'ensemble des genres *Burkholderia* (*sensu stricto*), *Paraburkholderia*, *Caballeronia*, *Mycetohabitans*, *Trinickia* et *Robbsia*.

### **Distribution**

Les *Burkholderia* associées aux plantes sont capables d'occuper différentes niches écologiques et d'établir des relations diverses avec les plantes. Les *Burkholderia* peuvent en effet se retrouver à l'état libre dans la rhizosphère ou endophytes, aussi bien au niveau des parties végétatives que reproductrices d'une grande diversité de plantes. Ce genre constitue celui le plus diversifié et le plus adapté aux conditions de l'environnement chez les bactéries en interaction avec les plantes (Coenye et Vandamme, 2003 ; Compant et al., 2008 ; Salles et al., 2004 ; Suárez-Moreno et al., 2012). L'occurrence de *Burkholderia* sur les sols riches en métaux est fréquente (Guo et al., 2015 ; Jiang et al., 2008 ; Zhu et al., 2012). En Nouvelle-Calédonie sur des sols ultramafiques, ce genre constitue le genre majoritairement retrouvé dans la rhizosphère de trois Cyperaceae : *Tetaria arundinaceae*, *Chamaedendron nervosa*, *T. raynaliana* (Gonin et al., 2013) et dans celle de *Sebertia accuminata* (Stoppel et Schlegel, 1995).

### **1.7.3. Le genre *Curtobacterium***

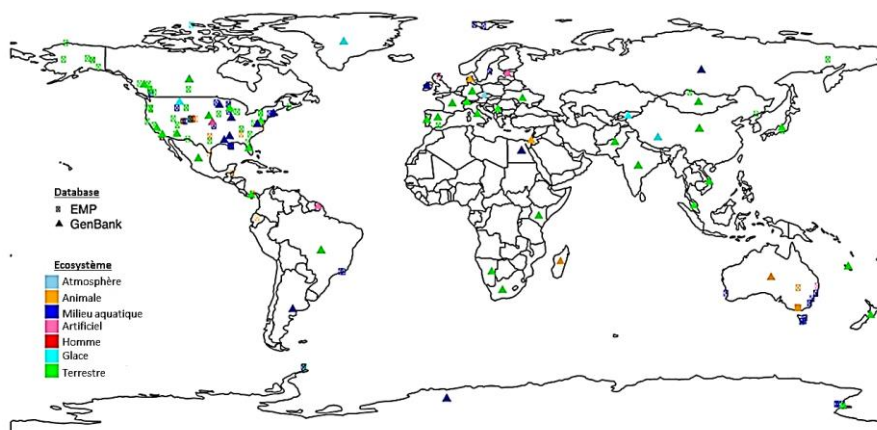
#### **Taxonomie**

Le genre *Curtobacterium* appartient à la famille des *Microbacteriaceae* (Park et al., 1993 ; Stackebrandt et al., 1997). Il a été proposé par Yamada et Komagata (1972) dans lequel six espèces avaient été classées : *Curtobacterium albidum*, *Curtobacterium citreum*, *Curtobacterium luteum*, *Curtobacterium pusillum*, *Curtobacterium saperdae* et *Curtobacterium testaceum*, isolées par Komagata et Izuka, (1964). Depuis ce sont ajoutées *Curtobacterium flaccumfaciens* (Hedges, 1922), (Collins et al., 1983), *Curtobacterium plantarum* (Dunleavy, 1989), *Curtobacterium herbarum*, (Behrendt et al., 2002), *Curtobacterium ammoniigenes* (Aizawa et al., 2007) et *Curtobacterium ginsengisoli*, (Kim et al., 2008). *C. saperdae* et *C. testaceum* ont été par la suite reclassées dans le genre

*Microbacterium* (Takeuchi et Hatano, 1998), *C. plantarum* dans le genre *Pantoea* (Gavini et al., 1989), et *C. ginsengisoli* dans le genre *Gryllotalpicola* (Kim et al., 2012). Les membres du genre sont décrits comme non-sporulants, Gram positif, aérobies stricts, à catalase positive. Sur milieu nutritif solide, les colonies sont jaunes/orangées, circulaires, lisses, légèrement convexes et brillantes (Evtushenko et Takeuchi, 2006 ; Saddler et Guimarães, 2015).

### Distribution

Le genre *Curtobacterium* est un genre cosmopolite retrouvé notamment dans des écosystèmes terrestres, aquatiques ou encore dans l'atmosphère. Une carte reprise des travaux de Chase et al. (2016) présentée en figure 1.5 permet de visualiser la répartition des bactéries appartenant à ce genre. Dans le sol, il s'agit d'un genre prédominant qui s'est révélé être le genre le plus abondant dans une communauté bactérienne d'une litière de feuilles dans le Sud de la Californie (Chase et al., 2016). La grande majorité des espèces décrites a été isolée à partir de plantes ou de leurs environnements directs. *C. citreum*, *C. albidum* et *C. luteum* ont été isolées des rizières (Komagata et Izuka, 1964). *C. ginsengisoli* à partir d'un champ de ginseng (Kim et al., 2008), *C. herbarum* à partir de la couche de litière d'herbacée (Behrendt et al., 2002) et *C. ammoniigenes* a été récupérée à partir de la tige d'une mauvaise herbe aquatique de marais acide au Vietnam (Aizawa et al., 2007). Des souches appartenant au genre *Curtobacterium* continuent à être isolées à partir de racines (Liu et al., 2016) ou de la rhizosphère (Román-Ponce et al., 2017). Une grande majorité des souches de *Curtobacterium* associées aux plantes semblent être endophytes (Araújo et al. 2001 ; Raweekul et Wuttitummaporn 2016 ; Sturz et Matheson 1996 ; Zinniel et al. 2002).



**Fig 1.5** Distribution géographique des isolats de *Curtobacterium*. Les couleurs indiquent les différents écosystèmes. La forme indique la source de donnée d'où provient la séquence (repris de Chase et al., 2016)

#### 1.7.4. Tolérance aux métaux au sein des genres étudiés

##### *Burkholderia*

Les *Burkholderia* sont retrouvées sur les sols ultramafiques laissant suggérer une tolérance de ces bactéries aux fortes concentrations en métaux. Au sein des *Burkholderia* des mécanismes (i) de biosorption et de bioaccumulation des métaux (Dourado et al., 2015 ; Madhaiyan et al., 2007 ; Zhu et al., 2012), (ii) de formation de biofilm (Vega et al., 2014) et (iii) de production d'EPS (Ferreira, 2011) ont été décrits (Gupta et Diwan, 2017). A ce jour il apparaît que la production d'EPS a été mise en évidence uniquement pour des espèces appartenant au genre *Paraburkholderia* : *P. caribensis* (Achouak et al., 1999), *P. kururiensis* (Suárez-Moreno et al., 2012), *P. tropica* (Serrato et al., 2006) et *P. phytofirmans* (Silipo et al., 2008). La structure moléculaire des EPS produits par ces cinq espèces a été déterminée pour les EPS de *P. caribensis*, *P. phytofirmans* et *P. kururiensis* (Mattos et al., 2001 ; Pol-fachin et al., 2010 ; Silipo et al., 2008 ; Vanhaverbeke et al., 2003). Les EPS sécrétés par les *Parburkholderia* sont particulièrement étudiés (Ferreira, 2011 ; Suárez-Moreno et al., 2012 ; Vanhaverbeke et al., 2003). Ferreira (2011) suggère que ces EPS ont un rôle dans l'adaptation de ces espèces à leur environnement. Parmi ces rôles on retrouve le rôle de protection face à la dessiccation, face au stress métallique ou un rôle dans l'agrégation du sol (Ferreira, 2011). En effet, ces EPS peuvent influencer la stabilité des agrégats du sol en interagissant avec les particules d'argiles. Ils permettent ainsi le maintien des propriétés mécaniques et physiques des sols. Vanhaverbeke et al. (2003) ont émis l'hypothèse que l'EPS de *P. caribensis* MWAP71 présentaient des interactions avec les différentes couches d'argiles du sol induisant ainsi une dispersion de l'argile dans une matrice polymérique favorisant l'hydratation des sols.

##### *Curtobacterium*

Des souches appartenant au genre *Curtobacterium* ont été isolées des tissus des plantes hyperaccumulatrices de nickel : des tiges de *Alyssum bertolonii* (Barzanti et al., 2007), de la rhizosphère de *Alyssum serpyllifolium* (Becerra-Castro et al., 2011b) et de la rhizosphère de *Thlaspi goesingense* (Idris et al., 2004). Cette occurrence de bactéries appartenant au genre *Curtobacterium* dans un environnement riche en nickel laisse supposer l'existence de mécanisme d'adaptation aux fortes teneurs en nickel. Une seule étude reportant des mécanismes reliés à la gestion des métaux a pu être retrouvée dans la littérature, il s'agit d'une étude portant sur la capacité d'une souche de *Curtobacterium* à éliminer le nickel ainsi que le plomb, d'une solution aqueuse (Masoumi et al., 2016). Les auteurs ont mis en évidence que la souche de

*Curtobacterium* sp. FM01 éliminait les métaux par l'intermédiaire d'un mécanisme de biosorption au niveau de la paroi cellulaire.

### **1.7.5. Effet de promotion de la croissance des plantes au sein des genres étudiés**

#### **Burkholderia**

Une synthèse des effets des *Burkholderia* en association avec les plantes a été réalisée par Suarez-Moreno et al. (2012). Une mise à jour a été effectuée et est présentée en Table 1.3. On retrouve l'ensemble des propriétés PGP citées plus haut.

#### **Curtobacterium**

Bien que les bactéries appartenant au genre *Curtobacterium* soient majoritairement retrouvées en association avec les plantes et jouent un rôle crucial dans la dégradation de la matière organique au sein des communautés de litière (Chase et al., 2016), seules deux études décrivant les effets d'une inoculation d'isolats de *Curtobacterium* sur les plantes ont pu être retrouvées. Raupach et Kloepper (2000) ont montré qu'une souche de *C. flaccumfaciens* favorisait considérablement la croissance des concombres par rapport aux témoins non traités. Sturz et al. (1997) ont montré sur *Trifolium pretense* qu'une souche de *C. citreum* réduisait significativement la biomasse racinaire et qu'une souche de *C. luteum* augmentait significativement la biomasse des pousses. Des études plus récentes mettent en évidence de traits PGP chez les *Curtobacterium* (Ahmad et al., 2008 ; Bulgari et al., 2014 ; Kandel et al., 2017b ; Pereira et Castro, 2014) mais sans mettre en évidence des effets sur plante. Bulgari et al. (2014) ont séquencé l'intégralité du génome de la souche *Curtobacterium* sp. S6 et ont montré la présence de traits bénéfiques pour (i) la nutrition minérale des plantes (solubilisation des phosphates, synthèse de sidérophores), (ii) le développement des plantes (synthèse IAA), (iii) la diminution du stress (activité de l'ACC déaminase et de la catalase) et (iv) contrôle des pathogènes (activité de la chitinase et synthèse de sidérophores).

### **1.7.1. Interaction des genres étudiés avec les champignons mycorhiziens à arbuscules**

#### **Burkholderia**

Les bactéries appartenant au genre *Burkholderia* sont considérées comme étant des MHB (Bonfante et Anca, 2009) mais sont majoritairement retrouvées en interaction avec des champignons ectomycorhiziens (Turrini et al., 2018).

## CHAPITRE 1

**Table 1.3** Caractéristiques PGP des *Burkholderia* en association avec les plantes (adapté de Suarez-Moreno et al., 2012 et mis à jour).

Espèce	Région	Isolé de	Hôte/Type de sol	Caractéristiques	Références
<i>Paraburkholderia acidipaludis</i>	Asie du Sud-Est	Endosphère, rhizosphère	<i>Eleocharis dulcis</i>	<i>nif+</i> , résistant aux fortes concentration en aluminium	(Aizawa et al., 2010a)
<i>P. bannensis</i>	Thaïlande	Rhizosphère	<i>Panicum repens</i>	<i>nif+</i>	(Aizawa et al., 2011)
<i>P. bryophila</i>	Allemagne	Mousses	<i>A. palustre</i> , <i>S. palustre</i> , <i>S. rubellum</i>	PGP et activité anti-fongique	(Vandamme et al., 2007)
<i>P. caledonica</i>	Ecosse	Rhizosphère, sol	<i>Vitis vinifera</i>	<i>acdS</i> et <i>braI/R</i>	(Coenye et al., 2001)
<i>P. caribensis</i>	Martinique, Mexique	Nodules, vertisol, sol	<i>Mimosa diplotricha</i>	Promotion de la croissance et augmentation des teneurs en azote <i>nif+</i> , <i>nod</i> , <i>acdS</i> , <i>braI/R</i> et forte production d'EPS	(Achouak et al., 1999 ; Parra-Cota et al., 2014)
<i>P. ferrariae</i>	Brésil	Sol	Mine de fer	<i>nif+</i> et solubilisation du phosphate	(Valverde, 2006)
<i>P. fungorum</i>	Ecosse	Endosymbiote fongique	<i>P. chrysosporium</i>	<i>braI/R</i> , <i>acdS</i> et dégradation des composés aromatiques	(Coenye et al., 2001)
<i>P. graminis</i>	Espagne, France	Rhizosphère	<i>Zea mays</i> , <i>L. deliciosus</i> , <i>P. pinea</i> , <i>S. lycopersicum</i>	<i>acdS</i> , <i>braI/R</i> , peut induire la résistance systémique et la tolérance à la sécheresse et à la salinité	(Barriuso et al., 2005 ; Viillard et al., 1998)
<i>P. ginsengisoli</i>	Corée du Sud	Rhizosphère	<i>Panax ginseng</i>	$\beta$ -Galactosidase a	(Kim et al., 2006)
<i>P. heleia</i>	Vietnam	Rhizosphère	<i>Eleocharis dulcis</i>	<i>nif+</i> et croissance en milieu acide	(Aizawa et al., 2010b)
<i>P. hospita</i>	-	Sol	Sol agricole	<i>braI/R</i>	(Goris et al., 2002)
<i>P. kururiensis</i>	Japon	Endosphère, rhizosphère, sol pollué	<i>Oryza sativa</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Mussa acuminata</i> , <i>Nicotiana tabacum</i>	<i>nif+</i> , <i>acdS</i> , <i>braI/R</i> , PGP et dégradation des composés aromatiques	(Zhang et al., 2000)
<i>P. megapolitana</i>	Allemagne	Mousses	<i>A. palustre</i>	PGP et activité anti-fongique	(Vandamme et al., 2007)
<i>P. metalliresistens</i>	Chine	Sol	Sol pollué en métaux	Phytoremédiation	(Guo et al., 2015)

## CHAPITRE 1

<i>P. mimosarum</i>	Taiwan, Amérique du Sud	Nodules	<i>Mimosa pigra</i> , <i>Mimosa pudica</i> , <i>Mimosa scrabrella</i>	<i>nod+</i> , <i>nif+</i> , <i>braI/R</i> et endosymbiote majeur chez <i>Mimosa</i> spp.	(Chen, 2006)
<i>B. novacaledonica</i>	Nouvelle-Calédonie	Rhizosphère	<i>T. arundinaceae</i> , <i>C. nervosa</i> <i>T. raynaliana</i>	Production d'ACC déaminase, d'AIA, de sidérophores, solubilisation du phosphate et tolérance aux fortes concentrations en Ni, Co, Cr, Mn	(Gonin et al., 2013 ; Guentas et al., 2016)
<i>P. nodosa</i>	Amérique du Sud	Nodules	<i>M. bimucronata</i> , <i>M. scrabrella</i>	<i>nif+</i> , <i>nod+</i> et formation de <i>nodule</i> chez <i>Mimosa</i> spp.	(Chen et al., 2007)
<i>P. phenazinium</i>	Australie, France	Sol, Mousses	<i>S. rubellum</i>	<i>braI/R</i> et tolérance à l'acidité	(Izumi et al., 2008 ; Viallard et al., 1998)
<i>P. phymatum</i>	Maroc, Sénégal, Afrique du Sud, Guyane	Nodules	<i>Mimosa</i> spp., <i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>nif+</i> , <i>nod+</i> , <i>acdS</i> , <i>braI/R</i> et fixation de l'azote in vivo et ex planta	(Goris et al., 2002 ; Talbi et al., 2010)
<i>P. phytofirmans</i>	Pays bas	Endosphère, rhizosphère	<i>Allium cepa</i> , <i>Solanum</i> spp., <i>Oryza sativa</i> , <i>Arabidospis thaliano</i>	<i>acdS</i> , <i>braI/R</i> , PGP, activité anti-fongique et tolérance à la salinité et au froid	(Pinedo et al., 2015 ; Sessitsch, 2005 ; Su et al., 2015)
<i>P. sabiae</i>	Brésil	Nodules	<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i>	<i>nif+</i> , <i>nod+</i> et production de PHA	(Chen et al., 2008)
<i>P. saccharii</i>	Brésil	Sol	<i>Saccharum officinarum</i>	<i>braI/R</i> et production de PHA	(Bramer et al., 2001)
<i>P. sartisoli</i>	Belgique	Rhizosphère, sol pollué, compost	<i>Zea mays</i>	Dégradation des composés aromatiques	(Vanlaere et al., 2008)
<i>P. sediminicola</i>	Corée du Sud	Sédiment dans l'eau	-	Production de PHA	(Lim et al., 2008)
<i>P. silvatlantica</i>	Brésil	Rhizosphère, endosphère	<i>Zea mays</i> , <i>S. officinarum</i> , <i>A. comosus</i>	<i>nif+</i> , <i>acdS</i> , <i>braI/R</i> et PGP	(Perin, 2006)
<i>P. terrae</i>	Corée du sud, Mexique	Sol, rhizosphère	Forêt, <i>Lycopersicum esculentum</i>	<i>nif+</i> , <i>braI/R</i>	(Kim et al., 2006 ; Wong-Villarreal et Caballero-Mellado, 2010)
<i>P. terricola</i>	-	Sol	-	<i>acdS</i> , <i>braI/R</i>	(Goris et al., 2002)
<i>P. tropica</i>	Mexique, Brésil	Rhizosphère, endosphère	<i>S. officinarum</i> , <i>L. esculentum</i> , <i>Zea mays</i> , <i>A. comosus</i>	<i>nif+</i> , <i>acdS</i> , <i>braI/R</i> , production de PHA et d'EPS et PGP	(Reis, 2004)

## CHAPITRE 1

<i>P. tuberum</i>	Sénégal, Afrique du sud, Guyane	Nodules	<i>Cyclopia</i> spp., <i>Macroptilium atropurpureum</i>	<i>nif+</i> , <i>nod+</i> , <i>acdS</i> , <i>braI/R</i> et formation de nodules	(Moulin et al., 2001 ; Vandamme et al., 2002)
<i>P. unamae</i>	Ecosse	Endosphère, rhizosphère	<i>Zea mays</i> , <i>S. officinarum</i> , <i>Coffea arabica</i>	<i>nif+</i> , <i>acdS</i> , <i>braI/R</i> , PGP, Remédiation des sols	(Coenye et al., 2001)
<i>B. ultramafica</i>	Nouvelle- Calédonie	Rhizosphère	<i>T. arundinaceae</i> , <i>C. nervosa</i> <i>T. raynaliana</i>	Production d'ACC déaminase, d'AIA, de sidérophores, solubilisation du phosphate et tolérance aux fortes concentration en Ni, Co, Cr, Mn	(Gonin et al., 2013 ; Guentas et al., 2016)
<i>P. xenovorans</i>	Brésil, Etats- Unis	Rhizosphère, sol pollué	<i>S. lycopersicum</i> , <i>Coffea arabica</i>	<i>nif+</i> , <i>acdS</i> , <i>braI/R</i> , Remédiation des sols	(Bramer et al., 2001 ; Goris, 2004)
<i>Paraburkholderia</i> sp. strain Q208	Australie	Rhizosphère	<i>Saccharum officinarum</i>	PGP	(Paungfoo-Lonhienne et al., 2014)
<i>Paraburkholderia</i> sp. strain J62	Chine	Sol pollué	<i>Brassica juncea</i> , <i>Zea mays</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i>	Production d'ACC deaminase, AIA, siderophore, solubilisation des métaux, solubilisation du phosphate, PGP et de l'accumulation de métaux	(Jiang et al., 2008)
<i>Paraburkholderia</i> sp. strain RX232	Autriche	Rhizosphère	<i>Salix caprea</i>	Production d'ACC deaminase, siderophore, PGP, réduction des concentrations en métaux	(Kuffner et al., 2010)
<i>Paraburkholderia</i> sp. strain CBMB40	-	Endosphère	<i>Lycopersicon esculentum</i>	PGP et réduction des concentrations en métaux (Ni)	(Madhaiyan et al., 2007)
<i>Paraburkholderia</i> sp. strain LD-11	Chine	Sol	Mine de cuivre	PGP, tolérance aux métaux, production d'AIA, d'ACC déaminase et de sidérophores, Phytoremédiation	(Fan et al., 2015 ; Huang et al., 2013)

Note : *nif+* : présence des gènes *nifH*, *nod+* : nodulation vérifiée sur la plante, *acdS* : présence du gène codant pour l'ACC déaminase, *braI/R* : présence du *BraI/R* QS system, EPS : exopolysaccharides et PHA : polyhydroxyalcanoates, PGP : promotion de la croissance des plantes

L'occurrence de *Burkholderia* à l'intérieur des tissus d'AMF a cependant été reportée (Bianciotto et al., 2000, 1996a ; Minerdi et al., 2002). Plus récemment, une bactérie solubilisatrice de phosphate appartenant au genre *Burkholderia* a été isolée d'hyphes de *Rhizophagus irregularis* (Taktek et al., 2015).

### *Curtobacterium*

Au niveau de l'interaction avec des AMF, il n'existe pour l'instant qu'une seule étude ayant montrée une interaction positive entre une bactérie appartenant au genre *Curtobacterium* et un AMF. Long et al. (2017) ont isolé une souche de *Curtobacterium* à partir de spores de *Gigaspora margarita*. Les auteurs ont montré que cette co-inoculation augmentait la colonisation mycorhizienne et la croissance de la plante. Ils ont expliqué ce phénomène via la faculté de la souche à dégrader la chitine, l'un des composants principaux de la paroi des spores, ce qui améliorerait la germination des spores.

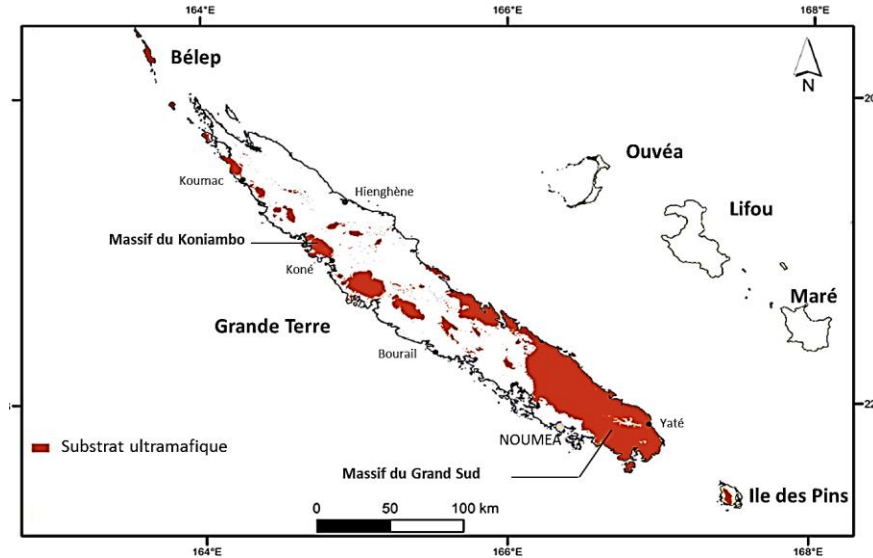
## **1.8. Contexte néo-calédonien**

### **1.8.1. Contexte géographique**

L'archipel de la Nouvelle-Calédonie (Fig 1.6) se situe dans le Sud-Ouest de l'Océan Pacifique à environ 1500 km à l'Est de l'Australie et à 1800 km au Sud de la Nouvelle-Zélande. Il est constitué d'une île principale (La Grande Terre), entourée au Nord par les îles Bélep, au Sud par l'île des Pins et à l'est par les îles Loyautés. La Grande Terre orientée Nord-Ouest/Sud Est s'étend sur environ 450 km de long et 50 km de large. Les côtes Est et Ouest sont séparées par une chaîne de montagne dominée par le Mont Panié avec une altitude de 1628m. Un tiers de la surface de l'archipel est recouvert par des substrats ultramafiques (Fig 1.6) qui est une résultante de l'histoire géologique particulière de la Nouvelle-Calédonie (Pelletier, 2006 ; Spandler et al., 2005).



## CHAPITRE 1



**Fig 1.6** Carte de la Nouvelle-Calédonie avec en rouge la répartition des substrats ultramafiques

### 1.8.2. Histoire géologique

La description de cette histoire géologique est tirée des travaux de Spandler et al. (2005). L'archipel de la Nouvelle-Calédonie est la résultante d'une succession de phénomènes géologiques, qui ont débuté il y a environ 90 Ma. Au Permien – début Crétacé la séparation d'un morceau de croûte continentale du supercontinent Gondwana suite à l'ouverture de la mer de Tasman donne naissance à un fragment (où se déposent des sédiments d'origine volcanique) qui dérive vers l'Est. Durant cette dérive, ce fragment de croûte continentale va être immergé profondément entraînant une accumulation de sédiments pélagiques marins. A l'Eocène, l'île a subi un évènement géologique important, en effet un phénomène de subduction de la Grande Terre sous la plaque Pacifique, associé à un phénomène d'obduction (du fait des différences de densités entre les croûtes océaniques et continentales) va entraîner la remontée de la Grande Terre. Ce mécanisme va emporter des morceaux de la lithosphère océanique qui est à l'origine des roches et des sols ultramafiques. A la fin de l'Eocène, ce feuillet de roches ultramafiques a été altéré et érodé entraînant sa fragmentation en plusieurs massifs que l'on observe actuellement.

### 1.8.3. Diversité floristique retrouvée sur ces sols

La flore vasculaire de Nouvelle-Calédonie comprend 3371 espèces de plantes autochtones et son taux d'endémisme est d'environ 75% (Morat et al., 2012). Compte tenu de sa faible superficie (19 100 km<sup>2</sup>), la Nouvelle-Calédonie présente une forte richesse spécifique (Jaffré et

L'Huillier, 2010 ; Morat et al., 2012). On retrouve par exemple six cents espèces végétales dites micro-endémiques dont trois cents n'existant que sur une localité (Wulff, 2012). L'île est également reconnue comme étant un des lieux concentrant une des plus importantes flores métallophytes du monde (plantes pouvant se développer sur des sols riches en métaux phytotoxiques). La flore de Nouvelle-Calédonie demeure cependant encore « méconnue », en effet seulement 65% des espèces actuellement décrites ont fait l'objet d'une révision récente, postérieure à 1967 (Morat et al., 2012). Une part de la grande biodiversité végétale se retrouve sur sols ultramafiques, où la flore est plus riche que la flore de l'ensemble des autres substrats géologiques (94,6% des plantes vasculaires inféodées strictement aux substrats ultramafiques sont endémiques à la Nouvelle-Calédonie) (Isnard et al., 2016 ; Morat et al., 2012). Les contraintes édaphiques ne sont pas les seuls facteurs responsables de cette biodiversité unique, elle s'explique également par les variations de l'environnement (topographie, pluviométrie, altitude, température) et l'isolement géographique (Isnard et al., 2016).

#### **1.8.4. Exploitation minière et impact sur l'environnement**

L'accroissement de la population mondiale et le développement économique des pays émergents ont conduit à une augmentation continue des besoins en énergies et en matières premières. Pour le nickel, en 2018 les prévisions indiquaient par exemple que la demande excédait l'offre (2.206Mt (mégatonne) produites et 2.259Mt consommées) avec une tonne de nickel qui s'échangeait en Février 2018 légèrement au-dessus de 13 400 dollars au London Metal Exchange (International Nickel Study Group, 2018, <https://insg.org>, page consultée en Février 2018). La Nouvelle-Calédonie abrite entre 20 et 25% des ressources en nickel du monde, ce qui la classe parmi les plus grands producteurs de nickel au monde. En Nouvelle-Calédonie, l'exploitation par excavation des massifs ultramafiques comme source de minerai de nickel impacte fortement les écosystèmes terrestres et menace leur équilibre biologique (L'Huillier et Jaffré, 2010). L'impact de ces activités s'exprime par des zones dénudées, sans couvert végétal, avec des marques d'érosion importantes (Fig 1.7). A cela, viennent s'ajouter, des perturbations des régimes hydriques et des transports de matériaux sur les pentes et dans les cours d'eau entraînant une pollution ainsi qu'une perte de la biodiversité. Cette dernière est principalement due aux décapages des horizons de surface, aux recouvrements par des déblais terreux mais également à la pollution des cours d'eau (Jaffré et L'huillier, 2010). Les risques de pertes de biodiversité sont d'autant plus importants que

## CHAPITRE 1

ces milieux touchés par l'activité minière se trouvent déjà dans une situation critique de part, leur faible étendue naturelle, leur fragmentation et leurs taux d'endémisme élevés (Jaffré et al., 2004 ; L'Huillier et Jaffré, 2010). En 2006, il a été estimé que, depuis le début des exploitations, 22 000 hectares avaient été impactés par l'activité minière soit 1,2% de la surface de la grande Terre (L'Huillier et Jaffré, 2010).



**Fig 1.7** Impacts de l'activité minière sur l'environnement, a. Usine de Vale à Goro ; b. Mine orpheline, massif du Koniambo ; c. Ancienne mine sur la Côte Est ; d. Ancienne exploitation minière sur la Côte Ouest (dimenc.nc)

### Historique de l'exploitation minière en Nouvelle-Calédonie

L'histoire du nickel en Nouvelle-Calédonie débute en 1864 suite à la découverte par Jules Garnier d'une roche alors inconnue constituée de silicate de nickel et de magnésium qui sera nommée plus tard « Garniérite ». L'exploitation du minerai de nickel a débuté en 1873 et jusqu'en 1920, il s'agissait principalement d'une exploitation dans des galeries souterraines. Depuis 1920, cette exploitation se fait principalement sur mines à ciel ouvert ; ce qui nécessite le décapage de la végétation et des horizons de surface à trop faible teneur en nickel. Ces horizons décapés constituent les stériles miniers qui sont déplacés et stockés. A partir de 1950 et suite à la mécanisation des techniques d'exploitation, l'intérêt s'est porté sur des gisements garniérinitiques

retrouvés sous d'importants recouvrements latéritiques. Les stériles miniers plus conséquents étaient déversés dans les talwegs et sur les flancs de montagne. Ces techniques d'extraction et de stockage des stériles ont ensuite évoluées dans le milieu des années 70 grâce à une prise de conscience des dégâts importants qu'engendraient les exploitations minières sur l'environnement (Pitoiset, 2015). Désormais, l'érosion est contrôlée par une meilleure gestion des eaux de surface et la restauration des zones décapées (L'Huillier et Jaffré, 2010).

### **Législation**

En Nouvelle-Calédonie, les premiers textes sur la réglementation minière datent de 1870 mais ne traitaient pas des questions environnementales. C'est en 2008 que le schéma de mise en valeur des richesses minières a été adopté au congrès de la Nouvelle-Calédonie et a abouti à la mise en place du code minier en vigueur depuis 2009. Ce texte regroupe l'ensemble des règles concernant l'exploitation des principaux minerais de la Nouvelle-Calédonie. Différents points qui attirent à l'environnement apparaissent dans ce texte notamment « l'obligation de fournir une étude d'impact avant exploitation », « la constitution par l'exploitant d'un schéma de réhabilitation des zones dégradées » ou encore « l'obligation de réparation des dégradations dues à l'activité minière par la constitution préalable de garanties financières destinées à assurer la remise en état et la réhabilitation des zones dégradées ». D'autres outils de réglementation sont en place comme le fond Nickel, adopté en 2009 par le gouvernement de la Nouvelle-Calédonie et les provinces Nord et Sud, qui a pour but d'aider les sociétés minières en cas de crise et de réhabiliter les anciens sites miniers (L'huillier et al., 2010).

#### **1.8.5. Restauration écologique en Nouvelle-Calédonie**

La restauration écologique réalisée en Nouvelle-Calédonie se traduit par la mise en place d'un couvert végétal qui va permettre d'une part de réguler les débits hydriques et diminuer ainsi l'érosion et d'autre part de limiter les impacts paysagers dus à l'exploitation minière. Le principe préconisé consiste à amorcer le processus de succession primaire ou à accélérer le processus de succession écologique secondaire. Cette technique se fait par l'implantation d'espèces pionnières qui sont des espèces capables de s'implanter en pleine lumière sur des substrats dénudés. Ces espèces sont destinées à former une première couverture végétale qui doit ensuite favoriser l'implantation d'espèces plus variées. Cette seconde couverture devra permettre d'amorcer les

## CHAPITRE 1

processus de succession végétale permettant à terme la restauration d'un couvert végétal plus complexe et plus diversifié (L'huillier et al., 2010) et d'assurer la stabilité des agrégats du sol (Demenois et al., 2017b). Les premiers essais de revégétalisation en Nouvelle-Calédonie datent de 1971, et utilisaient des espèces à croissance rapide (i) exotiques (Pin des Caraïbes, Acacias australiens, Poacées diverses) et (ii) locales (*Acacia spirorbis*, *Casuarina collina*). L'objectif était la mise en place rapide d'une couverture végétale pour diminuer la lixiviation des nutriments et augmenter la fixation d'azote par l'intermédiaire des symbioses fixatrices d'azote (Cherrier, 1990). Ces essais, n'avaient pas pour but la restauration des écosystèmes historiques. Suite à de nombreux échecs, les essais suivants, se sont appuyés sur les travaux de botanique et d'écologie végétale (Jaffré, 1980 ; Jaffré et Latham, 1976, 1974 ; Woodell, 1988) qui ont permis d'identifier des espèces endémiques pionnières ce qui a conduit à l'élaboration d'une liste d'espèces locales plus adaptées à la restauration (Jaffré et al., 1997). Cet inventaire a permis de diminuer l'utilisation des espèces locales à caractère grégaire ainsi que l'utilisation des espèces exotiques, potentiellement envahissantes. Aujourd'hui, 120 espèces végétales sont utilisées en revégétalisation (Wulff et al., 2010). Ces dix dernières années des travaux portant sur l'amélioration de la restauration des sites miniers et notamment sur une meilleure compréhension du fonctionnement de l'interface sol/plante ont été financés par le CNRT (Centre National de Recherche Technologique), organisme de soutien à une recherche fondamentale et appliquée sur le Nickel et son environnement (<http://www.cnrt.nc/>). Ces différents projets ont notamment abouti à l'édition d'un guide d'utilisation des topsoils (disponible en ligne : <http://www.cnrt.nc/wp-content/uploads/2018/12/CNRT-Tome-ENV-2018-GUIDE-TOPSOIL-projet-ECOMINE-Edition.pdf>), ou encore à la mise en place d'un indicateur de réussite de la restauration en se basant sur une analyse des expérimentations et actions de restauration écologique réalisées sur sites miniers depuis 30 ans (Projet RECOSYNTH).

### **1.8.6. Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes en Nouvelle-Calédonie**

En Nouvelle-Calédonie, peu de travaux ont été réalisés sur les PGPR. Dans la littérature, les premiers travaux répertoriés sont la thèse de doctorat de Sylvia Mercky et les publications scientifiques associées (Mercky, 1999, 1998). Ces travaux ont montré qu'il existait un certain nombre de souches qui présentent des propriétés promotrices de la croissance des plantes et

## CHAPITRE 1

potentiellement intéressantes à utiliser en agronomie ou en restauration écologique. Ces travaux ont également souligné la nécessité d'acquérir des connaissances sur la microflore bactérienne des sols ultramafiques plutôt que d'introduire des espèces exogènes connues. Plus récemment, des études concernant les communautés bactériennes associées aux plantes des massifs ultramafiques de Nouvelle-Calédonie (Gensous, 2014 ; Gonin et al., 2013 ; Guentas et al., 2016 ; Hery et al., 2003 ; Klonowska et al., 2012 ; Lagrange, 2009) ont souligné la nécessité de prendre en compte les interactions plante/bactérie dans la rhizosphère pour les stratégies de revégétalisation. Ces travaux ont mis en avant la nécessité d'une meilleure connaissance (i) des communautés des espèces microbiennes du sol (ii) des mécanismes d'adaptation de ces microorganismes face à la contrainte édaphique, (iii) du mode de fonctionnement de l'interface sol/plante lors de la contrainte édaphique ainsi que (iv) de l'utilisation des plantes endémiques dans les programmes de revégétalisation. Les travaux de Gensous (2014) ont montré qu'une co-inoculation PGPR/AMF pouvait entraîner une complémentarité des effets bénéfiques sur les plantes.

**2. Chapitre 2 Rôle du biofilm et des exopolysaccharides dans l'adaptation à la toxicité métallique de *Caballeronia novacaledonica* comb. nov. et de *Paraburkholderia ultramafica* comb. nov., isolées des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie**

## Introduction

En 2016, la caractérisation des souches appartenant au genre *Burkholderia* a été réalisée et a permis d'identifier deux nouvelles espèces bactériennes *Burkholderia novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> et *Burkholderia ultramafica* STM10279<sup>T</sup> (Guentas et al., 2016). Gonin et al., (2013) ont montré que ces souches présentaient une adaptation aux conditions édaphiques des sols ultramafiques. Pour aller plus loin, différents mécanismes de résistance aux métaux (bioaccumulation, biosorption, production de biofilm et d'exopolysaccharides) ont été investigués. La compréhension de ces mécanismes de résistance est primordiale, car ils peuvent être directement liés aux quantités de métaux retrouvées dans les plantes (Etesami, 2018 ; Koechler et al., 2015).

Le chapitre 2 est présenté sous la forme d'un article scientifique. Cet article a été soumis dans la revue *Journal of Microbiology*. Il présente les mécanismes mis en place par *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> et *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> face aux métaux et le rôle de ces bactéries dans l'adaptation des plantes à la contrainte édaphique. Ces rôles potentiels ont été mis en évidence par la réalisation d'une expérimentation en serre sur *Tetradlea comosa*, plante pionnière des maquis miniers, utilisée dans les programmes de restauration écologique.

La taxonomie au sein du genre *Burkholderia* est en constante évolution (Estrada-de los Santos et al., 2018). Parmi les espèces de *Burkholderia* reclassées, on retrouve celles présentant les séquences génétiques de la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal les plus proches de *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> et *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup>. Il s'agit pour *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> de *B. ginsengisoli* KMY03<sup>T</sup> (Kim et al., 2006) et *B. terricola* R8118<sup>T</sup> (Goris et al., 2002) qui ont été reclassés dans le genre *Paraburkholderia* et pour *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> de *B. zhejiangensis* OP1<sup>T</sup> (Lu et al., 2012) et *B. grimmiae* R27<sup>T</sup> (Tian et al., 2013) reclassées dans le genre *Caballeronia*. La reclassification de ces espèces suggère que *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> et *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> devraient donc être reclassées.

L'intégralité des expérimentations ont été réalisées par moi-même, avec l'aide d'une stagiaire de deuxième année de licence que j'ai encadré (F. Cussoneau), mis à part l'obtention et l'analyse du spectre infrarouge de l'EPS de *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup>. Différents collaborateurs sont toutefois intervenus pour l'encadrement des expérimentations sur la formation de biofilm et sur la l'obtention et l'analyse des spectres infrarouges de l'EPS.



**Implication of biofilm and exopolysaccharide production in adaptation to metal toxicity of *Caballeronia novacaledonica* comb. nov. and *Paraburkholderia ultramafica* comb. nov. isolated from New Caledonian ultramafic soil**

Alexandre BOURLES<sup>1</sup>, Linda GUENTAS<sup>1,2,†</sup>, Simon GENSOUS<sup>1</sup>, Flavie CUSSONNEAU<sup>1</sup>, Valérie MEDEVIELLE<sup>1</sup>, Farid JUILLOT<sup>3</sup>, Alexis BAZIRE<sup>4</sup>, Michaël MEYER<sup>1</sup>, Valérie BURTET-SARRAMEGNA<sup>1</sup>, Yvon CAVALOC<sup>1</sup>, Philippe JOURAND<sup>5</sup>, Hamid AMIR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut de Sciences Exactes et Appliquées, Université de la Nouvelle-Calédonie, BR R4 98851 Noumea, New Caledonia

<sup>2</sup>Université de Toulon, Laboratoire MAPIEM EA 4323, SeaTech-Ecole d'ingénieurs BP 20132 83957 La Garde Cedex, France

<sup>3</sup>UMR IRD 206 - Institut de Recherche pour le Développement, Centre IRD Nouméa, 101 Promenade Roger Laroque, BP A5 - 98848 Noumea Cedex

<sup>4</sup>Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA 3884, LBCM, IUEM Université de Bretagne-Sud, 56100 Lorient, France

<sup>5</sup>IRD, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM UMR040), Campus International de Baillarguet, TA A-82/J, Montpellier F-34398 Cedex 05, France

**†Corresponding author:** [linda.guentas@univ-nc.nc](mailto:linda.guentas@univ-nc.nc) (L. Guentas), Université de la Nouvelle-Calédonie, BR R4 98851 Noumea, New Caledonia. Phone Number: +687290262

**Abstract**

In New Caledonia, one third of the main island is covered by ultramafic soils characterized by high levels of metals and low levels of essential plant nutrients. Application of metal tolerant bacteria plays an important role in plant adaptation to edaphic constraints as they help to evade metal-induced toxicity in plants. In this study, metal profiles tolerance of *Burkholderia ultramafica* STM10279<sup>T</sup> and *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup>, isolated from New Caledonian ultramafic soils were investigated. We intended to determine the mechanisms evolved by these bacteria to face metal toxicity and their implication on the metal adaptation of *Tetraria comosa*, an endemic pioneer herbaceous species growing on New Caledonian ultramafic soils. All experiments were conducted in comparison with *Paraburkholderia caribensis* MWAP64<sup>T</sup> isolated from a non-ultramafic habitat. The two ultramafic bacterial species showed a significant higher tolerance to metals compared to *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup> with a Ni-IC<sub>50</sub> particularly high for *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> (31 mM). Investigation of the mechanisms involved in Ni tolerance showed that the main mechanisms were the formation of biofilm and the production of an acidic exopolysaccharide recognized as metal chelator respectively for *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> and *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup>. Both species alleviated metal concentrations in *T. comosa* on ultramafic soils to a various extent. Finally, considering (i) their metal tolerance profile, (ii) their effect on *T. comosa* and (iii) their phylogenetic traits based on a multi locus sequence analysis and DNA G+C contents, we propose to transfer *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> and *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> to the genus *Caballeronia* and *Paraburkholderia* respectively.

**Key words:** *Caballeronia*; *Paraburkholderia*; Biofilm; Exopolysaccharides; Nickel; Plant metal alleviation

## 2.1. Introduction

Ultramafic soils (also known as serpentinitic soils) are resulting from weathering and pedogenesis of ultramafic bedrocks (Brooks, 1987). These soils are characterized by (i) the dominance of iron oxides with high levels of potentially toxic metals including Ni, Co, Cr and Mn, (ii) low levels of major plant nutrients such as N, P, and K, and (iii) a strong unbalanced Ca/Mg ratio ( $<1$ ) (Brooks, 1987). This *a priori* disadvantageous substrate constitutes a specific habitat which frequently hosts unique plant communities and “clusters” of biodiversity consisting of restricted and endemic taxa (Chiarucci and Baker, 2007; Kazakou *et al.*, 2008).

In these extreme edaphic conditions, plants have developed several adaptive mechanisms such as (i) slower growth (ii) ability to limit Mg absorption, and (iii) strategies to tolerate high metal concentrations (Kazakou *et al.*, 2008). Among these strategies, the association with specific bacteria has been described to play a key role in plant adaptation to harsh edaphic conditions (Rajkumar *et al.*, 2009). Recently, metal tolerant bacteria have been shown to reduce the bioavailability of metals and thus to alleviate their toxicity to plants exposed to metal stress (Etesami, 2018).

The study of microbial communities from ultramafic soils led to the identification of new metal tolerance strains and species (Guentas *et al.*, 2016; Mengoni *et al.*, 2001; Pal *et al.*, 2007; Stoppel and Schlegel, 1995). Mengoni *et al.* (2010) suggested that ultramafic soil provide a niche to well adapted metal-tolerant bacteria. Metal tolerant-bacteria show a wide panel of responses towards metals such as biosorption, bioaccumulation, precipitations, chelation, biofilm production, exopolysaccharides (EPS) production or metal transformation; thereby reducing metal toxicity towards themselves (Bruins *et al.*, 2000; Etesami, 2018; Gupta and Diwan, 2017).

## CHAPITRE 2

In New Caledonia, a tropical archipelago in the South Pacific Ocean, one third of the main island is covered by ultramafic soils. As a result, about 89% of the vascular flora growing on these soils are endemic (Morat *et al.*, 2012). However, ultramafic settings are exploited for economically valuable ores like Ni, Co and Cr (Pascal *et al.*, 2008) classifying New Caledonia among the biodiversity hotspots (Myers, 2003; Myers *et al.*, 2000). Although the interest of bacteria of New Caledonian ultramafic soils is recent (Amir and Ducouso, 2010), high richness and phylogenetic diversity are found on New Caledonian ultramafic soils (Chaintreuil *et al.*, 2007; Gonin *et al.*, 2013; Herrera *et al.*, 2007; Klonowska *et al.*, 2012).

Recently, two new *Burkholderia* species (*Burkholderia novacaledonica* and *B. ultramafica*) isolated from roots of three tropical endemic herbaceous pioneer plants, *Tetraria arundinacea* (ex *Costularia arundinacea*), *T. pubsecens* (ex *Costularia pubescens*; Larridon *et al.*, 2018a) and *Chamaedendron nervosa* (ex *Costularia nervosa*; Larridon *et al.*, 2018b), growing on ultramafic soils in New Caledonia have been characterized (Guentas *et al.*, 2016). These two species showed tolerance to high levels of the metals found in New Caledonian ultramafic soils (Gonin *et al.*, 2013). However differences according to species can be underlined, suggesting the existence of different mechanisms involved in bacterial adaptation to the ultramafic constraint.

Considering the potential role of these metal tolerant bacteria in plant adaptation to ultramafic conditions, we investigated the mechanisms involved in metal tolerance of *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> and *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> in comparison with *Paraburkholderia caribensis* MWAP64<sup>T</sup> (Basonym *Burkholderia caribensis*) isolated from a non-ultramafic habitat (Achouak *et al.*, 1999). The greenhouse experiment was undertaken on *Tetraria comosa* (Cyperaceae) a pioneer species used in restoration programs (Wulff *et al.*, 2010).

Moreover, considering the taxonomic revision carried out in *Burkholderia* clade which has led to split *Burkholderia* (*sensu lato*; s.l) genus in six genera corresponding to *Burkholderia* (*sensu stricto*; s.s) and the newly genera *Paraburkholderia*, *Caballeronia*, *Mycetohabitans*, *Trinickia* and *Robbsia* (Beukes *et al.*, 2017; Dobritsa and Samadpour, 2016; Estrada-de los Santos *et al.*, 2018; Gyaneshwar *et al.*, 2011; Lopes-Santos *et al.*, 2017; Sawana *et al.*, 2014), a phylogenetic analysis was carried out in order to reconsider the *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> and *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> taxonomic positions.

## 2.2. Materials and Methods

### 2.2.1. Bacterial species and phylogenetic analysis

Description of plant sampling and bacterial strains isolation were performed by Gonin *et al.* (2013). Full description of *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> and *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> including morphological, biochemical and molecular characterization was carried out by Guentas *et al.* (2016) and are reported in Table S2.1 According to Gonin *et al.* (2013), the two species isolated from ultramafic soils, tolerate edaphic constraints such as low pH, unbalanced Ca/Mg ratio and high metals concentrations (Table S2.2).

The multilocus sequences analysis (MLSA) based on 16S rRNA, *gyrB* and *recA* gene sequences was done using the nucleotide sequences of the two species published by Guentas *et al.* (2016). Phylogenetic analyses were carried out as previously reported by Bomtemps *et al.* (2016) and Klonowska *et al.* (2012). A set of sequences belonging to a same molecular marker (16S rRNA, *gyrB* or *recA*, see Table S2.3 for accession numbers) was aligned using Multalin INRA (Corpet, 1988). Every phylogenetic analysis included a set of reference DNA sequences belonging to the same bacterial genus. Phylogenies were inferred by the maximum likelihood (ML) method using PhyML (Guindon *et al.*, 2010). Bootstraps analyses were performed using 1,000 replicates for ML

using the phylogeny.fr software package (Dereeper *et al.*, 2010, 2008). Concatenated phylogenetic trees were inferred from concatenated sequences obtained with Sea View software (Galtier *et al.*, 1996). Concatemers were obtained by juxtaposing the DNA sequences of the 16S rRNA, *gyrB* and *recA* genes. Individual phylogenetic trees for each gene were also generated (FigS2.1, S2.2, and S2.3).

### **2.2.2. Test for tolerance to metal (Inhibition Concentration 50; IC50)**

Determination of the metal tolerance (IC<sub>50</sub>) was performed in aerobic conditions onto microplates (sterile transparent 96 wells PS flat bottom, Greiner) in Lysogenic Broth Lennox medium (LB, tryptone: 10 g L<sup>-1</sup>, yeast extract: 5 g L<sup>-1</sup>, NaCl: 5g L<sup>-1</sup>; CONDA, Spain) supplemented with different metals concentrations (three replicates by plate) as suggested by Chien *et al.* (2013). For these experiments, 1 M metal stock solutions were prepared from solid salts (NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O for nickel, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O for cobalt, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> for chromium and MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O for manganese). To avoid metal precipitation in the assays (Hartley *et al.*, 1997), these stock solutions were sterilized separately. Each well was filled with 20 µL of an overnight bacterial culture adjusted to optical density at 600 nm equal to one (OD<sub>600</sub>: 1, that is approximately equal to 10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup>) and 180 µL of broth tested. The plate was incubated at 28°C under 125 rpm orbital shaking in microplate incubator reader (EPOCH 2 microplate reader; BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA). Cell growth was monitored by measuring the OD<sub>600</sub> every hour during 48h. The experimentations were done at least twice independently. According to the metal available concentration found in New Caledonian ultramafic soils (Pasquet *et al.*, 2018), metals concentration tested ranged from 0.5 to 100 mM for Ni and Mn and from 0.01 to 50 mM for Co and Cr. The strain growth rates (µ) were determined for each concentration. A sigmoid dose–response curve was obtained by plotting

growth rate against metal concentrations and IC<sub>50</sub> values were determined using GraphPad Prism software (version 6, GraphPad Software, La Jolla California USA).

### **2.2.3. Ni biosorption and bioaccumulation**

The metal adsorbed on the surface of the bacterial cell and the metal accumulated inside the cell were performed according to Giovanella *et al.* (2017) with modifications as follow. A primary culture was done by inoculating 10 mL of LB Lennox medium by one colony of the chosen bacteria and incubated for 24h at 28°C at 125 rpm. A culture (25 mL) inoculated at OD<sub>600</sub>: 0.1 by a primary culture was incubated at 28°C, 125 rpm for 24h then the culture was artificially contaminated by adding aseptically Ni such that Ni reach a final concentration of 1 mM, 5 mM and 50 mM. After 24h, 1 mL sample were removed from the culture and centrifuged at 13,000 rpm during 10 min (Sigma, 2-16K). The pellet was washed thrice in sterile deionized water to remove free metal ions, and finally suspended in 1 mL sterile deionized water. The OD<sub>600</sub> was read and the CFU mL<sup>-1</sup> of the inoculum was carried out. To determine Ni accumulation in the cell walls and intracellular spaces of these bacteria, another aliquot (1 mL) was centrifuged at 13,000 rpm during 10 min, the pellet was washed with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 10 mM, pH: 6.5) for the desorption of Ni from cells surface, centrifuged and re-suspended in 1 mL sterile deionized water. Finally, the total amount of Ni accumulated intracellularly (bioaccumulation) and sorbed on the cells (biosorption) was determined by digesting the 1 mL aliquots in a nitric acid (69%, 1 mL) and hydrogen peroxide (30%, 0.5 mL) solution during one night at room temperature. The digested samples were then adjusted to 10 mL with deionized water and the Ni content in the final solution was quantified by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP OES, Varian, Varian 730-ES, Palo Alto, USA) at Laboratoire des Moyens Analytiques (LAMA-US IMAGO-IRD, New Caledonia). The amount of Ni accumulated intracellularly (bioaccumulation) was

determined by subtracting the Ni content adsorbed on the cell walls (biosorption) from the total Ni amount.

#### **2.2.4. Biofilm formation assay**

Biofilm formation assay was performed on microtiter plate (O'Toole, 2011). Aliquots of 90  $\mu\text{L}$  of LB culture medium supplemented with different Ni concentrations were loaded into 96-well microtiter plates (sterile transparent 96 wells PS flat bottom, Greiner). Well were inoculated with 10  $\mu\text{L}$  of a 48h primary culture adjusted at an  $\text{OD}_{600}$ : 1. For these experiments, a non-inoculated LB medium was used as the negative control, whereas an inoculated LB culture medium without Ni was used as the positive control. After, 24h, 48h, and 72h of incubation at  $28^{\circ}\text{C}$  without agitation, the medium and the non-adhering bacteria biofilm were eliminated by simple inversion and each well was washed three times with 100  $\mu\text{L}$  of sterile deionized water. The microplates were then dried at  $50^{\circ}\text{C}$  for 30 min. The cells from the adhering biofilm were dyed with 100  $\mu\text{L}$  of 0.02% crystal violet (CV) solution (30 min at room temperature). The excess of dye was removed by simple inversion and the biofilm was washed three times with 100  $\mu\text{L}$  of sterile deionized water at each wash. The microplates were dried at room temperature during 10 min before resuspending CV by adding 200  $\mu\text{L}$  of 95% ethanol solution. After 10 min orbital shaking at 125 rpm, the content of each well was transferred into a new microplate and the  $\text{OD}_{590}$  was read with a microplate reader (EPOCH 2 microplate reader; BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA). The results obtained were then transformed into a quantification of biofilm formation by calculating the average absorbance of six replicates for each species and for each concentration and dividing by the average absorbance of the blank (without bacteria). The results expressed as this ratio can be considered as non-dependent from the non-specific coloring of the surface of the wells of the



microplates by the CV. Following this procedure, biofilm formation was considered to have occurred when the ratio is greater than two (Brian-Jaisson, 2014).

### **2.2.5. Quantification of biofilm production**

Since the concentration of bioavailable Ni frequently reaches 1 mM in ultramafic soils, especially in the rhizosphere, from New Caledonia (Amir and Pineau, 2003) quantification of biofilm production was carried without Ni and at 1 mM of Ni. The biofilm was visualized by confocal laser scanning microscopy (CLSM) after biofilm formation in 24 wells glass bottom opaque black screening plate (SensyPlate, Greiner Bio-One). For these experiments, a 24h primary culture was first adjusted at a 0.1 OD<sub>600</sub> in LB medium and used to inoculate a 24-wells microtiter dish (1 mL per well). The microtiter dish was then incubated for 24h and the biofilms were stained for 10 min with 1% of Syto 61 red fluorescent nucleic acid stain (5 mM, Molecular Probes, USA). CLSM observations were performed with a TCS-SP2 microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany), using a 63x immersion objective. The excitation and Emission wavelengths for Syto 61 Red were set at 633 nm and 645 nm, respectively. The images collected by confocal stacks were processed using Leica Confocal Software and the biovolume, thickness and substratum coverage of biofilms were quantified with COMSTAT (Heydorn *et al.*, 2000).

### **2.2.6. EPS production and its gross chemical composition**

Regarding its ability to produce an EPS (Achouak *et al.*, 1999), *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup> was used as a positive control in order to approve the experimental design. EPS production was quantified after 96h of culture at 28°C under 125 rpm orbital shaking in minimum broth medium (MB; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O, 0.66 g L<sup>-1</sup>; NaCl, 50 mg L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 10 mg L<sup>-1</sup>; FeCl<sub>3</sub>, 4 mg L<sup>-1</sup>; CaCl<sub>2</sub>, 40 mg L<sup>-1</sup>) supplemented with glucose (30g L<sup>-1</sup>). In order to produce biomass, eight liters of LB were inoculated using a 48h grown culture (800 mL; 28°C, 125 rpm orbital shaking). After 72h

## CHAPITRE 2

of incubation (28°C, 125 rpm orbital shaking), the biomass was recovered by centrifugation at 9,000 rpm during 25 min (Sorvall RC5C Centrifuge, DuPont) and washed once with sterile deionized water. Cells were transferred at 28°C in 10 L reactors containing 8 liters of MB medium supplemented with glucose (3% w:v). The bacteria were removed from the medium by centrifugation at 9,000 rpm during 25 min. The supernatants were collected and the EPS were purified by ultrafiltration on a 100,000 cut-off Sartorius NMWCO membrane and immediately freeze-dried.

The biochemical composition of the EPS was determined by the following colorimetric methods: (i) for protein content, bovine serum albumin was employed as a standard using the Lowry method (Lowry *et al.*, 1951), modified by Smith *et al.* (1985) and Brown *et al.* (1989); (ii) for sugar content, glucose was employed as a standard using the method described by DuBois *et al.* (1956) and completed by Chaplin (1986), and (iii) for uronic acids content, glucuronic acid was the standard using the Blumenkrantz and Asboe-Hansen method (Blumenkrantz and Asboe-Hansen, 1973), modified by Filisetti-Cozzi and Carpita (1991).

In addition to the above-mentioned colorimetric methods, infrared spectroscopy was used to complete the biochemical characterization of EPS. The infrared spectrum of the freeze-dried EPS was recorded using a Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectrometer Frontier TM (Perkin Elmer) at the spectroscopy lab of the IRD center in Noumea (New Caledonia). This spectrum corresponds to an average of four successive spectra that were collected in Attenuated Total Reflectance (ATR) mode (diamond crystal) over the 500  $\text{cm}^{-1}$  - 3500  $\text{cm}^{-1}$  range with a 4  $\text{cm}^{-1}$  resolution.

### 2.2.7. Effect of microbial inoculation in plants under ultramafic conditions

Seeds from *Tetraria comosa* were provided by SIRAS Pacifique (Noumea, New Caledonia). Germination occurred on a compost amended ultramafic soil composed with (i) 2mm sieved colluvial lateritic soil (ferralsol) sampled in Plum area in New Caledonia (22°16'59''S, 166°39'12''E) and (ii) commercial compost (4:1 v/v). Characteristics of the ferralsol are: coarse sand, 39.4%; fine sand, 22.1%; silt-clay, 37.2%; pH H<sub>2</sub>O, 5.9; pH KCl, 5.6; total C, 42.1 g kg<sup>-1</sup>; total N, 2.2 g kg<sup>-1</sup>; total P, 147 mg kg<sup>-1</sup>; available P (Mehlich), 3 mg kg<sup>-1</sup>; total Ca, 1.06 g kg<sup>-1</sup>; total Mg, 5.08 g kg<sup>-1</sup>; Ca/Mg, 0.207. Metals concentrations of the ferralsol are as follows: Co, 0.87 g kg<sup>-1</sup>; Cr, 22 g kg<sup>-1</sup>; Fe, 348 g kg<sup>-1</sup>; Mn, 10 g kg<sup>-1</sup>; Ni, 5.6 g kg<sup>-1</sup> and available metal extracted by dimethylene triaminopentaacetic acid (DTPA) are as follows: Co<sub>DTPA</sub>, 68 mg kg<sup>-1</sup>; Cr<sub>DTPA</sub>, 0.17 mg kg<sup>-1</sup>; Fe<sub>DTPA</sub>, 71 mg kg<sup>-1</sup>; Mn<sub>DTPA</sub>, 1.1 g kg<sup>-1</sup>; Ni<sub>DTPA</sub>, 130 mg kg<sup>-1</sup>. The composition of commercial compost is as follows: N, 1.7 mg g<sup>-1</sup>; P<sub>total</sub>, 150 mg kg<sup>-1</sup>; P<sub>Olsen</sub>, 7 mg kg<sup>-1</sup>; K, 139 mg kg<sup>-1</sup> (Terreau universel, Agrofino, France). The compost amended ultramafic soil was autoclaved three times at 120°C for 1 h, with an interval of 24 h before being used in the greenhouse experiment. Although, *T. comosa* was able to develop on ultramafic soil in natural condition, the addition of this commercial compost to the ultramafic soil was necessary because the growth of the plantlets of *T. comosa* could be inhibited under greenhouse condition in a pure sterile lateritic topsoil (Lagrange *et al.*, 2011).

The inocula for pot trial were prepared as follows: A pre-inoculum was performed as described previously (§ 2.3). After 2 days, the aerobic cultures were used to inoculate 100 mL of LB media at an OD<sub>600 nm</sub> of 0.1. After three days at 28°C under orbital agitation (125 rpm), the cells were pelleted by centrifugation (SIGMA®, 2K15, 5,000 g, 20 min), washed twice with sterile deionized water and then re-suspended in sterile deionized water at a bacterial concentration

between  $10^7$  and  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> (corresponding to a 0.5 OD<sub>600</sub>), as suggested by Larcher *et al.* (2003). The purity and the concentration of the inoculum were carried out a bacterial count on LB agar plate.

After two months, seedlings were washed with sterile water to remove any contaminants and were transplanted into one liter's plastic containers filled with the compost amended ultramafic soil described above. A 5 mL bacterial inoculum was applied on roots of each plantlet during transplantation in one liter's pots. The same volume of sterilized water was applied to a control set of plants. A set of 15 plants were inoculated per treatment. Plants were grown under greenhouse conditions as reported in (Lagrange *et al.*, 2011). After the 15 months of growth, the plants were harvested. Shoot and root biomasses were determined by measuring the dry mass tissue (3 days at 60°C). The 15 samples of plant tissues were pooled by five and ground to powder. The tissue content of P, K, Ca, Mg, Co, Cr, Mn, and Ni were quantified by ICP OES using Varian 730-ES spectrometer at the Laboratoire des Moyens Analytiques (LAMA-US IMAGO-IRD, New Caledonia). Metals concentrations in the plant tissues were used to estimate the percentage of gain or loss in response to bacterial inoculation. The gain or loss of a metal was calculated as  $[(\text{Concentration in the tissue of inoculated plant} - \text{Concentration in the tissue of control plant}) * 100] / \text{Concentration in the tissue of control plant}$  (Gonin *et al.*, 2013).

### **2.2.8. Statistical analysis**

All statistical analysis were performed with the R software version 3.3.1 (R Core Team, 2018). All data were analyzed with parametric tests way ANOVA, followed by the Tukey's HSD; Honestly Significant Difference test;  $P < 0.05$ ) or with non-parametric tests (Kruskal-Wallis test; followed by the Fisher's LSD, Least Significant Difference test;  $P < 0.05$ ) when data did not follow the assumptions of a parametric test.

## 2.3. Results

### 2.3.1. Test for tolerance to metal

The metals IC<sub>50</sub> determined for the three species are reported in Table 2.1. *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> and *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> showed a significant higher tolerance to Co, Mn and Ni compared to *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup>. For instance, *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> Ni-IC<sub>50</sub> value (30.7 ± 2.8 mM) was 16 times significantly higher and *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> Ni-IC<sub>50</sub> value (4.8 ± 0.5 mM) was 2.5 times significantly higher than Ni-IC<sub>50</sub> value of *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup>. Regarding the two ultramafic species, *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> and *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> showed significantly different metal tolerance profiles for Cr and Ni. Indeed, the Ni IC<sub>50</sub> of *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> was 6.4 times compared to Ni-IC<sub>50</sub> value of *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup>. Conversely, the Cr IC<sub>50</sub> of *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> was significantly lower than Ni-IC<sub>50</sub> value of *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup>. No significant differences between the two ultramafic *Burkholderia* species were observed for the tolerance to Co and Mn.

**Table 2.1** Metals IC<sub>50</sub> (mM) for *Burkholderia ultramafica* STM10279<sup>T</sup>, *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> and *Paraburkholderia caribensis* MWAP64<sup>T</sup> (Mean ± Standard Error, n=6).

Species	IC <sub>50</sub> (mM)			
	Ni	Co	Cr	Mn
<i>P. caribensis</i> MWAP64 <sup>T</sup>	1.9 ± 0.9c <sup>†</sup>	1.1 ± 0.1b	0.2 ± 0.1b	11.1 ± 0.9b
<i>B. ultramafica</i> STM10279 <sup>T</sup>	30.7 ± 2.8a	3.9 ± 0.9a	0.5 ± 0.1b	32.4 ± 1.6a
<i>B. novacaledonica</i> STM10272 <sup>T</sup>	4.8 ± 0.5b	5.8 ± 0.9a	1.5 ± 0.3a	29.1 ± 5.7a

<sup>†</sup>Value with the same lower case letters in each column are not significantly different at P < 0.05 using Fisher's (LSD) test.

### 2.3.2. Ni biosorption and bioaccumulation

The results on intracellular incorporation and biosorption of Ni on the cell surface for *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup>, *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> and *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup> are presented in Table 2.2. For the three species, the fraction of Ni sorbed at the cell surface was significantly higher than that incorporated in the cells, except at 5 mM for *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> and *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup> (no significant differences). For *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup>, the amounts of intracellular Ni were on average equal to 0.15% of initial Ni at 1 mM, 0.07% at 5 mM and 0.02% at 50 mM, whereas Ni sorbed on the cell surface were on average equal to 1.55% of initial Ni at 1 mM, 0.33% at 5 mM and 0.10% at 50 mM. For *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup>, the amounts of intracellular Ni were on average equal to 0.92% of initial Ni at 1 mM, 0.57% at 5 mM and 0.02% at 50 mM, whereas Ni sorbed on the cells surface were on average equal to 1.39% of initial Ni at 1 mM, 0.51% at 5 mM and 0.21% at 50 mM. For *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup>, the amounts of intracellular Ni were on average equal to 1.00% of initial Ni at 1 mM, 0.64% at 5 mM and 0.04% at 50 mM, whereas Ni sorbed on the cells surface were on average equal to 1.91% of initial Ni at 1 mM, 0.59% at 5 mM and 0.14% at 50 mM.

CHAPITRE 2

**Table 2.2** Intracellular Ni and wall surface Ni ( $\mu\text{M}$ ) for *Burkholderia ultramafica* STM10279<sup>T</sup> and *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> and *Paraburkholderia caribensis* MWAP64<sup>T</sup> (mean  $\pm$  SE n = 3).

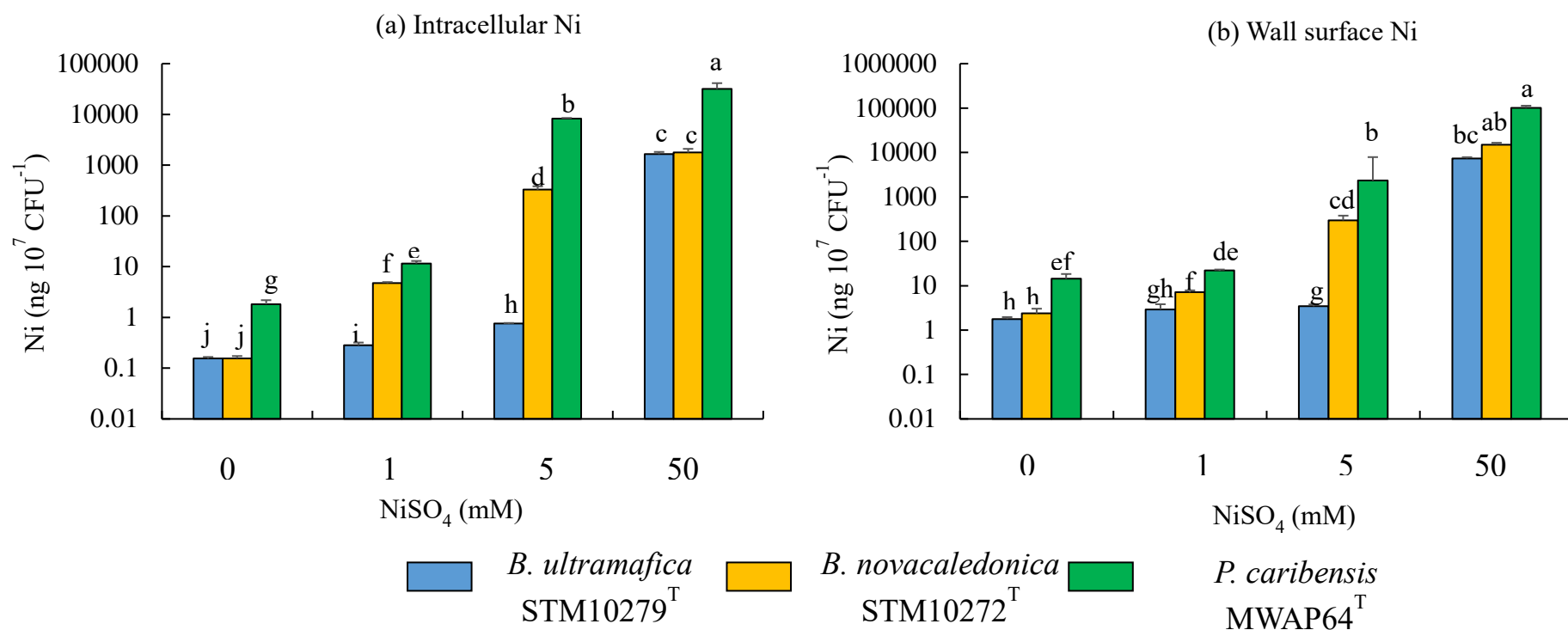
Ni (mM)		<i>B. ultramafica</i> STM10279 <sup>T</sup>		<i>B. novacaledonica</i> STM10272 <sup>T</sup>		<i>P. caribensis</i> MWAP64 <sup>T</sup>	
		Ni content ( $\mu\text{M}$ )	% <sup>‡</sup>	Ni content ( $\mu\text{M}$ )	%	Ni content ( $\mu\text{M}$ )	%
0	Intracellular	0.56 $\pm$ 0.04e <sup>†</sup>	-	0.59 $\pm$ 0.07e	-	0.69 $\pm$ 0.14e	-
	Wall surface	6.49 $\pm$ 0.68c	-	8.95 $\pm$ 2.50d	-	5.46 $\pm$ 1.52d	-
1	Intracellular	1.50 $\pm$ 0.19de	0.15	9.21 $\pm$ 0.45d	0.92	9.98 $\pm$ 1.20d	1.00
	Wall surface	15.5 $\pm$ 4.7b	1.55	13.9 $\pm$ 1.40c	1.39	19.1 $\pm$ 0.9c	1.91
5	Intracellular	3.64 $\pm$ 0.09cd	0.07	28.4 $\pm$ 4.8ab	0.57	32.1 $\pm$ 0.9ab	0.64
	Wall surface	16.6 $\pm$ 1.7b	0.33	25.6 $\pm$ 7.0b	0.51	29.5 $\pm$ 3.8b	0.59
50	Intracellular	11.4 $\pm$ 1.2b	0.02	12.3 $\pm$ 2.2cd	0.02	21.7 $\pm$ 6.5cd	0.04
	Wall surface	51.0 $\pm$ 3.2a	0.10	104 $\pm$ 10a	0.21	69.0 $\pm$ 8.0a	0.14

<sup>†</sup>Value with the same lower case letters in each column are not significantly different at  $P < 0.05$  using Fisher's (LSD) test. <sup>‡</sup>values correspond to the percentage of nickel found in relation to the quantity introduced

## CHAPITRE 2

In order to compare the three species, biosorption of Ni on the cell surface and intracellular compartment were expressed in  $\mu\text{M} (10^7\text{CFU})^{-1}$ . Results are shown in Fig 2.1 and the data used are reported in Table S2.4. The fraction of Ni inside the cells and on cell wall surface were significantly lower for *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> and *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> than for *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup>. Moreover, significant differences are observed between *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> and *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup>. Major differences appeared at 5 mM initial Ni concentration of Ni. The mean intracellular Ni content in *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> ( $0.76 \pm 0.02 \mu\text{g} (10^7\text{CFU})^{-1}$ ) was significantly 430 times lower than the value of *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> and was significantly 11 000 times lower compared to the value of *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup>. The mean content on the cells surface in *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> ( $3.45 \pm 0.34 \mu\text{g} (10^7\text{CFU})^{-1}$ ) was significantly 86 times lower than the value of *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> and was significantly 675 times lower compared to the value of *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup>.

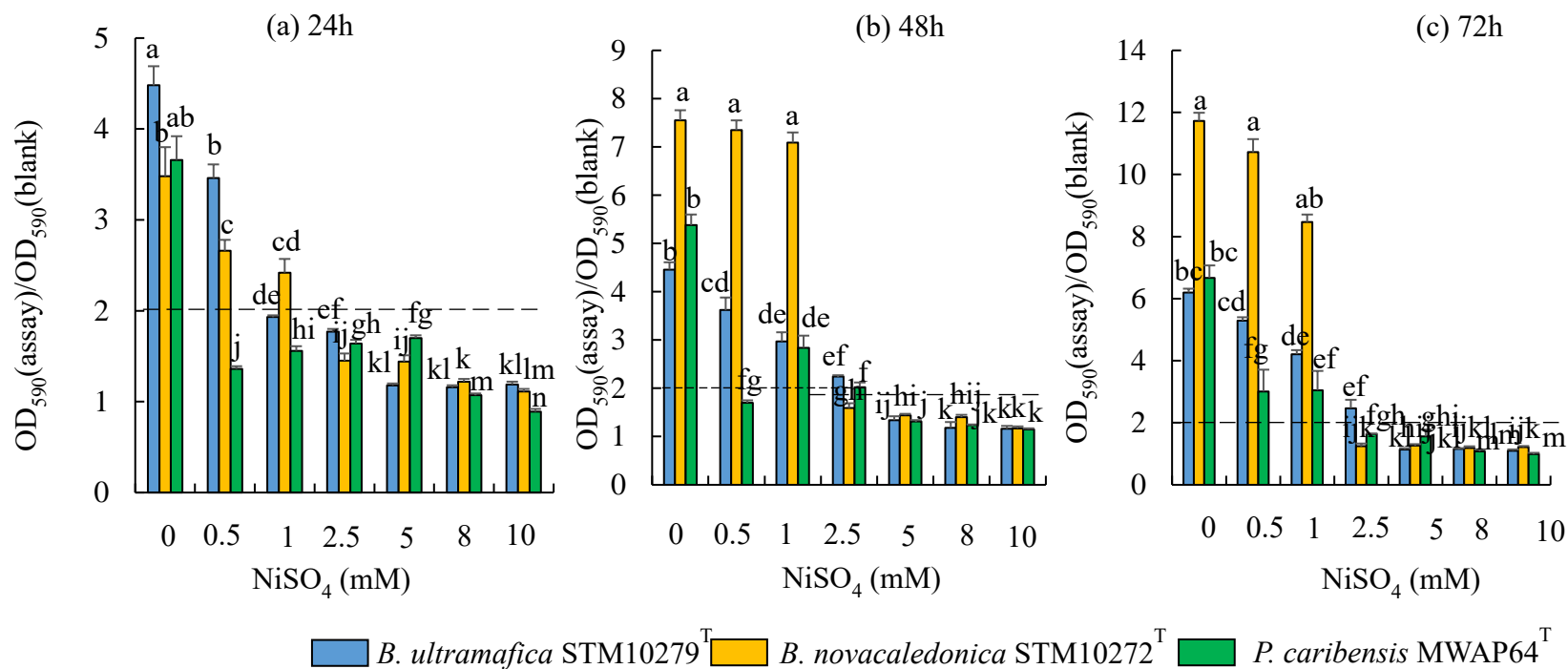




**Fig 2.1** Intracellular Ni (a) and wall surface Ni (b) of the three bacterial species. Bars represent means, and error bars represent standard errors (three replicates). Value with the same lower case letters are not significantly different at  $P < 0.05$  using Fisher's (LSD) test.

### 2.3.3. Biofilm formation assay

Biofilm formation by the three species studied in the presence of different Ni concentrations (0 to 10 mM) and their variation with time are presented on Fig 2.2 and the data used are reported in Table S2.5. The biofilm production increased with time and this increase was particularly significant for *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup>. The higher values of biofilm were observed at 72h for the three species. Biofilm formation occurred until 2.5 mM of Ni initial concentration for *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> and until 1 mM of Ni initial concentration for *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> and *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup>. Comparison between the three species indicated that the amount of biofilm formed by *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> was significantly higher compared to the values observed for *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> and *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup>. The differences found ranged from 1.8 times, 2.6 times and 3 times higher at respectively 0, 0.5 and 1 mM initial Ni concentration. At 48h and 72h, initial Ni addition showed no significant effect, compared to the control, on biofilm formation by *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> until 2.5 mM. At the opposite biofilm formation by *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> and *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup> decreased with the increase of Ni concentration until 2.5 mM and 1 mM of Ni for *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> and *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup> respectively.



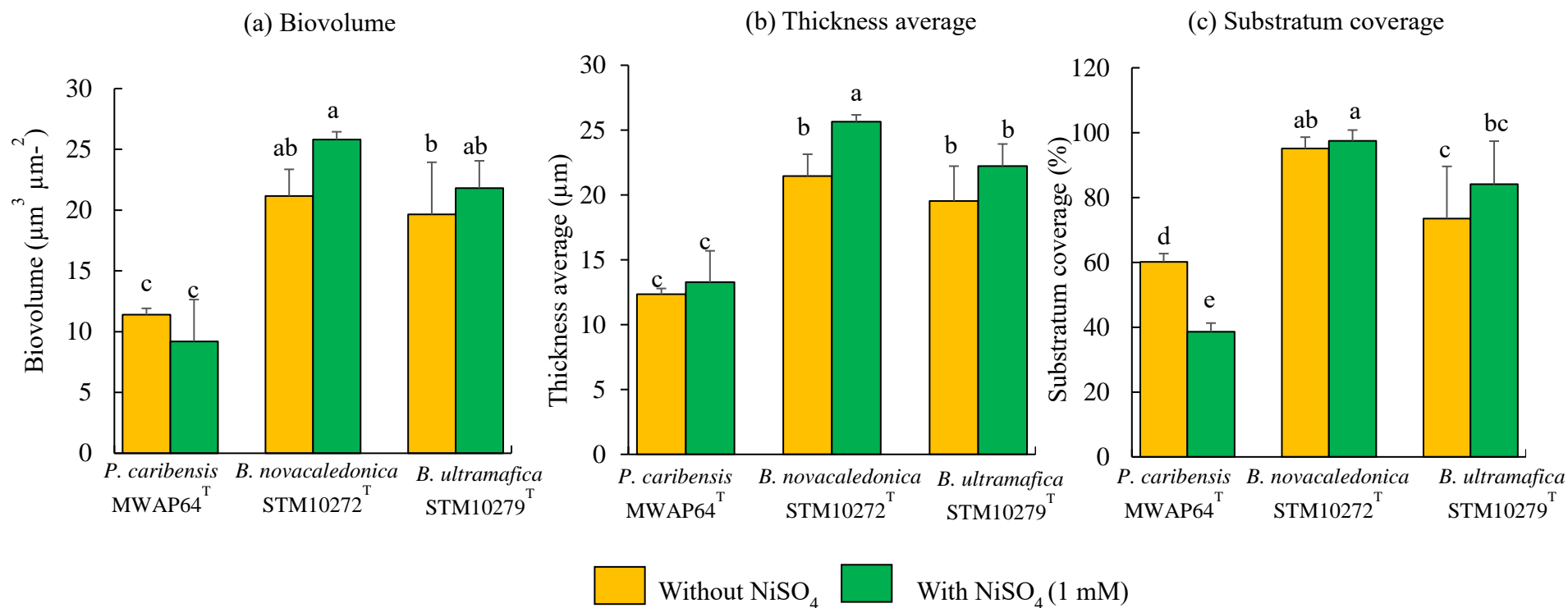
**Fig 2.2** Formation of biofilm as a function of the exposure time. 24h (a), 48h (b) and 72h (c). Bars represent means, and error bars represent standard errors (six replicates). Biofilm production occurs when the ratio is greater than two (dotted line on the graphic). Value with the same lower case letters are not significantly different at P < 0.05 using Fisher's (LSD) test.

### 2.3.4. Quantification of biofilm production

The biovolume, thickness and substratum coverage of the biofilms produced by the three species studied are presented on Fig 2.3 and the data used are reported in Table S2.6. Comparisons of these data indicated that the biovolume, the thickness average and the substratum coverage of the biofilm produced by *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> and *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> were significantly higher compared to the biofilm of *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup>. Moreover, the addition of 1 mM of Ni to the medium has significantly reduced the substratum coverage of *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup> biofilm from 60% to 39%. For *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup>, the addition of Ni has significantly enhanced the thickness average of the biofilm from 21  $\mu\text{m}$  to 26  $\mu\text{m}$ .

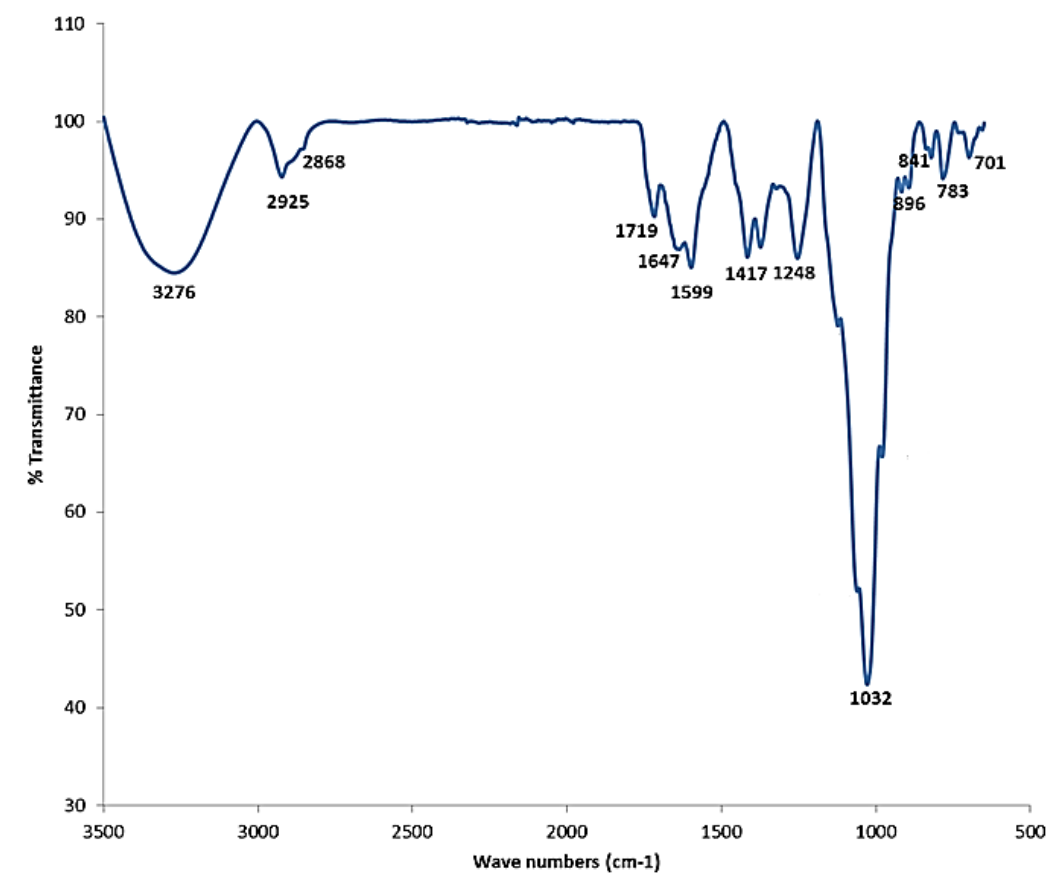
#### 2.3.1. EPS production and its gross chemical composition

Under the experimental conditions used in this study, *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup> was able to produce EPS at a production yield around 1.2 g L<sup>-1</sup>. Regarding ultramafic *Burkholderia* species, only *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> was able to produce EPS at a production yield around 140 mg L<sup>-1</sup>. FT-IR spectroscopy was employed to detect the main functional groups in the EPS produced by *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup>. The FT-IR spectrum obtained (Fig 2.4) showed a broad and large absorbance band centered at 3276 cm<sup>-1</sup> that was assigned to hydroxyl groups or hydrogen bonds. It also showed two peaks at 2925 and 2868 cm<sup>-1</sup> that were respectively assigned to CH-stretching of methylene (-CH<sub>2</sub>) and methyl (-CH<sub>3</sub>) groups. Several absorbance peaks between 1500 cm<sup>-1</sup> and 1760 cm<sup>-1</sup> that were assigned to the stretching modes of C=O bonds were also visible. The peak at 1719 cm<sup>-1</sup> indicated the presence of carboxyl of uronic acid groups, the peak at 1248 cm<sup>-1</sup> is assigned to the deformation vibration of C=O bonds and the peak at 1032 cm<sup>-1</sup> is assigned to the stretching modes of C-O from intra-molecular C-O-C ring.



**Fig 2.3** Biovolume (a), Thickness average (b) and substratum coverage (c) of the three bacterial species. Bars represent means, and error bars represent standard errors (six replicates). Value with the same lower case letters are not significantly different at  $P < 0.05$  using Tukey's (HSD) test or Fisher's (LSD) test when data did not follow the assumptions of a parametric test.

This latter peak thus strongly suggested that the monosaccharides in the EPS have pyranose rings. In addition, the two weak peaks near  $841\text{cm}^{-1}$  and  $896\text{cm}^{-1}$  could be respectively assigned to the two  $\alpha$ - and  $\beta$ -ends of carbon-glucoside bonds. Finally, two additional peaks could be seen at  $783$  and  $701\text{cm}^{-1}$  but they could not be unambiguously assigned to specific molecular groups. The colorimetric test carried out (Table 2.3) have shown that the ratio of carbohydrates to proteins (C/P) was almost 15, with values of 61% carbohydrates to 4% of proteins residues and the presence of uronic acid (17%).



**Fig 2.4** Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectrum of the *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> EPS in the 500-3500  $\text{cm}^{-1}$  range.

**Table 2.3** Gross Characteristics of the crude EPS produced by *Burkholderia ultramafica* STM10279<sup>T</sup>.

Sample	Yield <sup>†</sup>	Total Carbohydrates <sup>‡</sup>	Protein <sup>§</sup>	C/P	Uronic acid <sup>#</sup>
<i>B. ultramafica</i> STM10279 <sup>T</sup> EPS	140	61%	4%	15	17%

<sup>†</sup> mg EPS L<sup>-1</sup>% (w/w) of total crude EPS determined by colorimetric assays: <sup>‡</sup> DuBois *et al.* (1956) completed by Chaplin, M.F. (1986); <sup>§</sup>: Lowry *et al.* (1951), modified by Smith *et al.* (1985) and Brown *et al.* (1989); <sup>#</sup> Blumenkrantz and Asboe-Hansen (Blumenkrantz and Asboe-Hansen (1973) modified by Filisetti- Cozzi and Carpita (1991).

### 2.3.2. Effect of microbial inoculation in plants under ultramafic conditions

Shoot and root biomasses are presented in Table 2.4. No significant differences were observed in biomass values after inoculation with *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> and *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup> compared to the control. However, the inoculation with *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> significantly decreased the shoot and root biomasses compared to the other treatments (50% lower in average). The values of nutrient contents in these organs were also not significantly different (Table S2.7). Most significant data variations were observed for the concentrations of metal contents in plant tissue (Fig 2.5; full data in Table S2.8). In shoot, no significant differences were measured between the inoculated plants and the control. Concerning the roots, no significant differences were observed between plant inoculated with *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> and *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup>, but the two strains decreased Ni (-46%), Co (-50%), Cr (-55%) and Mn (42%) contents compared to the control. The inoculation of *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> significantly reduced Ni (-30%) and Cr (-35%) compared to the control.

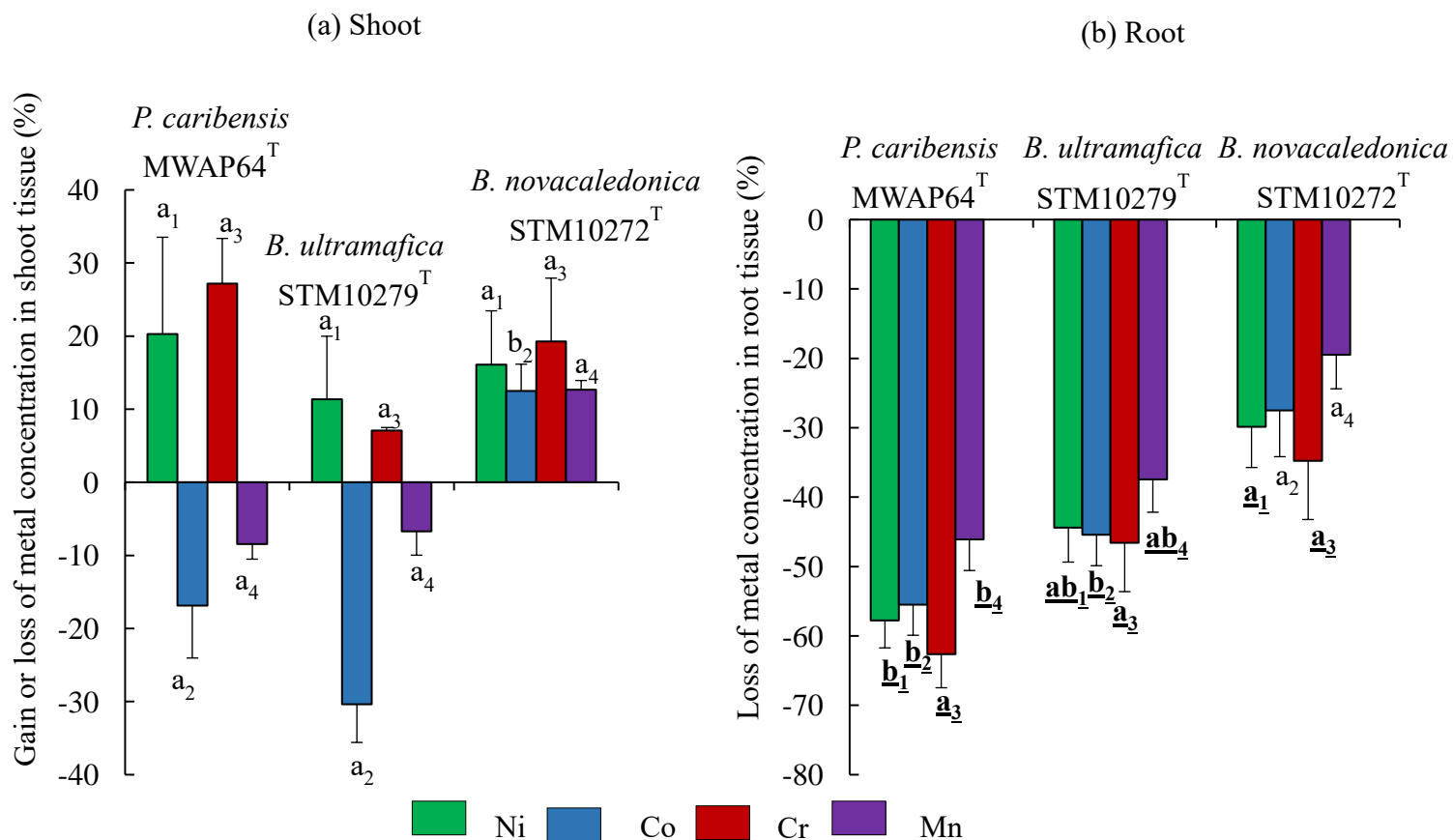
## CHAPITRE 2

**Table 2.4** Shoot and root biomass of *Tetraria comosa* as function of the different treatment (mean  $\pm$  SE n = 15).

Treatment	Shoot Biomass (mg)		Root Biomass (mg)	
Control	178	$\pm$ 24a <sup>†</sup>	285	$\pm$ 59a
<i>P. caribensis</i> MWAP64 <sup>T</sup>	183	$\pm$ 13a	245	$\pm$ 21a
<i>B. ultramafica</i> STM10279 <sup>T</sup>	173	$\pm$ 11a	205	$\pm$ 16a
<i>B. novacaledonica</i> STM10272 <sup>T</sup>	84	$\pm$ 7b	115	$\pm$ 11b

<sup>†</sup>Value with the same lower case letters in each column are not significantly different at  $P < 0.05$  using Fisher's (LSD) test.





**Fig 2.5** The relative variations of metals contents are expressed as % in dry mass of tissues of inoculated plants compared with controls. Bars represent means, and error bars represent standard errors (three replicates). Value with the same lower case letters are not significantly different at  $P < 0.05$ . Same coefficient to lower case letters refers to one metal analysis. Lower case letters and coefficients underlined and in bold indicate significant differences with controls at  $P < 0.05$  using Tukey's (HSD) test or Fisher's (LSD) test when data did not follow the assumptions of a parametric test.

## 2.4. Discussion

In our experiments, *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> and *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> showed a higher metal tolerance than *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup> a non-ultramafic species isolated from Vertisol in Martinique (Achouak *et al.*, 1999). These results are in agreement with previous studies which have shown that ultramafic soils are known to hold bacterial communities more adapted to metal stress (Abou-Shanab *et al.*, 2007; Mengoni *et al.*, 2010). For instance, a set of *Burkholderia* (s.l) strains isolated from the rhizosphere of *Alyssum murale* growing on Ni-rich ultramafic soil tolerated up to 15 mM Ni, 10 mM Co and 5 mM Cr (Abou-Shanab *et al.*, 2007). In New Caledonia, Schlegel *et al.* (1995) reported the occurrence of *Burkholderia* (s.l) strains that could tolerate up to 30 mM Ni in the rhizosphere of *Pycnanandra accumunita*, known as Ni hyperaccumulator. Although, the experiments were done *in vitro* using media with conditions very different from those found in natural environments, our comparison among the three species in the same experimental conditions clearly indicated that the two species grown on ultramafic soils might have evolved through specific mechanisms to protect themselves from high metal concentrations. Differences in profiles of metal tolerance were observed between the two species isolated from ultramafic soils and more particularly for Ni suggesting that different mechanisms are involved depending of the species.

Known mechanisms of metal tolerance in microorganisms can be divided into seven categories (i) exclusion, (ii) extracellular sequestration, (iii) intracellular sequestration, (iv) enzymatic detoxification, (v) active transport, (vi) passive tolerance and (vii) reduction in sensitivity. Bacteria exposed to metals can develop one or more of these tolerance mechanisms (Bruins *et al.*, 2000; Wheaton *et al.*, 2015; Etesami, 2018). Intracellular sequestration has already been reported as a mechanism of Ni tolerance for *Burkholderia* (s.l) species (Dourado *et al.*, 2015;

## CHAPITRE 2

Madhaiyan *et al.*, 2007). However, our data indicated a preferential biosorption of Ni on the cell surface of the three species studied. This result suggests that the tolerance mechanism used by these three species was to limit the movement of Ni across the cell envelope. *Burkholderia* (s.l) species are gram-negative bacteria that exhibit a complex cell-membrane structure composed of numerous phosphorylated biomolecules (i.e. phospholipids, lipoprotein, lipopolysaccharides...) located on the external membrane and involved in metal chelation. In fact, the various components (proteins, exopolysaccharides layers, extracellular capsules) of the surface of bacteria cells are known to provide non-specific sorption capacity toward metals (Sessitsch *et al.*, 2013). This non-specific binding capacity of the cell wall has been already demonstrated to prevent the entry of nickel into the bacteria cell and thus to hinder its interference with essential cellular components (Bruins *et al.*, 2000).

Biofilm formation is known to be involved in bacterial tolerance to Ni (Chien *et al.*, 2013; Koechler *et al.*, 2015; Perrin *et al.*, 2009). In our study, biofilm production occurred until 1 mM for *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> and *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup> and until 2 mM for *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup>. It is not surprising that biofilm production was reduced at concentrations below the IC<sub>50</sub>. Indeed, Vega *et al.* (2014) have shown that Ni inhibited the *Quorum Sensing* and biofilm formation without affecting viability in *Burkholderia multivorans*. Confocal analysis clearly demonstrated this negative effect of nickel on the formation of biofilm of *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup> suggesting that another mechanism must be involved in the metal tolerance. Until 1mM of Ni, biofilm formation appeared to be an important mechanism for *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> in view of the large quantities of biofilm found and the enhancement of thickness average with the addition of Ni. Since the concentration of bioavailable Ni frequently reaches 1 mM in ultramafic soils, especially in the rhizosphere, from New Caledonia (Amir and Pineau 2003), we can conclude

that Ni-concentration in these soils could induce biofilm formation. These results corroborate those obtained by Perrin *et al.* (2009) who showed biofilm stimulation by nickel for *Escherichia coli*.

In order to go further into the mechanisms developed by the three *Burkholderia* (s.l) species studied, we investigated their ability at excreting EPS. Indeed, the high molecular sugar-based polymers that constitute these bacterial extracellular substances have already been described to play a role in *Burkholderia* (s.l) adaptation to different stress conditions (Ferreira, 2011). Bacterial EPS are known to play a significant role in the complexation of metals and subsequent decrease in their mobility in soils (Etesami, 2018; Gupta and Diwan, 2017; Rajkumar *et al.*, 2012). Under our experimental conditions, *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> and *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup> were able to produce EPS. *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup> is a well-known EPS-producing bacterium (Achouak *et al.*, 1999). Structural analysis of the polysaccharide excreted by *P. caribensis* strain MWAP71, a strain belonging to the *P. caribensis* cluster (Achouak *et al.*, 1999) has shown the presence of 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo) (Vanhaverbeke *et al.*, 2001). Anionic groups such as carbonyl, carboxyl and hydroxyl groups have been reported to scavenge several metals and to be involved in metal biosorption (Gupta and Diwan, 2017; Joshi and Juwarkar, 2009; Pal and Paul, 2008). The FT-IR peaks found suggest that the EPS of *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> is a polysaccharide containing pyranose and uronic acid groups (Liu *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 1998). All the features on the FT-IR spectrum of the EPS of *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> indicated that (i) carbohydrates were the main component in the crude EPS produced by *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> and (ii) the EPS produced by *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> was a polymer of a repeating unit presenting uronic acid residues (17%). This FT-IR composition was in agreement with that derived from colorimetric assays showing that carbohydrates were the main component in the crude EPS produced by *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup>. The pyranose and uronic acid groups that are expected

## CHAPITRE 2

to constitute the polysaccharides are considered to be involved in the metal binding process. Such a behavior has already been reported for *Rhizbium etli* which was able to chelate Mn in these EPS (Pulsawat *et al.*, 2003). Others mechanisms may involve in metal tolerance of *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> and *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup>. Gonin *et al.* (2013) have shown that these bacteria possess genes *cnr* (Co–Ni resistance) and *nre* (Ni resistance) involved in metal exclusion and active removal. Such mechanisms may operate in *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> above 1 mM of Ni.

All these mechanisms put in place by bacteria can be also involved in variations of metals absorbed by inoculated plants (Etesami, 2018). Alleviation of metal concentrations in plants by metal tolerant *Burkholderia* (s.l) have been reported in the literature. Madhaiyan *et al.* (2007) showed a reduction of Ni uptake and translocation in tomato after inoculation with a *Burkholderia* (s.l) strain. These authors suggested that this reduction might be attributed to the biosorption of Ni by the bacterial cells, which would have prevented the metal from being transported into the plant. Kuffner *et al.* (2010) showed that a *Burkholderia* (s.l) strain had the capacity of reducing Zn and Cd accumulation in the roots of *Salix caprea* by favoring the immobilization of these metals in the soil. Our results on the effect of *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> and *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> are in agreement with these studies. However, in relation to the differences of metal profile tolerance, the alleviations of metal observed in *T. comosa* were more pronounced with *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> than *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup>.

Although it is important to outline that an increase of the plant biomass is not the unique aspect of plant health and adaptation (Smith and Smith 2012), the lack of positive effect of bacterial inoculation on the growth of the two ultramafic species suggests that metal alleviation had no effect on *T. comosa* growth. This result might be due to the fact that the *T. comosa* are adapted to

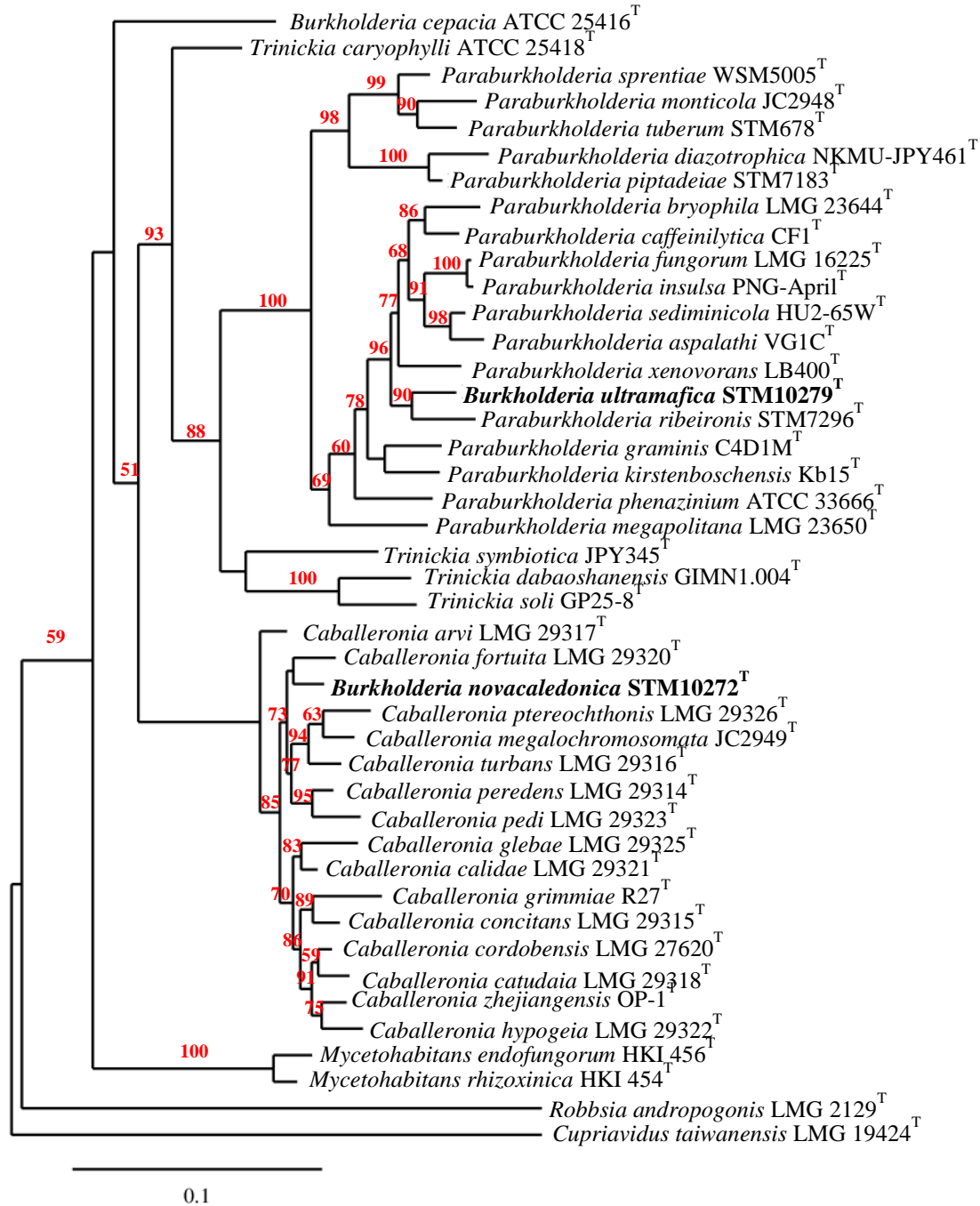
## CHAPITRE 2

ultramafic constraints (Gonin *et al.*, 2013). Indeed, it can be assumed that their inoculation on plant species that are not tolerant to the large amounts of metals found in ultramafic soils could favor plant growth, as already reported by Madhaiyan *et al.* (2007). Moreover, in our study, bacterial inoculation did not induce a positive effect on the mineral nutrition of the studied plants. This latter result suggests that the lack of effect of bacterial inoculation on plant growth could also be related to a lack of stimulation of mineral nutrition. It must be outlined that *Tetraria* (ex *Costularia*) species are considered as oligotrophic (with low nutrition requirements) and their low growth rate is an adaptive trait to ultramafic constraints (Jaffré and L'Huillier, 2010), which can also explain the absence of positive effect of bacterial inoculation on their biomass production. Concerning the detrimental effect of *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup>, it can be explained by their ability to produce high level of biofilm. Although biofilm plays a major role in the attachment of bacteria to plant roots, known biofilm-forming rhizosphere *Burkholderia* (s.l) are reported to inhibit root development (Angus and Hirsch, 2013).

In light of our results and following the recommendations of Beukes *et al.* (2017) concerning the classification of the *Burkholderia* (s.l), we reconsidered the taxonomic position of our two species. For that purpose, a multilocus sequences analysis (MLSA) was performed and a tree was inferred from concatenated sequences of the genes 16S rRNA, *gyrB* and *recA*. As shown on Fig 2.6, *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> and *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> species located respectively in the neighborhood of the members of the genus *Paraburkholderia* and *Caballeronia*. (Dobritsa and Samadpour, 2016; Sawana *et al.*, 2014). According to Gyaneshwar *et al.* (2011), an essential difference between *Paraburkholderia* and *Burkholderia* (s.s) genus is the DNA G+C content. Members of the genus *Paraburkholderia* show DNA G+C content that ranges from 61.4 to 65.0 mol%, while the DNA G+C content of species of the genus *Burkholderia* (s.s) is in the 65.7

## CHAPITRE 2

- 68.5 mol% range (Sawana *et al.*, 2014). As described in Guentas *et al.* (2016), the DNA G+C contents of the STM20272<sup>T</sup> type strain of *B. novacaledonica* and of the STM20279<sup>T</sup> type strain of *B. ultramafica* are 63.6 mol% and 62.9 mol%, respectively. In addition to these phylogenetic traits, the two ultramafic species clearly showed different metal tolerance patterns and mechanisms. *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> was found to develop a biofilm to protect from metals, whereas *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> excreted EPS to sequester metals, although it was able to develop a biofilm. Finally, our results are in agreement with the literature, as biofilm formation has already been reported for *Paraburkholderia* (Zúñiga *et al.*, 2017) and *Caballeronia* species (Yoshida *et al.*, 2009), while EPS production was only observed in the *Paraburkholderia* genus (Achouak *et al.*, 1999; Serrato *et al.*, 2006; Silipo *et al.*, 2008; Suárez-Moreno *et al.*, 2012). Our analysis of the traits and phylogenetic positions of *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> and *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> showed that they belong to the genus *Paraburkholderia* and *Caballeronia* respectively, and we propose thus to transfer them to these genera. As a consequence, we propose *Paraburkholderia ultramafica* comb. nov. and *Caballeronia novacaledonica* comb. nov. as the names of these reclassified species.



**Fig 2.6** Rooted phylogenetic tree of *Burkholderia* and most related species. The tree was inferred from concatenated sequences of the genes 16S rRNA, *gyrB* and *recA*. Numbers at node represent bootstraps percentage from 1,000 replicates (shown only when > 50%). Scale bar indicates the number of substitutions per site.



## CHAPITRE 2

Description of *Caballeronia novacaledonica* comb. nov.

*Caballeronia novacaledonica* (no.va. L. adj. for new, ca.le.do'nica. L. n. Caledonia Latin name for the Scottish Highlands; L.adj. novacaledonica of New Caledonia from where the strains were isolated).

Basonym: *Burkholderia novacaledonica* (Guentas *et al.* 2016)

The description is as provided by Guentas *et al.* (2016) with the following additional properties.

The position in phylogenetic trees based on 16 rDNA gene sequences is in accordance with the emended genus description.

The type strain is STM10272<sup>T</sup> (= CIP 11088<sup>T</sup> = LMG 28615<sup>T</sup>).

Description of *Paraburkholderia ultramafica* comb. nov.

*Paraburkholderia ultramafica* (new latin, ul.tra L. adv., ultra for beyond; ma.fica for the term mafic which combines the first letters of “magnesium” and “ferrum,” the Latin word for iron: ma(gnesium) + f(errum) + ic for magnesium and iron content in soil, ultramafica L. adj referring to the fact that these bacteria were isolated from ultramafic soils).

Basonym: *Burkholderia ultramafica* (Guentas *et al.* 2016)

The description is as provided by Guentas *et al.* (2016) with the following additional properties.

The position in phylogenetic trees based on 16 rDNA gene sequences is in accordance with the emended genus description.

The type strain is STM10279<sup>T</sup> (= CIP 110886<sup>T</sup> = LMG 28614<sup>T</sup>).

## 2.5. Conclusions

The results of the present study clearly demonstrated that the two ultramafic bacterial species, reclassified in the *Caballeronia* and *Paraburkholderia* genus, used different mechanisms to cope with metal toxicity such as cell wall absorption, biofilm formation and EPS production. These mechanisms explained the decrease of metal concentrations in the plant and underlined the importance to consider the plant/rhizobacteria interaction in ultramafic soils in order to understand the mechanisms occurred in plant adaptation to the extreme edaphic constraints. Although no improvement in plant growth could be noticed, the ability of *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> to reduce metal concentrations can create a more hospitable environment for other organisms that will promote plant growth. Nocelli *et al.* (2016) have shown that EPS-producing metal tolerant rhizobia had a protective effect on non-producing, metal-sensitive rhizobia; a phenomenon termed “rescuing” of the non-tolerant strain. *Burkholderia* (s.l) species are found in association with arbuscular mycorrhizal fungi (Bianciotto and Bonfante, 2002; Cruz and Ishii, 2012; Gamalero *et al.*, 2009) as well as with ectomycorrhiza (Nguyen and Bruns, 2015) and co-inoculation have shown synergic effects on plant (Pérez-de-Luque *et al.*, 2017; Xun *et al.*, 2015). Enhancement of *T. comosa* growth was observed on New Caledonian ultramafic soil with the inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi (Lagrange *et al.*, 2013, 2011). Regarding these results, we suggest that co-inoculation might constitute a promising way in order to improve plant growth and metal tolerance on ultramafic soils and can be used as a tool in global strategies for successfully restoring postmining ultramafic areas

### **2.6. Acknowledgments**

The authors thank J.L. Duprey and L. Jamet from the LAMA laboratory (LAMA-US IMAGO-IRD, New Caledonia) for chemical analyses and E. Chalkiadakis from BIOTECAL Company for the technical support. This work was supported by the Grand Observatoire du Pacifique Sud (ARBRE project); Province Sud of New Caledonia (Prix d' Encouragement à la Recherche: Thesis Grant and Vivaldi program: Master internship allowance).

### **2.7. Disclosure statement**

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## 2.8. References

- Abou-Shanab, R.A.I., van Berkum, P., Angle, J.S.** 2007. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere* **68**, 360–367.
- Achouak, W., Christen, R., Barakat, M., Martel, M.-H., Heulin, T.** 1999. *Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 787–794.
- Amir, H., Ducouso, M.** 2010. Les bactéries et les champignons du sol su roches ultramafiques, pp. 129-145. In: L’Huillier, L., Jaffré, T., Wulff, A. (eds.), Mines et Environnement En Nouvelle-Calédonie : Les Milieux Sur Substrats Ultramafiques et Leur Restauration-2010. Noumea, New Caledonia
- Amir, H., Pineau, R.** 2003. Release of Ni and Co by microbial activity in New Caledonian ultramafic soils. *Can. J. Microbiol.* **49**, 288–293.
- Angus, A. a, Hirsch, A.M.** 2013. Biofilm Formation in the Rhizosphere: Multispecies Interactions and Implications for Plant Growth, pp. 701-712. In Franz, J. (Ed.), Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Beukes, C.W., Palmer, M., Manyaka, P., Chan, W.Y., Avontuur, J.R., van Zyl, E., Huntemann, M., Clum, A., Pillay, M., Palaniappan, K., Varghese, N., Mikhailova, N., Stamatis, D., Reddy, T.B.K., Daum, C., Shapiro, N., Markowitz, V., Ivanova, N., Kyrpidis, N., Woyke, T., Blom, J., Whitman, W.B., Venter, S.N., Steenkamp, E.T.** 2017. Genome Data Provides High Support for Generic Boundaries in *Burkholderia* S.l. *Front. Microbiol.* **8**, 1–12.
- Bianciotto, V., Bonfante, P.** 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi: a specialised niche for rhizospheric and endocellular bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**, 365–371.
- Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G.** 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* **54**, 484–489.
- Bontemps, C., Rogel, M.A., Wiechmann, A., Mussabekova, A., Moody, S., Simon, M.F., Moulin, L., Elliott, G.N., Lacercat-Didier, L., Dasilva, C., Grether, R., Camargo-Ricalde, S.L., Chen, W., Sprent, J.I., Martínez-Romero, E., Young, J.P.W., James, E.K.** 2016. Endemic *Mimosa* species from Mexico prefer alphaproteobacterial rhizobial symbionts. *New Phytol.* **209**, 319–333.
- Brian-Jaisson, F.** 2014. Ph D. thesis. University of Toulon, Toulon, France.
- Brooks, R.R.** 1987. Serpentine and its vegetation: a multidisciplinary approach, Dioscoride. ed. Portland, USA.
- Brown, R.E., Jarvis, K.L., Hyland, K.J.** 1989. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal. Biochem.* **180**, 136–139.
- Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme, F.W.** 2000. Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **45**, 198–207.

- Chaintreuil, C., Rigault, F., Moulin, L., Jaffre, T., Fardoux, J., Giraud, E., Dreyfus, B., Bailly, X.** 2007. Nickel Resistance Determinants in *Bradyrhizobium* Strains from Nodules of the Endemic New Caledonia Legume *Serianthes calycina*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 8018–8022.
- Chaplin, M.F.** 1986. Monosaccharides, pp. 1-36. In Chaplin, M.F., Kennedy, J.F. (eds.), *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach-1986*. Oxford, UK.
- Chiarucci, A., Baker, A.J.M.** 2007. Advances in the ecology of serpentine soils. *Plant Soil* **293**, 1–2.
- Chien, C.C., Lin, B.C., Wu, C.H.** 2013. Biofilm formation and heavy metal resistance by an environmental *Pseudomonas* sp. *Biochem. Eng. J.* **78**, 132–137.
- Corpet, F.** 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* **16**, 10881–10890.
- Cruz, a. F., Ishii, T.** 2012. Arbuscular mycorrhizal fungal spores host bacteria that affect nutrient biodynamics and biocontrol of soil-borne plant pathogens. *Biol. Open* **1**, 52–57.
- Dereeper, A., Audic, S., Claverie, J.-M., Blanc, G.** 2010. BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC Evol. Biol.* **10**, 8.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.-M., Gascuel, O.** 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* **36**, 465–469.
- Dobritsa, A.P., Samadpour, M.** 2016. Transfer of eleven species of the genus *Burkholderia* to the genus *Paraburkholderia* and proposal of *Caballeronia* gen. nov. to accommodate twelve species of the genera *Burkholderia* and *Paraburkholderia*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**, 2836–2846.
- Dourado, M.N., Franco, M.R., Peters, L.P., Martins, P.F., Souza, L.A., Piotto, F.A., Azevedo, R.A.** 2015. Antioxidant enzymes activities of *Burkholderia* spp. strains—oxidative responses to Ni toxicity. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 19922–19932.
- DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F.** 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* **28**, 350–356.
- Estrada-de los Santos, P., Palmer, M., Chávez-Ramírez, B., Beukes, C., Steenkamp, E., Briscoe, L., Khan, N., Maluk, M., Lafos, M., Humm, E., Arrabit, M., Crook, M., Gross, E., Simon, M., dos Reis Junior, F., Whitman, W., Shapiro, N., Poole, P., Hirsch, A., Venter, S., James, E.** 2018. Whole Genome Analyses Suggests that *Burkholderia* s.l Contains Two Additional Novel Genera (*Mycetohabitans* gen. nov., and *Trinickia* gen. nov.): Implications for the Evolution of Diazotrophy and Nodulation in the Burkholderiaceae. *Genes (Basel)* **9**, 389.
- Etesami, H.** 2018. Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues: Mechanisms and future prospects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **147**, 175–191.
- Ferreira, A.S.** 2011. Insights into the role of extracellular polysaccharides in *Burkholderia* adaptation to different environments. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **1**, 1–9.

- Filisetti-Cozzi, T.M.C.C., Carpita, N.C.** 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Anal. Biochem.* **197**, 157–162.
- Galtier, N., Gouy, M. and Gautier, C.** (1996) SeaView and Phylo\_win, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Applic. Biosci.* **12**, 543-548
- Gamalero, E., Lingua, G., Berta, G., Glick, B.R.** 2009. Beneficial role of plant growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant responses to heavy metal stress. *Can. J. Microbiol.* **55**, 501–514.
- Giovanella, P., Cabral, L., Costa, A.P., de Oliveira Camargo, F.A., Gianello, C., Bento, F.M.** 2017. Metal resistance mechanisms in Gram-negative bacteria and their potential to remove Hg in the presence of other metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **140**, 162–169.
- Gonin, M., Gensous, S., Lagrange, A., Ducouso, M., Amir, H., Jourand, P.** 2013. Rhizosphere bacteria of *Costularia* spp. from ultramafic soils in New Caledonia: diversity, tolerance to extreme edaphic conditions, and role in plant growth and mineral nutrition. *Can. J. Microbiol.* **59**, 164–174.
- Guentas, L., Gensous, S., Cavaloc, Y., Ducouso, M., Amir, H., De Georges de Ledenon, B., Moulin, L., Jourand, P.** 2016. *Burkholderia novacaledonica* sp. nov. and *B. ultramafica* sp. nov. isolated from roots of *Costularia* spp. pioneer plants of ultramafic soils in New Caledonia. *Syst. Appl. Microbiol.* **39**, 151–159.
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O.** 2010. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **59**, 307–321.
- Gupta, P., Diwan, B.** 2017. Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnol. Reports* **13**, 58–71.
- Gyaneshwar, P., Hirsch, A.M., Moulin, L., Chen, W.-M., Elliott, G.N., Bontemps, C., Estrada-de los Santos, P., Gross, E., dos Reis, F.B., Sprent, J.I., Young, J.P.W., James, E.K.** 2011. Legume-Nodulating Betaproteobacteria: Diversity, Host Range, and Future Prospects. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **24**, 1276–1288.
- Hartley, J., Cairney, J.W.G., Meharg, A.A.** 1997. Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptive tolerance to potentially toxic metals in the environment? *Plant Soil* **189**, 303–319.
- Herrera, A., Héry, M., Stach, J.E.M., Jaffré, T., Normand, P., Navarro, E.** 2007. Species richness and phylogenetic diversity comparisons of soil microbial communities affected by nickel-mining and revegetation efforts in New Caledonia. *Eur. J. Soil Biol.* **43**, 130–139.
- Heydorn, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B.K., Molin, S.** 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program comstat. *Microbiology* **146**, 2395–2407.
- Jaffré, T., L’Huillier, L.** 2010. La végétation des roches ultramafiques ou terrains miniers, pp. 45–103. In L’Huillier, L., Jaffré, T., Wulff, A. (eds.), Mines et Environnement En Nouvelle-Calédonie : Les Milieux Sur Substrats Ultramafiques et Leur Restauration-2010. Noumea, New Caledonia.

- Joshi, P.M., Juwarkar, A.A.** 2009. *In Vivo* Studies to Elucidate the Role of Extracellular Polymeric Substances from *Azotobacter* in Immobilization of Heavy Metals. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 5884–5889.
- Kazakou, E., Dimitrakopoulos, P.G., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Troumbis, A.Y.** 2008. Hypotheses, mechanisms and trade-offs of tolerance and adaptation to serpentine soils: from species to ecosystem level. *Biol. Rev.* 495–508.
- Klonowska, A., Chaintreuil, C., Tisseyre, P., Miché, L., Melkonian, R., Ducouso, M., Laguerre, G., Brunel, B., Moulin, L.** 2012. Biodiversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts (*Cupriavidus taiwanensis*, *Rhizobium mesoamericanum*) in New Caledonia and their adaptation to heavy metal-rich soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* **81**, 618–635.
- Koehler, S., Farasin, J., Cleiss-Arnold, J., Arsène-Ploetze, F.** 2015. Toxic metal resistance in biofilms: diversity of microbial responses and their evolution. *Res. Microbiol.* **166**, 764–773.
- Kuffner, M., De Maria, S., Puschenreiter, M., Fallmann, K., Wieshammer, G., Gorfer, M., Strauss, J., Rivelli, A.R., Sessitsch, A.** 2010. Culturable bacteria from Zn- and Cd-accumulating *Salix caprea* with differential effects on plant growth and heavy metal availability. *J. Appl. Microbiol.* **108**, 1471–1484.
- Lagrange, A., Ducouso, M., Jourand, P., Majorel, C., Amir, H.** 2011. New insights into the mycorrhizal status of Cyperaceae from ultramafic soils in New Caledonia. *Can. J. Microbiol.* **57**, 21–28.
- Lagrange, A., L’Huillier, L., Amir, H.** 2013. Mycorrhizal status of Cyperaceae from New Caledonian ultramafic soils: Effects of phosphorus availability on arbuscular mycorrhizal colonization of *Costularia comosa* under field conditions. *Mycorrhiza* **23**, 655–661.
- Larcher, M., Muller, B., Mantelin, S., Rapior, S., Cleyet-Marel, J.-C.** 2003. Early modifications of *Brassica napus* root system architecture induced by a plant growth-promoting *Phyllobacterium* strain. *New Phytol.* **160**, 119–125.
- Larridon, I., Bauters, K., Semmouri, I., Viljoen, J.-A., Prychid, C.J., Muasya, A.M., Bruhl, J.J., Wilson, K.L., Senterre, B., Goetghebeur, P.** 2018b. Molecular phylogenetics of the genus *Costularia* (Schoeneae, Cyperaceae) reveals multiple distinct evolutionary lineages. *Mol. Phylogenet. Evol.* **126**, 196–209.
- Larridon, I., Verboom, G.A., Muasya, A.M.** 2018a. Revised delimitation of the genus *Tetraria*, nom. cons. prop. (Cyperaceae, tribe Schoeneae, Tricostularia clade). *South African J. Bot.* **118**, 18–22.
- Liu, X., Huang, Y., Chen, Y., Cao, Y.** 2016. Partial structural characterization, as well as immunomodulatory and anti-aging activities of CP2-c2-s2 polysaccharide from *Cordyceps militaris*. *RSC Adv.* **6**, 104094–104103.
- Lopes-Santos, L., Castro, D.B.A., Ferreira-Tonin, M., Corrêa, D.B.A., Weir, B.S., Park, D., Ottoboni, L.M.M., Neto, J.R., Destéfano, S.A.L.** 2017. Reassessment of the taxonomic position of *Burkholderia andropogonis* and description of *Robbsia andropogonis* gen. nov., comb. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* **110**, 727–736.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–75.

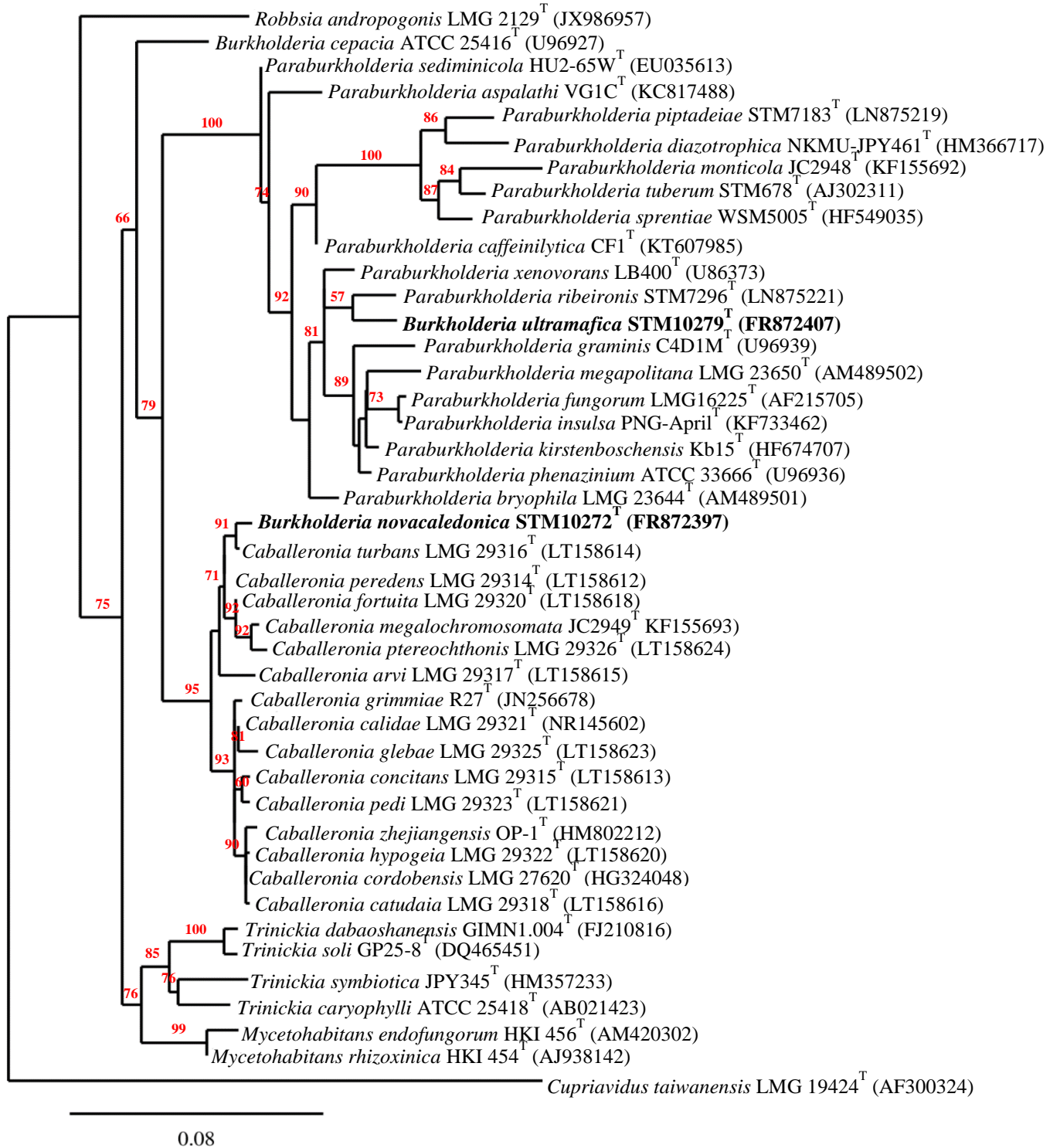
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Sa, T.** 2007. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Chemosphere* **69**, 220–228.
- Mengoni, A., Barzanti, R., Gonnelli, C., Gabbrielli, R., Bazzicalupo, M.** 2001. Characterization of nickel-resistant bacteria isolated from serpentine soil. *Environ. Microbiol.* **3**, 691–698.
- Mengoni, A., Schat, H., Vangronsveld, J.** 2010. Plants as extreme environments? Ni-resistant bacteria and Ni-hyperaccumulators of serpentine flora. *Plant Soil* **331**, 5–16.
- Morat, P., Jaffré, T., Tronchet, F., Munzinger, J., Pillon, Y., Veillon, J.-M., Chalopin, M., Birnbaum, P., Rigault, F., Dagostini, G., Tinel, J., Lowry, P.P.** 2012. Le référentiel taxonomique Florical et les caractéristiques de la flore vasculaire indigène de la Nouvelle-Calédonie. *Adansonia* **34**, 179–221.
- Myers, N.** 2003. Biodiversity Hotspots Revisited. *Bioscience* **53**, 916–917.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B., Kent, J.** 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**, 853–858.
- Nguyen, N.H., Bruns, T.D.** 2015. The Microbiome of *Pinus muricata* Ectomycorrhizae: Community Assemblages, Fungal Species Effects, and *Burkholderia* as Important Bacteria in Multipartnered Symbioses. *Microb. Ecol.* **69**, 914–921.
- Nocelli, N., Bogino, P., Banchio, E., Giordano, W.** 2016. Roles of Extracellular Polysaccharides and Biofilm Formation in Heavy Metal Resistance of Rhizobia. *Materials (Basel)*. **9**, 418.
- O'Toole, G.A.** 2011. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *J. Vis. Exp.* 10–11.
- Pal, A., Paul, A.K.** 2008. Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Indian J. Microbiol.* **48**, 49–64.
- Pal, A., Wauters, G., Paul, a. K.** 2007. Nickel tolerance and accumulation by bacteria from rhizosphere of nickel hyperaccumulators in serpentine soil ecosystem of Andaman, India. *Plant Soil* **293**, 37–48.
- Pascal, M., De Forges, B.R., Le Guyader, H., Simberloff, D.** 2008. Mining and Other Threats to the New Caledonia Biodiversity Hotspot. *Conserv. Biol.* **22**, 498–499.
- Pasquet, C., Monna, F., van Oort, F., Gunkel-Grillon, P., Laporte-Magoni, C., Losno, R., Chateau, C.** 2018. Mobility of Ni, Co, and Mn in ultramafic mining soils of New Caledonia, assessed by kinetic EDTA extractions. *Environ. Monit. Assess.* **190**, 638.
- Pérez-de-Luque, A., Tille, S., Johnson, I., Pascual-Pardo, D., Ton, J., Cameron, D.D.** 2017. The interactive effects of arbuscular mycorrhiza and plant growth-promoting rhizobacteria synergistically enhance host plant defences against pathogens. *Sci. Rep.* **7**, 16409.
- Perrin, C., Briandet, R., Jubelin, G., Lejeune, P., Mandrand-Berthelot, M.-A., Rodrigue, A., Dorel, C.** 2009. Nickel Promotes Biofilm Formation by *Escherichia coli* K-12 Strains That Produce Curli. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 1723–1733.
- Pulsawat, W., Leksawasdi, N., Rogers, P.L., Foster, L.J.R.** 2003. Anions effects on biosorption of Mn(II) by extracellular polymeric substance (EPS) from *Rhizobium etli*. *Biotechnol. Lett.* **25**, 1267–1270.



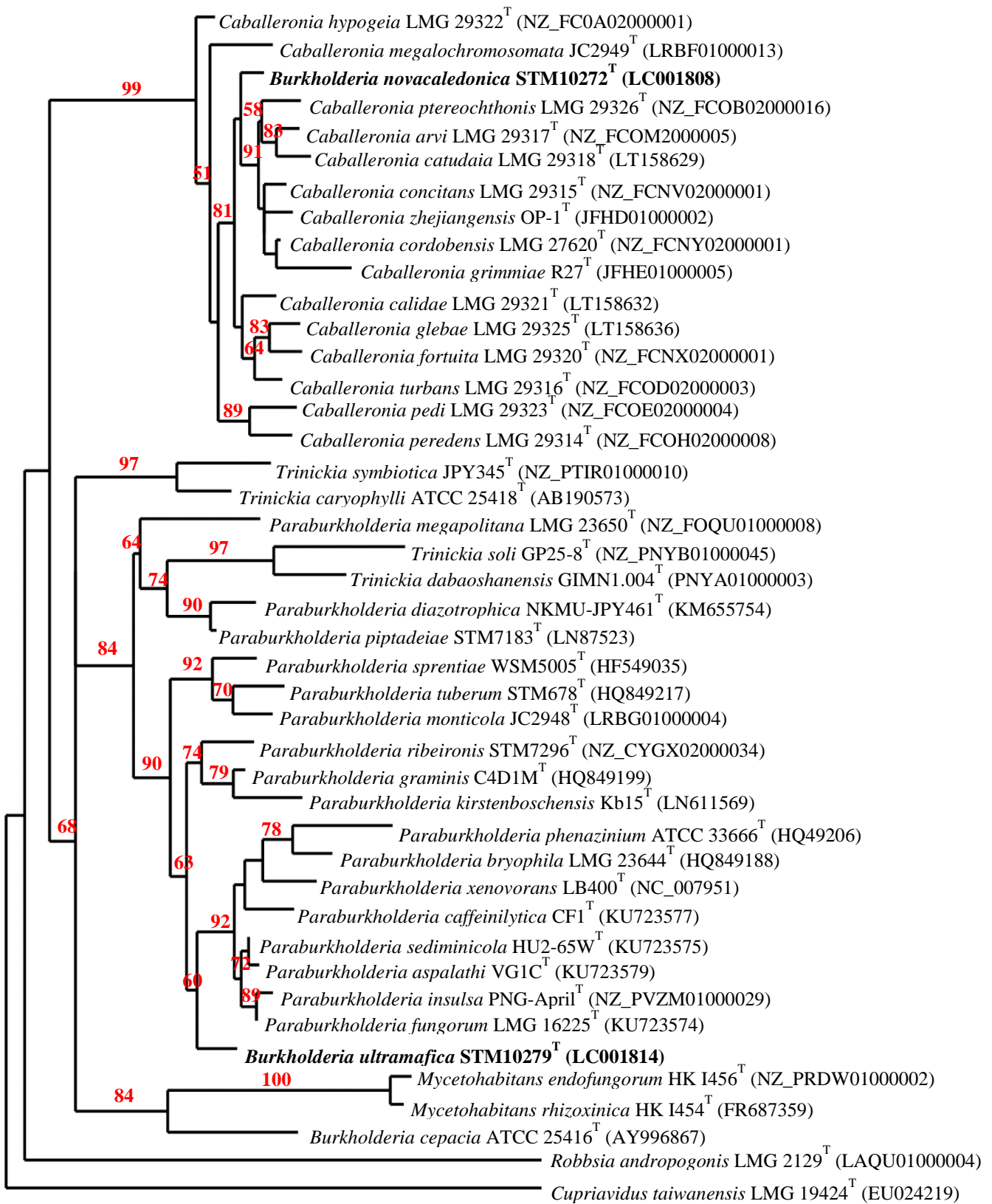
- R Core Team.** 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M.N. V., Freitas, H.** 2012. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* **30**, 1562–74.
- Rajkumar, M., Vara Prasad, M.N., Freitas, H., Ae, N.** 2009. Biotechnological applications of serpentine soil bacteria for phytoremediation of trace metals. *Crit. Rev. Biotechnol.* **29**, 120–130.
- Sawana, A., Adeolu, M., Gupta, R.S.** 2014. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. *Front. Genet.* **5**, 1–22.
- Sessitsch, A., Kuffner, M., Kidd, P., Vangronsveld, J., Wenzel, W.W., Fallmann, K., Puschenreiter, M.** 2013. The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biol. Biochem.* **60**, 182–194.
- Silipo, A., Ierano, T., Lanzetta, R., Molinaro, A., Parrilli, M.** 2008. The Structure of the O-Chain Polysaccharide from the Gram-Negative Endophytic Bacterium *Burkholderia phytofirmans* Strain PsJN. *European J. Org. Chem.* **2008**, 2303–2308.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76–85.
- Smith, S.E., Smith, F.A.** 2012. Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. *Mycologia* **104**, 1–13.
- Stoppel, R.D., Schlegel, H.G.** 1995. Nickel-resistant bacteria from anthropogenically nickel-polluted and naturally nickel-percolated ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2276–2285.
- Su, C., Xu, X., Liu, D., Wu, M., Zeng, F., Zeng, M., Wei, W., Jiang, N., Luo, X.** 2013. Isolation and characterization of exopolysaccharide with immunomodulatory activity from fermentation broth of *Morchella conica*. *DARU J. Pharm. Sci.* **21**, 5.
- Suárez-Moreno, Z.R., Caballero-Mellado, J., Coutinho, B.G., Mendonça-Previato, L., James, E.K., Venturi, V.** 2012. Common Features of Environmental and Potentially Beneficial Plant-Associated *Burkholderia*. *Microb. Ecol.* **63**, 249–266.
- Sun, R., M. Fang, J., Goodwin, A., M. Lawther, J., J. Bolton, A.** 1998. Fractionation and characterization of polysaccharides from abaca fibre. *Carbohydr. Polym.* **37**, 351–359.
- Vanhaverbeke, C., Heyraud, A., Achouak, W., Heulin, T.** 2001. Structural analysis of the exopolysaccharide from *Burkholderia caribensis* strain MWAP71. *Carbohydr. Res.* **334**, 127–133.
- Vega, L.M., Mathieu, J., Yang, Y., Pyle, B.H., McLean, R.J.C., Alvarez, P.J.J.** 2014. Nickel and cadmium ions inhibit quorum sensing and biofilm formation without affecting viability in *Burkholderia multivorans*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **91**, 82–87.

- Xun, F., Xie, B., Liu, S., Guo, C.** 2015. Effect of plant growth-promoting bacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculation on oats in saline-alkali soil contaminated by petroleum to enhance phytoremediation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 598–608.
- Wheaton, G., Counts, J., Mukherjee, A., Kruh, J., Kelly, R.** 2015. The Confluence of Heavy Metal Biooxidation and Heavy Metal Resistance: Implications for Bioleaching by Extreme Thermoacidophiles. *Minerals* **5**, 397–451.
- Wulff, A., L’Huillier, L., Vea, C., Jaffré, T.** 2010. Espèces indigènes utilisables en revégétalisation, pp 231-344. In L’Huillier, L., Jaffré, T., Wulff, A. (Eds.), *Mines et Environnement En Nouvelle-Calédonie : Les Milieux Sur Substrats Ultramafiques et Leur Restauration-2010 Noumea, New Caledonia*.
- Yoshida, S., Ogawa, N., Fujii, T., Tsushima, S.** 2009. Enhanced biofilm formation and 3-chlorobenzoate degrading activity by the bacterial consortium of *Burkholderia* sp. NK8 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Appl. Microbiol.* **106**, 790–800.
- Zúñiga, A., Donoso, R.A., Ruiz, D., Ruz, G.A., González, B.** 2017. Quorum-Sensing Systems in the Plant Growth-Promoting Bacterium *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN Exhibit Cross-Regulation and Are Involved in Biofilm Formation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **30**, 557–565.

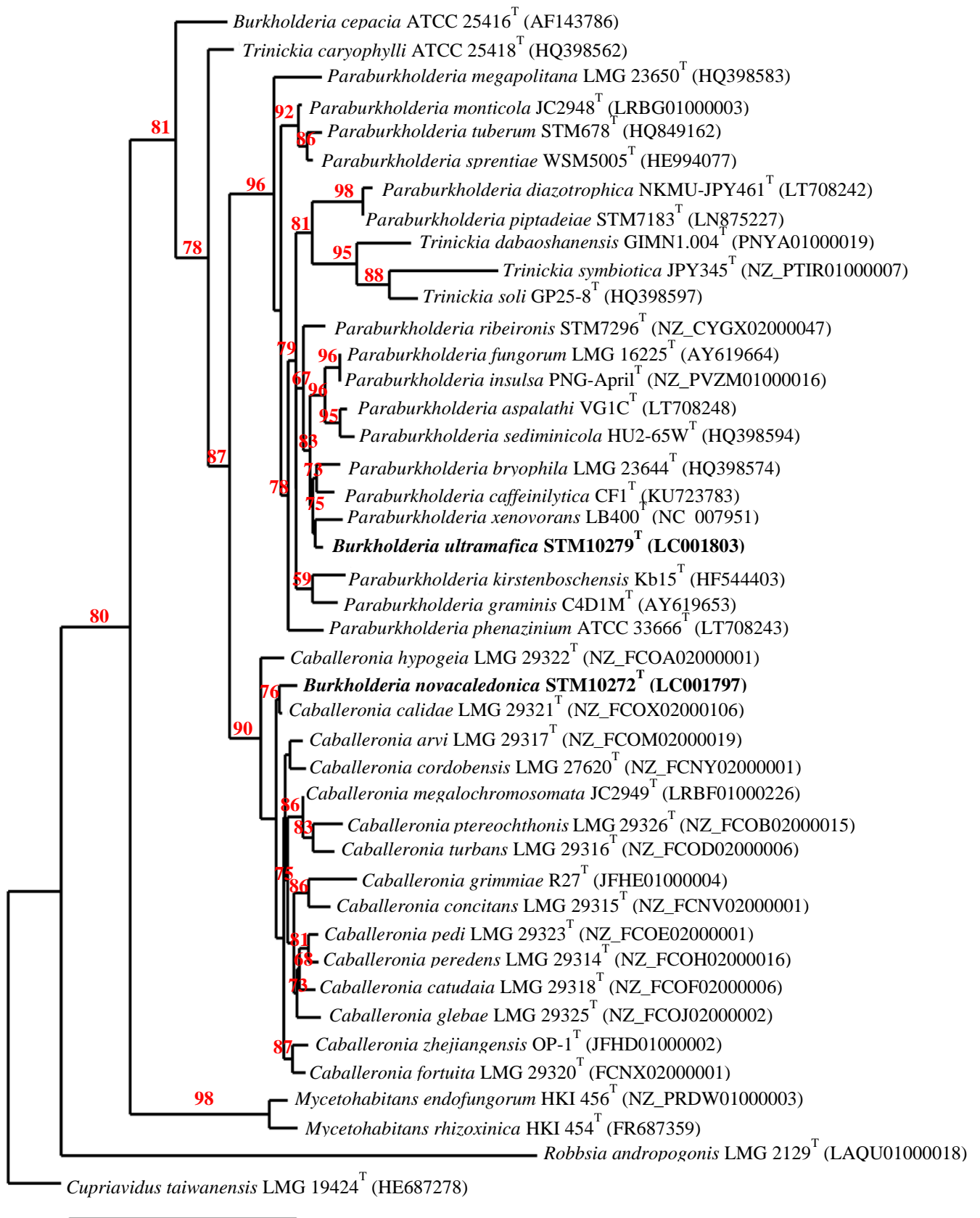
Appendix A: Supplementary Materials



**FigS2.1** Rooted phylogenetic tree of *Burkholderia* (*sensu lato*) and related species. The tree was inferred from sequences of the gene 16S rRNA. Numbers at node represent bootstrap percentages from 1000 replicates (shown only when > 50%). Scale bar indicates numbers of substitutions per site.



0.3  
**FigS2.2** Rooted phylogenetic tree of *Burkholderia* (*sensu lato*) and related species. The tree was inferred from sequences of the gene *gyrB*. Numbers at node represent bootstrap percentages from 1000 replicates (shown only when > 50%). Scale bar indicates numbers of substitutions per site



0.3  
**FigS2.3** Rooted phylogenetic tree of *Burkholderia* (*sensu lato*) and related species. The tree was inferred from sequences of the gene *recA*. Numbers at node represent bootstrap percentages from 1000 replicates (shown only when > 50%). Scale bar indicates numbers of substitutions per site

CHAPITRE 2

**Table S2.1** Major characteristics of *Burkholderia ultramafica* STM10279<sup>T</sup> and *Burkholderia novacaledonica* STM10272<sup>T</sup>.

	<i>Burkholderia ultramafica</i> STM10279 <sup>T</sup>	<i>Burkholderia novacaledonica</i> STM10272 <sup>T</sup>
<b>Sampling characteristics</b>		
Plant Host species	<i>Tetraria arundinacea</i>	<i>Tetraria arundinacea</i>
Sites	Mont-Dore, Plum road 22°15'54"S; 166°35'57" E 22.26 S 166.59 E	Trazy-Guerioum, Koniambo massif, Kone 21°00'26"S 164°50'04"E 21.00 S 164.83 E
Soil characteristics	Ultramafic cambisol	Ultramafic ferralsol
<b>Microbiological characteristics</b>		
Range temperature (°C)	20-32	15-37
% NaCl	0-1	0-1
pH optimum	5-6	5-6
<b>Biochemical characteristics</b>		
Indole production	+	-
Arginine dihydrolase	Variable (var)	+
Gelatine hydrolase	-	var
Urease	var	+
Acid phosphatase	+	var
Oxidase	var	-
C8 esterase lipase	-	var
Valine arylamidase	-	var
Assimilation		
Arabinose	var	-
Mannose	+	var
Mannitol	+	var
Glucose	+	+
Tri sodium citrate	-	var
Phenylacetic acid	+	var
Adipic acid	var	-
<b>Major cellular fatty acids</b>		
C18:1 <sup>ω7c</sup> %	34.8	40.9
cyclo C17:0%	10.2	5.9
C16 : 0%	9.1	17.1
<b>Molecular characteristics</b>		
16S RNA seq EMBL	FR872407	FR872397
G+C%	62.9	63.6

CHAPITRE 2

**Table S2.2** Biochemical properties associated with tolerance to metals and Ca/Mg ratio of *Burkholderia novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> and *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> isolated from (Gonin *et al.*, 2013).

	<i>Burkholderia. novacaledonica</i> STM10272 <sup>T</sup>	<i>Burkholderia ultramafica</i> STM10279 <sup>T</sup>
<b>Tolerance</b>		
Ni	1mM	10mM
Mn	100mM	100mM
Co	1mM	10mM
Cr	100µM	500µM
Ca /Mg (0.33/6.4mM)	Dilution 1/10	Non diluted

CHAPITRE 2

**Table S2.3** Accession numbers of the references 16SrRNA, *gyrB* and *recA* DNA sequences of *Burkholderia* (*sensu lato*) references strains used for inferring phylogenetic trees.

Species	Type strains	16S rRNA	<i>gyrB</i>	<i>recA</i>
<i>Robbsia andropogonis</i>	LMG 2129	JX986957	LAQU01000004	LAQU01000018
<i>Burkholderia cepacia</i>	ATCC 25416	U96927	AY996867	AF143786
<i>Paraburkholderia sediminicola</i>	HU2-65W	EU035613	KU723575	HQ398594
<i>Paraburkholderia aspalathi</i>	VG1C	KC817488	KU723579	LT708248
<i>Paraburkholderia piptadeiae</i>	STM7183	LN875219	LN875234	LN875227
<i>Paraburkholderia diazotrophica</i>	NKMU-JPY461	HM366717	KM655754	LT708242
<i>Paraburkholderia monticola</i>	JC2948	KF155692	LRBG01000004	LRBG01000003
<i>Paraburkholderia tuberum</i>	STM678	AJ302311	HQ849217	HQ849162
<i>Paraburkholderia sprentiae</i>	WSM5005	HF549035	HF549035	HE994077
<i>Paraburkholderia caffeinilytica</i>	CF1	KT607985	KU723577	KU723583
<i>Paraburkholderia xenovorans</i>	LB400	U86373	NC_007951	NC_007951
<i>Paraburkholderia ribeironis</i>	STM7296	LN875221	NZ_CYGX02000034	NZ_CYGX02000047
<i>Burkholderia ultramafica</i>	STM10279	FR872407	LC001814	LC001803
<i>Paraburkholderia graminis</i>	C4D1M	U96939	HQ849199	AY619653
<i>Paraburkholderia megapolitana</i>	LMG 23650	AM489502	NZ_FOQU01000008	HQ398583
<i>Paraburkholderia fungorum</i>	LMG 16225	AF215705	KU723574	AY619664
<i>Paraburkholderia insulsa</i>	PNG-April	KF733462	NZ_PVZM01000029	NZ_PVZM01000016
<i>Paraburkholderia kirstenboschensis</i>	Kb15	HF674707	LN611569	HF544403
<i>Paraburkholderia phenazinium</i>	ATCC 33666	U96936	HQ849206	LT708243
<i>Paraburkholderia bryophila</i>	LMG 23644	AM489501	HQ849188	HQ398574
<i>Burkholderia novaealedonica</i>	STM10272	FR872397	LC001808	LC001797
<i>Caballeronia turbans</i>	LMG 29316	LT158614	NZ_FCOD02000003	NZ_FCOD02000006
<i>Caballeronia peredens</i>	LMG 29314	LT158612	NZ_FCOH02000008	NZ_FCOH02000016
<i>Caballeronia fortuita</i>	LMG 29320	LT158618	NZ_FCNX02000001	FCNX02000001
<i>Caballeronia megalochromosomata</i>	JC2949	KF155693	LRBF01000013	LRBF01000226
<i>Caballeronia ptereochthonis</i>	LMG 29326	LT158624	NZ_FCOB02000016	NZ_FCOB02000015
<i>Caballeronia arvi</i>	LMG 29317	LT158615	NZ_FCOM02000005	NZ_FCOM02000019
<i>Caballeronia grimmiae</i>	R27	JN256678	JFHE01000005	JFHE01000004
<i>Caballeronia calidae</i>	LMG 29321	NR145602	LT158632	NZ_FCOX02000106
<i>Caballeronia glebae</i>	LMG 29325	LT158623	LT158636	NZ_FCOJ02000002
<i>Caballeronia concitans</i>	LMG 29315	LT158613	NZ_FCNV02000001	NZ_FCNV02000001
<i>Caballeronia pedi</i>	LMG 29323	LT158621	NZ_FCOE02000004	NZ_FCOE02000001
<i>Caballeronia zhejiangensis</i>	OP-1	HM802212	JFHD01000002	JFHD01000002
<i>Caballeronia hypogea</i>	LMG 29322	LT158620	NZ_FCOA02000001	NZ_FCOA02000001
<i>Caballeronia cordobensis</i>	LMG 27620	HG324048	NZ_FCNY02000001	NZ_FCNY02000001



## CHAPITRE 2

<i>Caballeronia catudaia</i>	LMG 29318	LT158616	LT158629	NZ_FCOF02000006
<i>Trinickia dabaoshanensis</i>	GIMN1.004	FJ210816	PNYA01000003	PNYA01000019
<i>Trinickia soli</i>	GP25-8	DQ465451	NZ_PNYB01000045	HQ398597
<i>Trinickia symbiotica</i>	JPY345	HM357233	NZ_PTIR01000010	NZ_PTIR01000007
<i>Trinickia caryophylli</i>	ATCC 25418	AB021423	AB190573	HQ398562
<i>Mycetohabitans endofungorum</i>	HKI 456	AM420302	NZ_PRDW01000002	NZ_PRDW01000003
<i>Mycetohabitans rhizoxinica</i>	HKI 454	AJ938142	FR687359	FR687359
<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	LMG 19424	AF300324	EU024219	HE687278

CHAPITRE 2

**Table S2.4** Ni content measured in *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup>, *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> and *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup> (mean ± SE, n = 3).

Ni (mM)	Strains	Intracellular Ni		Wall surface Ni	
		Ni content (µg 10 <sup>7</sup> CFU <sup>-1</sup> )	% <sup>‡</sup>	Ni content (µg 10 <sup>7</sup> CFU <sup>-1</sup> )	%
0	<i>B. ultramafica</i> STM10279 <sup>T</sup>	0.15 ± 0.01j <sup>†</sup>	-	1.78 ± 0.19h	-
	<i>B. novacaledonica</i> STM10272 <sup>T</sup>	0.16 ± 0.02j	-	2.37 ± 0.66h	-
	<i>P. caribensis</i> MWAP64 <sup>T</sup>	1.82 ± 0.37g		14.3 ± 4.0ef	
1	<i>B. ultramafica</i> STM10279 <sup>T</sup>	0.28 ± 0.04i	0.00	2.93 ± 0.90gh	0.01
	<i>B. novacaledonica</i> STM10272 <sup>T</sup>	4.74 ± 0.23f	0.01	7.14 ± 0.70f	0.01
	<i>P. caribensis</i> MWAP64 <sup>T</sup>	11.6 ± 1.4e	0.02	22.1 ± 1.0de	0.04
5	<i>B. ultramafica</i> STM10279 <sup>T</sup>	0.76 ± 0.02h	0.00	3.45 ± 0.34g	0.01
	<i>B. novacaledonica</i> STM10272 <sup>T</sup>	329 ± 55d	0.56	297 ± 81cd	0.51
	<i>P. caribensis</i> MWAP64 <sup>T</sup>	8302 ± 226b	14.22	2329 ± 5542b	3.99
50	<i>B. ultramafica</i> STM10279 <sup>T</sup>	1650 ± 174c	0.28	7357 ± 464bc	1.26
	<i>B. novacaledonica</i> STM10272 <sup>T</sup>	1775 ± 320c	0.30	15040 ± 1492ab	2.58
	<i>P. caribensis</i> MWAP64 <sup>T</sup>	31773 ± 9539a	5.44	101293 ± 11731a	17.35

<sup>†</sup>Value with the same lower case letters in each column are not significantly different at P < 0.05 using Fisher's (LSD) test. <sup>‡</sup>Values correspond to the percentage of nickel found in relation to the quantity introduced.

CHAPITRE 2

**Table S2.5** Ratio of the biomass of biofilm formed by *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup>, *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> and *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup> in response to nickel stress MWAP64<sup>T</sup> in response to nickel stress and as a function of the exposure time 24h, 48h and 72h. (mean ± SE, n = 6).

Species	NiSO <sub>4</sub> (mM)	24h		48h		72h	
		Assay/Blank		Assay/Blank		Assay/Blank	
<i>B. ultramafica</i> STM10279 <sup>T</sup>	0	4.48	± 0.21a <sup>†</sup>	4.46	± 0.15bc	6.2	± 0.12bc
	0.5	3.46	± 0.15b	3.62	± 0.26cd	5.29	± 0.11cd
	1	1.93	± 0.02de	2.97	± 0.19de	4.21	± 0.13de
	2.5	1.77	± 0.03ef	2.24	± 0.03ef	2.47	± 0.27ef
	5	1.18	± 0.02kl	1.34	± 0.08ij	1.14	± 0.04kl
	8	1.16	± 0.02kl	1.18	± 0.12k	1.16	± 0.02jkl
	10	1.19	± 0.03kl	1.16	± 0.06k	1.10	± 0.04lm
<i>B. novacaledonica</i> STM10272 <sup>T</sup>	0	3.48	± 0.32b	7.55	± 0.21a	11.73	± 0.26a
	0.5	2.66	± 0.12c	7.35	± 0.20a	10.72	± 0.42a
	1	2.42	± 0.15cd	7.09	± 0.21a	8.47	± 0.24ab
	2.5	1.45	± 0.08ij	1.59	± 0.1gh	1.24	± 0.09ijk
	5	1.44	± 0.07ij	1.44	± 0.03hi	1.26	± 0.05hij
	8	1.22	± 0.03k	1.40	± 0.05hij	1.19	± 0.05ijkl
<i>P. caribensis</i> MWAP64 <sup>T</sup>	10	1.11	± 0.03lm	1.17	± 0.04k	1.22	± 0.03m
	0	3.66	± 0.26ab	5.38	± 0.22b	6.67	± 0.40bc
	0.5	1.36	± 0.03j	1.70	± 0.05fg	3.01	± 0.70fg
	1	1.56	± 0.05hi	2.84	± 0.25de	3.05	± 0.62ef
	2.5	1.64	± 0.04gh	2.02	± 0.10f	1.64	± 0.01igh
	5	1.70	± 0.03fg	1.31	± 0.03j	1.56	± 0.22ghi
	8	1.07	± 0.02m	1.24	± 0.01jk	1.08	± 0.06m
	10	0.89	± 0.03n	1.15	± 0.02k	0.99	± 0.04m

<sup>†</sup>Value with the same lower case letters in each column are not significantly different at P < 0.05 using Fisher's (LSD) test.

CHAPITRE 2

**Table S2.6** Characteristics of the biofilms produced by *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup>, *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> and *B. caribensis* MWAP64<sup>T</sup> with and without NiSO<sub>4</sub> (mean ± SE, n = 6).

Species	NiSO <sub>4</sub> (mM)	Biofilm parameters					
		Biovolume (μm <sup>3</sup> /μm <sup>2</sup> )		Thickness average (μm)		Substratum coverage (%)	
<i>B. ultramafica</i> STM10279 <sup>T</sup>	0	19.65	± 4.29b <sup>†</sup>	19.53	± 2.69b	73.52	± 16.08c
	1	21.81	± 2.25ab	22.22	± 1.70b	84.10	± 13.28bc
<i>B. novacaledonica</i> STM10272 <sup>T</sup>	0	21.17	± 2.19ab	21.45	± 1.69b	95.11	± 3.50ab
	1	25.80	± 0.64a	25.65	± 0.53a	97.44	± 3.36a
<i>P. caribensis</i> MWAP64 <sup>T</sup>	0	11.40	± 0.52c	12.34	± 0.45c	60.16	± 2.54d
	1	9.20	± 3.45c	13.27	± 2.42c	38.61	± 2.66e

<sup>†</sup>Value with the same lower case letters in each column are not significantly different at P < 0.05 using Tukey's (HSD) test or Fisher's (LSD) test when data did not follow the assumptions of a parametric test.

CHAPITRE 2

**Table S2.7** Essential nutrients content in the shoots and roots of *Tetraria comosa* (mean  $\pm$  SE n = 3).

Plant part	Treatment	Ca (g kg <sup>-1</sup> )	Mg (g kg <sup>-1</sup> )	K (g kg <sup>-1</sup> )	P (mg kg <sup>-1</sup> )
Shoot	Control	2.73 $\pm$ 0.16a <sup>†</sup>	3.22 $\pm$ 0.10a	6.12 $\pm$ 0.56a	265 $\pm$ 19a
	<i>P. caribensis</i> MWAP64 <sup>T</sup>	2.71 $\pm$ 0.18a	2.64 $\pm$ 0.06b	5.32 $\pm$ 0.24a	243 $\pm$ 9a
	<i>B. ultramafica</i> STM10279 <sup>T</sup>	2.99 $\pm$ 0.08a	2.82 $\pm$ 0.06b	5.95 $\pm$ 0.51a	239 $\pm$ 18a
	<i>B. novacaledonica</i> STM10272 <sup>T</sup>	2.84 $\pm$ 0.12a	2.93 $\pm$ 0.11ab	4.63 $\pm$ 0.20a	227 $\pm$ 6a
Root	Control	1.55 $\pm$ 0.15a	0.43 $\pm$ 0.09a	1.95 $\pm$ 0.05b	181 $\pm$ 7b
	<i>P. caribensis</i> MWAP64 <sup>T</sup>	1.29 $\pm$ 0.04a	0.35 $\pm$ 0.04a	2.51 $\pm$ 0.11a	196 $\pm$ 5ab
	<i>B. ultramafica</i> STM10279 <sup>T</sup>	1.31 $\pm$ 0.11a	0.39 $\pm$ 0.01a	2.51 $\pm$ 0.06a	190 $\pm$ 1b
	<i>B. novacaledonica</i> STM10272 <sup>T</sup>	1.40 $\pm$ 0.02a	0.34 $\pm$ 0.02a	2.54 $\pm$ 0.12a	222 $\pm$ 10a

<sup>†</sup>Value with the same lower case letters in each column for each plant part are not significantly different at P < 0.05 using Tukey's (HSD) test or Fisher's (LSD) test when data did not follow the assumptions of a parametric test.

CHAPITRE 2

**Table S2.8** Metals concentration in the shoots and roots of *Tetradlea comosa* (mean  $\pm$  SE n = 3).

Plant part	Treatment	Ni (mg kg <sup>-1</sup> )	Co (mg kg <sup>-1</sup> )	Cr (mg kg <sup>-1</sup> )	Mn (mg kg <sup>-1</sup> )
Shoot	Control	132 $\pm$ 18a <sup>†</sup>	13.5 $\pm$ 1.8a	191 $\pm$ 29ab	415 $\pm$ 29a
	<i>P. caribensis</i> MWAP64 <sup>T</sup>	159 $\pm$ 18a	11.2 $\pm$ 1.0a	242 $\pm$ 12a	380 $\pm$ 9a
	<i>B. ultramafica</i> STM10279 <sup>T</sup>	155 $\pm$ 12a	9.4 $\pm$ 1.0a	191 $\pm$ 13b	388 $\pm$ 19a
	<i>B. novacaledonica</i> STM10272 <sup>T</sup>	154 $\pm$ 10a	15.2 $\pm$ 0.5a	227 $\pm$ 16ab	468 $\pm$ 7a
Root	Control	1377 $\pm$ 111a	284 $\pm$ 26a	2168 $\pm$ 29a	3351 $\pm$ 232a
	<i>P. caribensis</i> MWAP64 <sup>T</sup>	582 $\pm$ 54c	126 $\pm$ 13b	811 $\pm$ 12b	1806 $\pm$ 150c
	<i>B. ultramafica</i> STM10279 <sup>T</sup>	766 $\pm$ 68bc	155 $\pm$ 13b	1158 $\pm$ 13b	2097 $\pm$ 159b
	<i>B. novacaledonica</i> STM10272 <sup>T</sup>	966 $\pm$ 81b	206 $\pm$ 19ab	1414 $\pm$ 16b	2698 $\pm$ 165ab

<sup>†</sup>Value with the same lower case letters in each column for each plant part are not significantly different at P < 0.05 using Tukey's (HSD) test or Fisher's (LSD) test when data did not follow the assumptions of a parametric test.

**3. Chapitre 3 Existence au sein de *Curtobacterium citreum* d'un écotype adapté aux sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie et ayant des effets positifs sur l'adaptation des plantes**

## Introduction

Les sols ultramafiques constituent un véritable modèle d'étude dans les domaines de l'évolution, l'écologie et la conservation (Kazakou *et al.*, 2008; Mengoni *et al.*, 2010; Whiting *et al.*, 2004). Pour plusieurs auteurs, ces sols fournissent un environnement unique pour étudier les mécanismes favorisant la génération et le maintien des variations intra spécifiques (Kruckeberg, 1986 ; O'Dell et Rajakaruna, 2011). La caractérisation des microorganismes présents dans ces sols permet la mise en évidence d'isolats résistants aux métaux (Dell'Amico *et al.*, 2005 ; Jourand *et al.*, 2010 ; Mengoni *et al.*, 2001 ; Stoppel et Schlegel, 1995) ou encore la description de nouvelles espèces (Guentas *et al.*, 2016). Toujours dans une perspective de caractérisation des bactéries des sols ultramafiques et de détermination des mécanismes d'adaptation mis en place, le chapitre 3 présente la caractérisation des dix souches appartenant au genre *Curtobacterium* isolées par Lagrange (2009). Une comparaison de la réponse des souches vis à vis de la contrainte métallique a été réalisée avec l'espèce la plus proche phylogénétiquement *Curtobacterium citreum* DSM20528<sup>T</sup>. La souche *C. citreum* BE a été sélectionnée parmi ces dix souches du fait de sa tolérance aux conditions édaphiques et de ses propriétés promotrices de la croissance. L'hypothèse est que les souches isolées des sols ultramafiques présentent des adaptations aux fortes concentrations en métaux qui ne sont pas retrouvées chez la souche type de l'espèce *Curtobacterium citreum* DSM20528<sup>T</sup>. L'existence d'écotypes bactériens reliés aux propriétés édaphiques a été mise en évidence au sein du genre *Curtobacterium* (Chase *et al.*, 2018, 2017). Des souches de *Curtobacterium* ont également été isolées des tissus des plantes hyperaccumulatrices de nickel : des tiges de *Alyssum bertolonii* (Barzanti *et al.*, 2007), de la rhizosphère de *Alyssum serpyllifolium* (Becerra-Castro *et al.*, 2011) et de la rhizosphère de *Thlaspi goesingense* (Idris *et al.*, 2004). Cette occurrence de bactéries appartenant au genre *Curtobacterium* dans un environnement riche en métaux laisse supposer l'existence de mécanisme d'adaptation à cette contrainte. Ce chapitre est présenté sous forme d'un article scientifique qui a été soumis à la revue *Pedobiologia*. Cette étude suggère l'existence d'un ecotype de *Curtobacterium citreum* relié à la contrainte édaphique. L'intégralité des expérimentations ont été réalisées par moi-même, avec l'aide de stagiaires que j'ai encadré, mis à part l'obtention et l'analyse du spectre infrarouge de l'EPS de *C. citreum* BE. Différents collaborateurs sont toutefois intervenus pour l'encadrement des expérimentations sur la chélation du Ni par l'EPS et sur la l'obtention et l'analyse des spectres infrarouges de l'EPS.



**New Caledonian ultramafic conditions structure *Curtobacterium citreum* into ecotype affecting positively plant adaptation**

Alexandre BOURLES<sup>a</sup>, Linda GUENTAS<sup>a,b,†</sup>, Eleftherios CHALKIADAKIS<sup>c</sup>, Clarisse MAJOREL<sup>a</sup>, Farid JUILLOT<sup>d</sup>, Yvon CAVALOC<sup>a</sup>, Valérie BURTET-SARRAMEGNA<sup>a</sup>, Valerie MEDEVIELLE<sup>a</sup>, Philippe JOURAND<sup>e</sup>, Hamid AMIR<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institut de Sciences Exactes et Appliquées, Université de la Nouvelle-Calédonie, BP R4 98851 Nouméa, Nouvelle-Calédonie

<sup>b</sup>Université de Toulon, Laboratoire MAPIEM EA 4323, SeaTech-Ecole d'ingénieurs BP 20132 83957 La Garde Cedex, France

<sup>c</sup>BIOTECAL, Marine Biotechnology Company, 152 rue Bénébig, 98800, Nouméa, Nouvelle-Calédonie

<sup>d</sup>UMR IRD 206 - Institut de Recherche pour le Développement, Centre IRD Nouméa, 101 Promenade Roger Laroque, BP A5 - 98848 Noumea Cedex

<sup>e</sup>IRD, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM UMR040), Campus International de Baillarguet, TA A-82/J, Montpellier F-34398 Cedex 05, France

<sup>†</sup>**Author for correspondence:** [linda.guentas@univ-nc.nc](mailto:linda.guentas@univ-nc.nc) (L. Guentas), Université de la Nouvelle-Calédonie, BP R4 98851 Noumea, New Caledonia.

**Abstract**

The study is focused on the characterization of ten *Curtobacterium citreum* strains, isolated from the rhizosphere of pioneer plants growing on New Caledonian ultramafic soils. Their taxonomic status was investigated using a polyphasic approach. Three strains (BE, BB and AM) were selected in term of multiple metal resistance and plant growth promoting traits, to be tested on Sorghum growing on ultramafic soil and compared with the type strain *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup>. To understand the bacterial mechanisms involved, biosorption, bioaccumulation and biofilm formation were investigated for the representative strain of the ultramafic cluster (BE) versus *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup>. The polyphasic approach confirmed that all native isolates belong to the same cluster and are *C. citreum*. The inoculation of Sorghum by the strains BE and BB significantly reduced Ni concentration in shoot ( $11 \pm 1 \text{ mg g}^{-1}$ ) compared to *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> ( $18 \pm 2 \text{ mg g}^{-1}$ , equal to control). This result is correlated with the higher Ni tolerance ( $2.8 \pm 0.3 \text{ mM}$ ) for the ultramafic strains compared to *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> ( $1.2 \pm 0.1 \text{ mM}$ ). Ni biosorption and bioaccumulation showed that BE exhibited a lower Ni concentration explained by the ability of this strain to produce exopolysaccharides involved in Ni chelation (40% of the Ni initially added). Based on these results, we suggested that ultramafic *C. citreum* strains constitute a distinct ecotype from *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup>, adapted to the edaphic constraint and playing a role in plant's adaptation to ultramafic soils.

**Key words:** *Curtobacterium citreum*; ultramafic soils; metal tolerance; exopolysaccharide; plant metal alleviation

### 3.1. Introduction

The soil system holds a huge microbial diversity where taxa are partitioned along different niches resulting from a high habitat heterogeneity (Nannipieri et al., 2003; Roesch et al., 2007). Ecotype delineation is now a well-accepted concept, which contributes significantly to the understanding of functional diversity (Anacker, 2014; O'Dell and Rajakaruna, 2011). Biogeographic distribution of soil bacterial communities is correlated not only with environmental variables (Chase et al., 2018; Yao et al., 2011) but also with soil nutrient availability (Leff et al., 2015). In metagenetic approaches, important genetic diversity generally found within the OTUs, so-called “microdiversity” (Jaspers and Overmann, 2004), probably related to ecotypes, seemed to have evolved to face the variability of environmental conditions (Chase et al., 2017). Microdiversity is based on variation in wide range of functional traits (Larkin and Martiny, 2017) and may influence partition niche space (Chase et al., 2017).

Ultramafic soils (also known as serpentinitic soils) result from weathering of ultramafic rocks (Brooks, 1987). These soils are characterized by (i) a mineral fraction largely dominated by iron oxides with high levels of metals including nickel (Ni), cobalt (Co), chromium (Cr) and manganese (Mn), (ii) low levels of major plant nutrients (N, P, K) and (iii) a strong unbalanced Ca/Mg quotient (Brooks, 1987). Ni in these soils may reach contents up to  $10\text{g kg}^{-1}$  compared with the average Ni content of  $50\text{ mg kg}^{-1}$  in cultivated soils and appears to be the most bioavailable and phytotoxic element (Echevarria et al., 2006). Regarding these peculiar edaphic characteristics, ultramafic soils provide unique settings to study the mechanisms promoting the generation and the maintenance of intraspecific variation (Anacker, 2014; Brady et al., 2005; Kazakou et al., 2008; O'Dell and Rajakaruna, 2011). Although the ultramafic soil conditions strongly restrict microbial growth, they

## CHAPITRE 3

are reported to host a large set of new metal tolerant strains and species (Abou-Shanab et al., 2003; Barzanti et al., 2007; Mengoni et al., 2010, 2001).

In New Caledonia, a tropical archipelago in the South Pacific Ocean, one third of the main island is covered by ultramafic soils. As a result, about 89% of the vascular flora growing on these soils (more than 2000 species) are endemic (Isnard et al., 2016; Morat et al., 2012) and well adapted microorganisms have been reported (Gonin et al., 2013; Guentas et al., 2016; Klonowska et al., 2012; Stoppel and Schlegel, 1995). However, ultramafic settings of New Caledonia are exploited for economically valuable ores like Ni, Co and Cr (Pascal et al., 2008) classifying this territory among the worldwide biodiversity hotspots (Myers, 2003; Myers et al., 2000). In such a context the association of metal tolerant plant growth promoting (PGP) bacteria with plants has been demonstrated to be a key parameter for ecological restoration thanks to facilitated (re)colonization of degraded soils (Etesami, 2018; Mishra et al., 2017; Tirry et al., 2018). Regarding their richness and phylogenetic diversity of bacterial species, ultramafic soils from New Caledonia have a very large potential for finding microorganisms particularly well adapted for that purpose.

In this study, we focused on bacteria belonging to the genus *Curtobacterium* (Yamada and Komagata, 1972) which are ubiquitous and mostly found associated with plants and soils (Chase et al., 2016). Members of the *Curtobacterium* genus are Gram-positive, generally motile, non sporing, obligate aerobic and catalase positive (Saddler and Guimarães, 2015). Currently, genus *Curtobacterium* count 8 species: *Curtobacterium citreum*, *C. albidum* and *luteum* (Komagata and Izuka, 1964), *C. pusillum* (Izuka and Komagata, 1965), *C. flaccumfaciens* (Collins and Jones, 1983), *C. ammoniigenes* (Aizawa et al., 2007), *C. herbarum*, (Behrendt et al., 2002) and *C. ginsengisoli*, (Kim et al., 2008). *Curtobacterium* are implicated in (i) elicitation of plant defense responses (Bulgari et al., 2011), (ii) reduction of diseases symptoms (Lacava et al., 2007) and (iii)

promotion of plant growth (Bulgari et al., 2014; Raupach and Kloepper, 2000; Sturz et al., 1997). Recently, Saddler et al. (2015) suggested that *Curtobacterium* species could play a major ecological role and Chase et al. (2018) showed the ecological flexibility in this cosmopolitan genus and the existence of ecotype depending on environmental variables.

In New Caledonia, Gonin et al. (2013) found that the rhizosphere of three tropical endemic herbaceous pioneer plants: *Tetraria arundinacea* (ex *Costularia arundinacea*) *T. pubescens* (ex *Costularia pubescens*; Larridon et al., 2018a) and *Chamaedendron nervosa* (ex *Costularia nervosa*; Larridon et al., 2018b), growing on ultramafic soils in New Caledonia is dominated by *Proteobacteria* (69%) and comprised 21 genera including *Curtobacterium* (15%) as the second main genus. Based upon the 16S rRNA gene sequence analysis of the isolates, ten strains were clustered with *Curtobacterium citreum* (Gonin et al., 2013). These authors showed specific ecological traits such as the tolerance to the extreme edaphic constraints of ultramafic soils and the production of PGP molecules (1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase, indol-3-acetic acid, NH<sub>3</sub> and siderophores) suggesting that they might be environmentally adapted to ultramafic soils and beneficial to plants (Gonin et al., 2013).

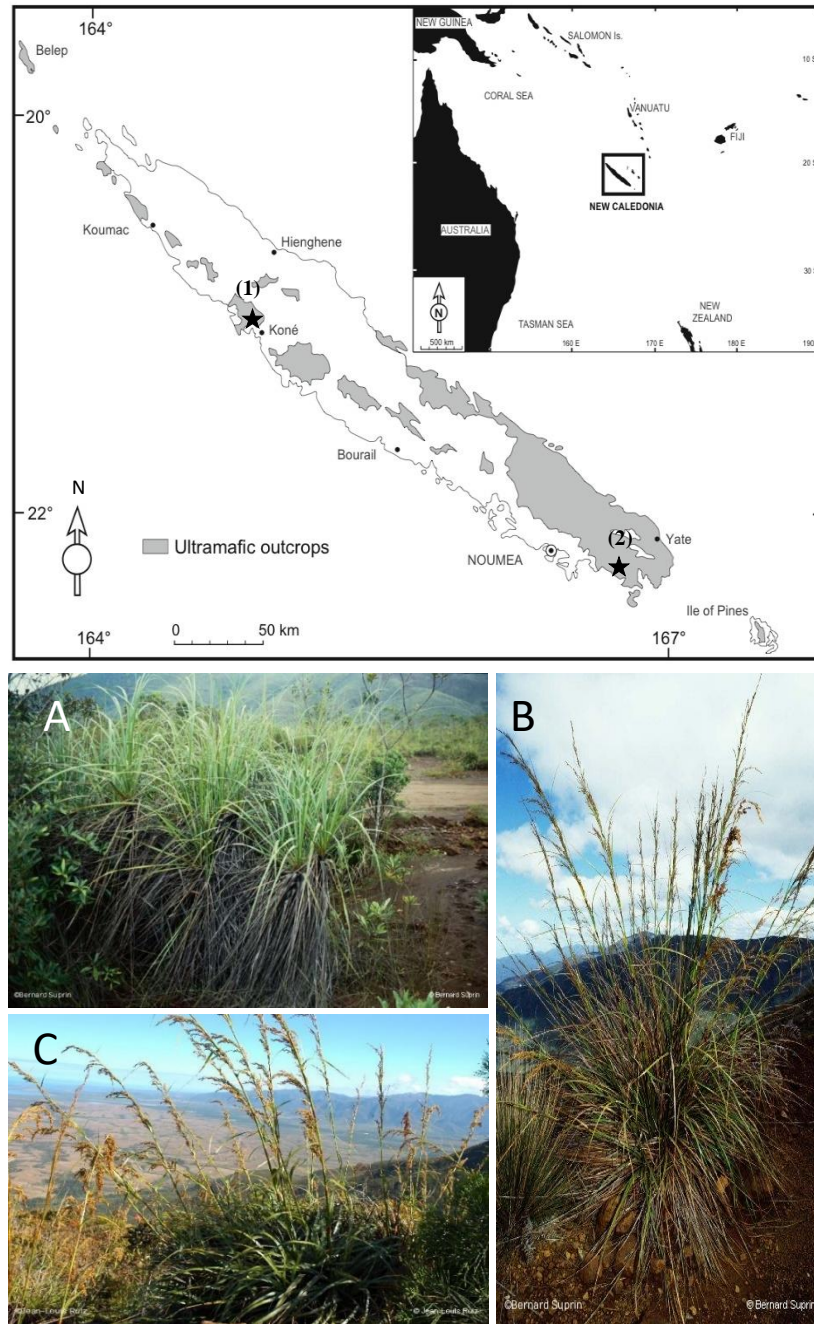
Given its importance in the rhizospheres sampled, we sought to determine whether the ultramafic conditions could structure ultramafic *Curtobacterium citreum* strains in ecotype and if this ecotype could play a particular ecological role in plant adaptation to ultramafic settings. To address these questions, firstly we investigated the taxonomic relationship between the ten ultramafic *C. citreum* strains and *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> using a polyphasic approach. Secondly, we compared the effects of three ultramafic strains (BE, BB and AM, chosen regarding their metal tolerance and PGP properties) and *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> on Sorghum growth on ultramafic soil and their metal tolerance profile.

## 3.2. Materials and Methods

### 3.2.1. Bacterial description and phenotypic characterization

The locations of the study sites are shown in Fig 3.1. These sites are located in ultramafic ligno-herbaceous maquis ecosystems where climate, geology, geomorphology and vegetation structure have been already described (Jaffré, 1992; Perrier et al., 2006a,b). The main geochemical characteristics of the soils are presented in Table S3.1. Plants were identified according to morphological features using the Noumea Herbarium (New Caledonia, Nou): *Tetragia arundinacea*, *Chamaedendron. nervosa*, and *T. pubescens* (Fig 3.1). A full botanical description of these sedges has been recently reported (Wulff et al., 2010). The plant sampling and bacterial strain isolation were performed by Gonin et al. (2013). The ten strains denomination, their relationship with the site and the host plant are reported in Table S3.2.

The ten ultramafic *C. citreum* strains were grown aerobically on Lysogenic Broth Lennox medium (LB, tryptone: 10 g L<sup>-1</sup>, yeast extract: 5 g L<sup>-1</sup>, NaCl: 5g L<sup>-1</sup>; CONDA®, Spain) and incubated at 28°C. *Curtobacterium citreum* DSM20528<sup>T</sup> (Komagata and Izuka 1964), from the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen bacterial collection (DSMZ, Braunschweig, Germany) was used as reference strains. The strains were examined for a broad range of macro- and microscopic characteristics and phenotypic properties. Activities of catalase and oxidase were determined using standard methods while additional biochemical tests were performed using the API 20NE and API ZYM kits (Bio Mérieux, Marcy l'Etoile, France). Carbon source utilization was evaluated using the GEN III MicroPlate™ (Biolog, Hayward, CA, USA) like suggested by Saddler and Guimarães (2015).



**Fig 3.1** General geographical map describing the New Caledonian archipelago with location of ultramafic massifs (in grey) and site sampled positions (stars with sites numbers). Pictures illustrating (A) *Tetraria arundinacea*; (B) *Chamaedendron nervosa* and (C) *Tetraria pubescens* in the ultramafic ecosystem (pictures from Jean-Louis Ruiz and Bernard Suprin, endemia.nc, Noumea, New Caledonia).

## CHAPITRE 3

All commercial phenotypic tests were performed according to the manufacturer's recommendations. Antibiotic sensitivity was determined following the method reported in Sheu et al. (2013). Growth at different temperatures was estimated on LB agar. Overnight culture (10  $\mu$ L) was spotted onto plates and incubated at 15, 20, 24, 28, 30, 32, 37, 40°C for 48 h. A circle of confluent growth was considered as positive (Vishnivetskaya et al., 2009). The experimentation was done in at least two independent experiments. Determination of the pH and NaCl concentration optima were performed in aerobic conditions onto microplates (Polystyren, Flat bottom well, sterile, Greiner) in LB medium (three replicates by plate). Each well was filled with 20  $\mu$ L of a one-night bacterial culture adjusted to optical density at 600 nm ( $OD_{600}$ : 0.5) and 180  $\mu$ L of broth tested. The plate was incubated at 28°C under orbital shaking conditions (125 rpm).  $OD_{600}$  was read on Dynex MRX microplate reader after an initial shake of 5 seconds. The experimentations were done in at least two independent experiments. The pH tested ranged from 4 to 10 with increment of 0.5 or 1 and NaCl concentrations tested ranged from 0 to 14% (0, 0.5, 1, 2% then increments of 2%).

### **3.2.2. Molecular characterization**

The 16S rRNA gene sequencing was performed by Gonin et al. (2013). The sequences (Table S2) were compared with sequences already deposited in the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) database using BlastN analysis (Altschul, 1997). The BlastN results were used to determine homologies with DNA sequences from other organisms. The phylogeny analyses were performed by using the online software "Phylogeny.fr" ([http://www.phylogeny.fr/simple\\_phylogeny.cgi](http://www.phylogeny.fr/simple_phylogeny.cgi)) as described by Dereeper et al. (2010, 2008). This software aligns DNA sequences using the Muscle algorithm (Edgar, 2004), achieves the



### CHAPITRE 3

phylogeny using the phylogenetic algorithm phyML (Anisimova and Gascuel, 2006; Guindon et al., 2010) and the tree rendering software TreeDyn (Chevenet et al., 2006).

Test of clonality on ultramafic *Curtobacterium* strains was performed by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Leelayuwat et al., 2000) using five 10-bases oligonucleotide primers supplied by Operon (Table S3.3). Amplification reactions of genomic DNAs were performed on 20-50 ng of purified DNA in a total volume of 25  $\mu$ L, which contained 0.8  $\mu$ M of primer, 2 mM  $MgCl_2$ , 0.2 mM dNTP and 1 U of Taq polymerase (Ampli Taq<sup>®</sup> 360 DNA Polymerase). Cycling procedure was performed on a Veriti Thermal cycler (Applied Biosystems) with the following program: Pre-denaturation of DNA at 95°C for 2 min followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 36°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min and final extension of 5 min at 72°C. PCR products were run in 1.5% gel containing ethidium bromide (0.5 g mL<sup>-1</sup>). Gels were viewed and photographed using an ultraviolet transilluminator and a CCD camera. Difference between the patterns generated was established using Phoretix 1Dprogram (TotalLab) generating a matrix of matched bands established by the presence (1) or the absence (0) of a band without considering the differences in intensity. These results were used to make a phenogram using similarity matrix based on Jaccard index with the XLstat (Addinsoft) program.

Based on ultramafic tolerance and PGP properties (Table S3.2), the strain BE was chosen as the representative strain of the ultramafic cluster. Genomic-DNA of the strain BE was extracted by Qiagen blood and tissue kit according the manufacturer's instructions. Sample was freeze dried and sent to BGI genomics (BGI-Hong-Kong NGS Lab) for whole genome sequencing by Using Illumina HiSeq 2000 sequencing platform and ANI (Average Nucleotide Identity) analysis. ANI was determined by github software (<https://github.com/widdowquinn/pyani>) comparing with

whole genome of *C. citreum* NS330, a rice seed associated bacteria (Midha et al., 2016), which is the only *C. citreum* strain with whole genome sequence available.

### 3.2.3. Effects of bacterial strains on plant growth and metal concentration

Based on ultramafic tolerance and PGP properties (Table S3.2), three ultramafic strains BE, BB and AM and *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> were inoculated on Sorghum ‘Sweet Jumbo’ (*Sorghum bicolor* (L.) Moench × *Sorghum sudanese* (Piper) Stapf. seed (Pacific Seed, Queensland, Australia). Sorghum seeds were disinfected in 2.5% sodium hypochlorite for 5 min and then washed three times in sterile different deionized water. Germination occurred on vermiculite and after one week in a growth room were available for the pot trial. The inocula for pot trial were prepared as follows. A pre-inoculum was performed as described previously. After two days, the aerobic cultures were used to inoculate 100 mL of LB media at an OD<sub>600 nm</sub> of 0.1. After three days at 28°C under orbital agitation (125 rpm), the cells were pelleted by centrifugation (SIGMA®, 2K15, 5000 g, 20 min), washed twice with sterile deionized water and then re-suspended in sterile deionized water at a bacterial concentration between 10<sup>7</sup> and 10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup> (corresponding to a 0.5 OD<sub>600</sub>), as suggested by Larcher et al. (2003). The purity and the concentration of the inoculum were carried out by counting the bacteria.

A greenhouse experiment was carried out with one-week-old seedlings. Seedlings were transplanted into one liter pots containing compost amended ultramafic soil composed with (i) 2mm sieved colluvial lateritic soil (ferralsol) sampled in Plum area in New Caledonia (22°16'59''S, 166°39'12''E) and (ii) commercial compost (4:1 v/v). Characteristics of the ferralsol are: coarse sand, 39.4%; fine sand, 22.1%; silt-clay, 37.2%; pH H<sub>2</sub>O, 5.9; pH KCl, 5.6; total C, 42.1 g kg<sup>-1</sup>; total N, 2.2 g kg<sup>-1</sup>; total P, 147 mg kg<sup>-1</sup>; available P (Mehlich), 3 mg kg<sup>-1</sup>; total Ca, 1.06 g kg<sup>-1</sup>; total Mg, 5.08 g kg<sup>-1</sup>; Ca/Mg, 0.207. Metals concentration of the ferralsol are as follows: Co, 0.87

## CHAPITRE 3

$\text{g kg}^{-1}$ ; Cr,  $22 \text{ g kg}^{-1}$ ; Fe,  $348 \text{ g kg}^{-1}$ ; Mn,  $10 \text{ g kg}^{-1}$ ; Ni,  $5.6 \text{ g kg}^{-1}$  and available metal extracted by dimethylene triaminopentaacetic acid (DTPA) are as follows:  $\text{C}_{\text{DTPA}}$ ,  $68 \text{ mg kg}^{-1}$ ;  $\text{Cr}_{\text{DTPA}}$ ,  $0.17 \text{ mg kg}^{-1}$ ;  $\text{Fe}_{\text{DTPA}}$ ,  $71 \text{ mg kg}^{-1}$ ;  $\text{Mn}_{\text{DTPA}}$ ,  $1.1 \text{ g kg}^{-1}$ ;  $\text{Ni}_{\text{DTPA}}$ ,  $130 \text{ mg kg}^{-1}$ . The composition of commercial compost is as follows: N,  $1.7 \text{ mg g}^{-1}$ ;  $\text{P}_{\text{total}}$ ,  $150 \text{ mg kg}^{-1}$ ;  $\text{P}_{\text{Olsen}}$ ,  $7 \text{ mg kg}^{-1}$ ; K,  $139 \text{ mg kg}^{-1}$  (Terreau universel, Agrofino, France). The addition of this commercial compost to the ultramafic soil for the greenhouse experiment was necessary because the growth of Sorghum plantlets is very slow in a pure lateritic soil (Gonin et al., 2013). The compost amended ultramafic soil was autoclaved three times at  $120^{\circ}\text{C}$  for 1 h, with an interval of 24 h before being used in the greenhouse experiment.

A 5 mL bacterial suspension was applied on roots of each plantlet during transplantation in 1 L pots filled with the compost amended ultramafic soil. The same volume of sterilized water was applied to a control set of plants. A set of 12 plants were inoculated per treatment. Plants were grown under greenhouse conditions as reported by Lagrange et al., (2011). After the 16 weeks of growth, the plants were harvested. Shoot and root biomasses were determined by measuring the dry mass tissue (3 days at  $60^{\circ}\text{C}$ ). The 12 samples of plant tissues were pooled by four and ground to powder. The tissue concentration of P, K, Ca, Mg, Co, Cr, Mn, and Ni were quantified by ICP OES using Varian 730-ES spectrometer at the Laboratoire des Moyens Analytiques (LAMA-US IMAGO-IRD, New Caledonia). Metals concentrations in the plant tissues were used to estimate the percentage of gain or loss in response to bacterial inoculation. The gain or loss of a metal was calculated as  $[(\text{Concentration in the tissue of inoculated plant} - \text{Concentration in the tissue of control plant}) * 100] / \text{Concentration in the tissue of control plant}$  (Gonin et al., 2013).

### 3.2.4. Test for tolerance to metal (Inhibition Concentration 50; IC<sub>50</sub>)

Determination of the metal tolerance was performed on the three ultramafic strains BE, BB and AM and *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> in aerobic conditions onto microplates (Polystyren, Flat bottom well, sterile, Greiner) in LB medium supplemented with different metal concentrations as suggested by Chien et al. (2013). To avoid metal precipitation in the assays (Hartley et al., 1997), metal salts stock solutions (1M; nickel: [NiSO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O], cobalt: [CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O], chromium: [K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>] manganese: [MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O]) were sterilized separately. Each well was filled with 20 µL of an overnight bacterial culture adjusted to optical density at 600 nm equal to one (OD<sub>600</sub>: 1, that is approximately equal to 10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup>) and 180 µL of broth tested. The plate was incubated at 28°C under shaking conditions (125 rpm) in microplate incubator reader (EPOCH 2 microplate reader; BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA). Cell growth was monitored by measuring the OD<sub>600</sub> every hour during 48 h. The experimentations were done at least twice independently. According to the metal available concentration found in New Caledonian ultramafic soils (Pasquet et al., 2018) and preliminary result of Gonin et al. (2013), metals concentration tested ranged from 0.01 to 50 mM for Co, Cr, Mn and Ni. The strain growth rate (µ) was determined for each concentration. A sigmoid dose–response curve was obtained by plotting growth rate against metal concentrations and IC<sub>50</sub> values were determined using GraphPad Prism software (version 6, GraphPad Software, La Jolla California USA).

### 3.2.5. Adsorption and bioaccumulation of Ni by *C. citreum* BE and *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup>

The metal adsorbed on the surface of the bacterial cell and the metal accumulated inside the cell were performed according to Giovanella et al. (2017) with modifications as follow. A primary culture was done by inoculating 10 mL of LB medium by one colony of the chosen bacteria and incubated for 24 h at 28°C at 125 rpm. A culture (25 mL) inoculated at OD<sub>600</sub>: 0.1 by a primary

## CHAPITRE 3

culture was incubated at 28°C, 125 rpm for 24 h then the culture was artificially contaminated by adding aseptically Ni to a final concentration of 0.5 mM, 1 mM and 5 mM (based on Ni-IC<sub>50</sub> value). After 24 h, 1 mL sample were removed from the culture and centrifuged at 13,000 rpm during 10 min (Sigma, 2-16K). The pellet was washed in sterile deionized water thrice to remove free metal ions, and finally suspended in 1 mL sterile deionized water. The OD<sub>600</sub> was read and the CFU mL<sup>-1</sup> of the inoculum was carried out. To determine Ni bioaccumulation in the cell walls and intracellular spaces of these bacteria, another aliquot (1 mL) was centrifuged at 13,000 rpm during 10 minutes, the pellet was washed with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 10mM, pH: 6.5) for Ni desorption from cells surface, centrifuged and re-suspended in 1 mL sterile deionized water. Finally, the total amount of Ni accumulated intracellularly (bioaccumulation) and adsorbed on the cells (biosorption) was determined by digesting the 1 mL aliquots in a nitric acid (70%, 1 mL) and hydrogen peroxide (30%, 0.5 mL) solution during one night at room temperature. The digested samples were then adjusted to 10 mL with deionized water and the Ni content in the final solution was quantified by ICP OES at LAMA-US. The amount of Ni accumulated intracellularly (bioaccumulation) was determined by subtracting the Ni content adsorbed on the cell walls (biosorption) from the total Ni amount.

### **3.2.6. Kinetic of biofilm formation in presence of Ni by *C. citreum* BE and *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup>**

Biofilm formation assay was performed on microtiter plate (O'Toole, 2011). Aliquots of 90 µL of LB culture medium supplemented with different concentrations of Ni [NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O] in order to reach 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 8 and 10 mM Ni concentration (based on Ni-IC<sub>50</sub> value) in wells were added to 96-well microtiter plates (sterile transparent 96 wells PS flat bottom, Greiner). Inoculation was done by adding 10 µL of a 48 h primary culture adjusted at an OD<sub>600</sub>: 1. None-inoculated LB

medium was used as the negative control and LB culture medium without metal as the positive control. After, 72 h of incubation at 28°C without agitation, the medium and non-adhered bacteria were eliminated by inversion and each well was washed three times with 100 µL of sterile deionized water. Microplates were dried at 50°C during 30 min. The cells from the adhering biofilm were dyed with 100 µL of 0.02% crystal violet (CV) solution (30 min at room temperature). The excess of dye was removed by simple inversion and the biofilm was washed three times with 100 µL of sterile deionized water at each wash. The microplates were dried at room temperature during 10 min before suspending CV by adding 200 µl of 95% ethanol solution. After 10 min orbital shaking at 125 rpm, the content of each well was transferred into a new microplate and the OD590 was read with a microplate reader (EPOCH 2 microplate reader; BioTek Instruments, Winooski, Vermont, US). The results obtained were then transformed into a quantification of biofilm formation by calculating the average absorbance of six replicates for each species and for each concentration and dividing by the average absorbance of the blank (without bacteria). The results, expressed as this ratio, can be considered as non-dependent from the non-specific coloring of the surface of the wells of the microplates by the CV. Following this procedure, biofilm formation was considered to have occurred when the ratio is greater than two (Brian-Jaisson, 2014).

### **3.2.7. Exopolysaccharides (EPS) production of *C. citreum* BE in presence of Ni and characterization by infrared spectroscopy**

EPS production was quantified after 96 h of culture at 28°C under 125 rpm orbital shaking in minimum broth medium (MB;  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 0.66 g l<sup>-1</sup>; NaCl, 50 mg L<sup>-1</sup>;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 10 mg L<sup>-1</sup>;  $\text{FeCl}_3$ , 4 mg L<sup>-1</sup>;  $\text{CaCl}_2$ , 40 mg L<sup>-1</sup>) supplemented with glucose (30g L<sup>-1</sup>). In order to produce biomass, five liters of LB were inoculated using a 48 h grown culture (800 mL; 28°C, 125 rpm orbital shaking). After 72 h of incubation (28°C, 125 rpm orbital shaking), the biomass was

recovered by centrifugation at 9,000 rpm during 25 min (Sorvall RC5C Centrifuge, DuPont) and washed once with sterile deionized water. Cells were transferred at 28°C in 500 mL of MB medium supplemented with glucose (3% w:v) with or without NiSO<sub>4</sub>. Two concentrations of NiSO<sub>4</sub> were used based on Ni-IC<sub>50</sub>: 1 and 5 mM. Three independent productions were carried out for each treatment. After 96 h, the bacteria were removed from the medium by centrifugation (25 min at 9,000 rpm). Several fraction and exopolysaccharides were purified by ultrafiltration on a 100,000 cut-off NMWCO membrane from Sartorius ®. EPS have already been reported for their chelation capacity toward metals (Gupta and Diwan, 2017). In order to measure Ni-free in medium, the first removal fraction was recovered (called “Supernatant”). Then 500 mL of distilled water were added and the second removal fraction was recovered (called “Ni sorbed by the EPS”), for quantify Ni partially chelated by EPS. Finally, a third fraction (which contain EPS) was collected, freeze dried and weighed. Concentrations of Ni in the two fractions and in EPS were analyzed by ICP OES using a Varian 730-ES spectrometer at the Laboratoire des Moyens Analytiques (LAMA-US IMAGO-IRD, New Caledonia). The infrared spectrum of the freeze-dried EPS was recorded using a Frontier™ (Perkin Elmer) Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectrometer at the Laboratoire de Spectroscopie (UMR,IMPMP, IRD, New-Caledonia). This spectrum corresponds to an average of four successive spectra that were collected in Attenuated Total Reflectance mode (diamond crystal) over the 650 cm<sup>-1</sup> - 3500 cm<sup>-1</sup> range with a 4 cm<sup>-1</sup> resolution.

### **3.2.8. Statistical analysis**

All statistical analyses were performed using R software version 3.3.1 (R Core Team, 2018). All data were analyzed with a parametric tests (t student test; one-way ANOVA, followed by the Tukey’s HSD; Honestly Significant Difference test; P < 0.05) or with non-parametric tests

(Wilcoxon sign test; Kruskal-Wallis test; followed by a Fisher LSD, Least Significant Difference test;  $P < 0.05$ ) when data did not follow the assumptions of a parametric test..

### 3.3. Results

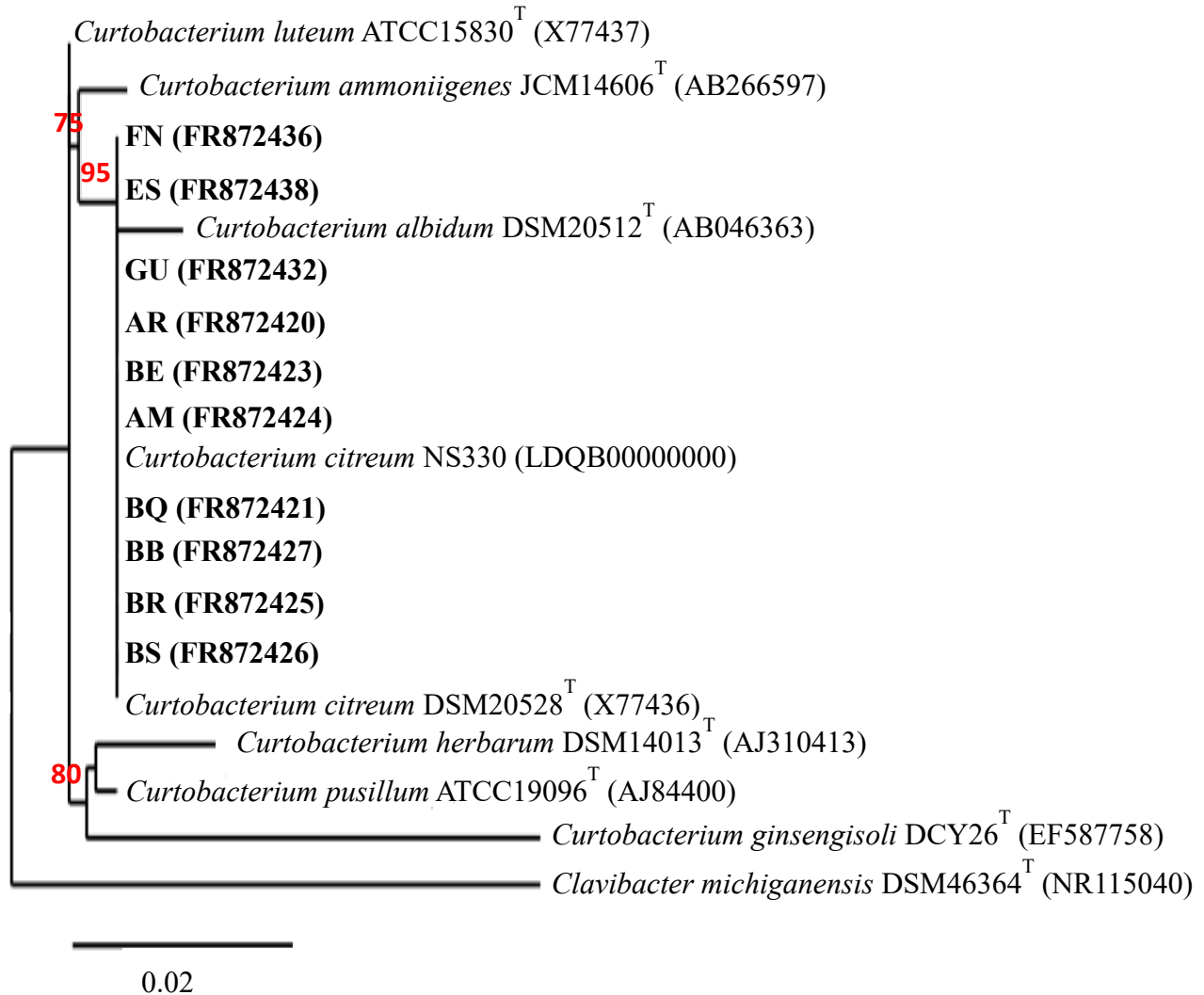
#### 3.3.1. Bacterial description and phenotypic characterization

The ten ultramafic *C. citreum* strains formed single colonies with diameter of 1-3 mm, yellow, raised and circular. They were Gram-positive and straight rods. They all grew at temperature range of 20 to 37°C, with an optimum at 28°C. Growth occurred at a minimum of 15°C for BE, AM, BR and ES strains and at a maximum of 40°C for BB, AM, BS, BR and ES strains. All strains grew optimally at 0.5% NaCl and tolerated a pH between 7 and 8. Major biochemical characteristics that differentiate ultramafic *C. citreum* strains (including the results of the 10 strains) from *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> are presented in Table S3.4. Phenotypic and biochemical traits patterns allowed distribution of the ten strains into a single cluster. Moreover, they indicated that these ultramafic *C. citreum* strains have the same biochemical profile than *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup>. Some biochemical differences could be underlined like the ability to produce gelatine hydrolase or valine arylamidase and the assimilation of N-acetyl-D-galactosamine, D-arabitol, D-Serine and L-histidine. Depending on the strain, other differences as the production of N-acetyl-β-glucosaminidase or the assimilation of propionic acid could be noticed. Concerning the antibiotic resistance, ultramafic *C. citreum* strains and *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> are sensitive to ampicillin penicillin, gentamycin, tetracyclin, streptomycin and carbenicillin. Nevertheless, differences of inhibition halo diameter could be measured (Table S3.5). Surprisingly, tests carried out in the GEN III MicroPlate<sup>TM</sup> indicated resistance to Aztreonam for ultramafic *C. citreum* strains, while *C. citreum* DSM20285<sup>T</sup> was found to be sensitive (Table S3.4).



### 3.3.2. Molecular Characterization

The combination of the RAPD profiles obtained using the markers OPH13, RAPD1, RF1, Geno 70.9 and Geno 80.7 confirmed the absence of clonality among the cluster designed by ultramafic isolates (see full RAPD profiles in FigS3.1) as shown by the dendrogram of dissimilarity percentages (FigS3.2) and the percentage of the polymorphic band (Table S3.6). The analyze of the 16S rRNA gene sequences and the phylogeny presented as a neighbor-joining tree (Fig 3.2), clearly indicated that the ten ultramafic *C. citreum* strains constitute one homogenous group belonging to *C. citreum*. Furthermore, the 16S rRNA gene sequence of ultramafic *C. citreum* strains shared a close relationship with the 16S rRNA gene sequence of *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> and *C. citreum* NS330 with 100% of similarity. Among the ten ultramafic strains, based on PGP properties and resistance to ultramafic conditions the chosen type strain was BE. Regarding the assemble result, we found that this genome size was 3,554,925 bp the GC content was 72.09%. The whole genome of *C. citreum* BE was compared to *C. citreum* NS330 strain which showed the highest 16S rRNA gene sequence similarity. We found that BE genome contained (i) 25,014 Single Nucleotides Polymorphism (SNP) including 15,501 synonymous mutations and 6,339 non-synonymous mutations, (ii) 99 insertion mutations, 99 deletion mutations, and 57 Inserts and Deletions located in the region of coding sequence (Table S3.7 and S3.8). Average nucleotide identity (ANI), determined to measure the genomic relatedness between *C. citreum* BE and *C. citreum* NS330 strains was equal to 98.9%.



**Fig 3.2** Phylogenetic relationships among *Curtobacterium* species based on the analysis of the 16S rRNA genomic sequences. Phylogenetic tree shown is a 50% majority rule consensus of the most parsimonious trees obtained with Phylogeny.fr (see ‘Materials and methods’ section). Values indicated at tree nodes are percentage values of 1000 bootstrap replicates under MP criterion using fast stepwise addition. Significant bootstrap frequencies higher than 75 % are indicated. Tree is rooted with reference of the 16S rRNA genomic sequences belonging to a closely related bacterial genus, i.e. *Clavibacter michiganensis*. The scale bar indicates the number of substitutions per site.

### 3.3.3. Effects of the bacterial strains on plant growth and metal concentration

The effects of the three ultramafic *C. citreum* strains: BE, BB, AM and *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> inoculation on Sorghum growth are presented in Table 3.1. The three ultramafic *C.*

### CHAPITRE 3

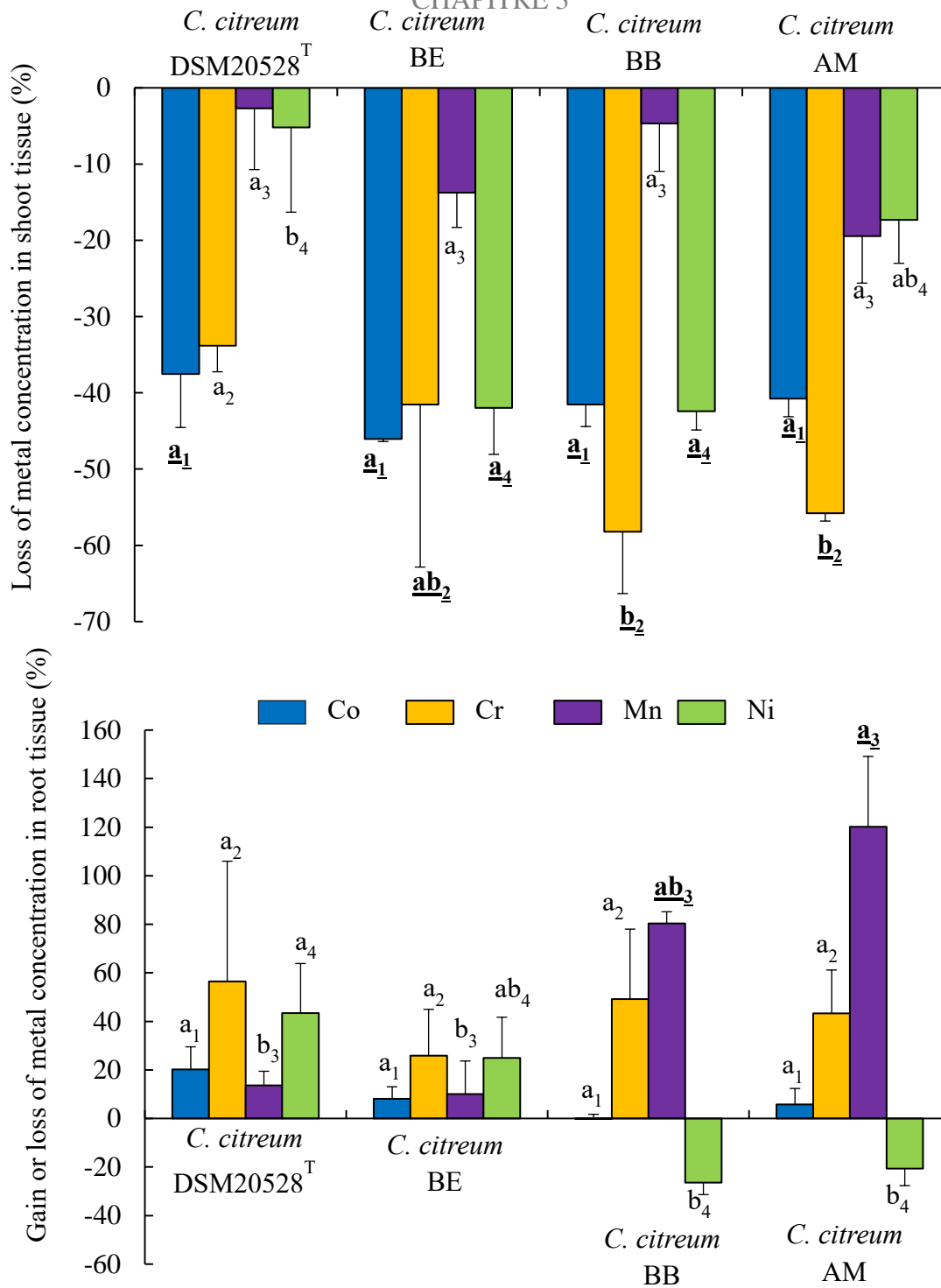
*Citrium* strains had no significant effect on plant shoot and root biomass. The inoculation of *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> have significantly reduced root of Sorghum (-40%) compared to the control.

**Table 3.1** Dry biomass of Sorghum as a function of various treatments (mean  $\pm$  SE n = 12).

Treatment	Dry shoot biomass (g)			Dry root biomass (g)		
Control	0.93	$\pm$	0.19a*	1.02	$\pm$	0.14ab
<i>C. citreum</i> DSM20528 <sup>T</sup>	0.78	$\pm$	0.16a	0.63	$\pm$	0.09c
<i>C. citreum</i> BE	0.80	$\pm$	0.17a	0.79	$\pm$	0.11bc
<i>C. citreum</i> BB	0.95	$\pm$	0.11a	1.09	$\pm$	0.10a
<i>C. citreum</i> AM	1.26	$\pm$	0.12a	1.20	$\pm$	0.12a

\* Within a column, values with different letters are significantly different according to Fisher's (LSD) test ( $P < 0.05$ ).

Ca, Mg, P, Na, K concentrations are measured but no significant differences were observed (Table S3.9). Most significant data variations were observed for the concentrations of metals in plant tissue (Fig 3.3) while full data are reported in Table S3.10. In the shoots, a significant reduction of the Co, Cr concentrations was observed with the inoculations of the three ultramafic strains (respectively in average -44% and -52%) compared to the control. The inoculation of *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> significantly reduced Cr concentration (-38%) compared to the control. No significant differences were observed for all plants inoculated in Mn concentration compared to the control. Ni concentration in shoot was significantly reduced only with the inoculation of *C. citreum* BE (- 42%) and *C. citreum* BB (- 42%) compared to the control. In the roots, the inoculations of *C. citreum* BB and *C. citreum* AM significantly enhanced Mn concentration (in average, +100%) compared to the control.



**Fig 3.3** Effect of bacterial inoculation on Co, Cr, Mn and Ni concentration in Sorghum. Relative variations of element concentration are expressed as % of element concentration in dry mass of tissues of inoculated plants compared with controls. Bars represent means, and error bars represent standard errors (n=3). Different letters above bars indicate significant differences between treatments and letters and coefficients underlined in bold indicate significant differences with controls as determined by Tukey's (HSD) test or Fisher's (LSD) test (P < 0.05). Same coefficient to letters refers to one metal analysis.

### 3.3.4. Test for tolerance to metal (Inhibition Concentration 50; IC<sub>50</sub>)

The metals IC<sub>50</sub> were determined for three ultramafic *C. citreum* strains: BE, BB, AM and *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> (Table 3.2). The results indicated that the Co-IC<sub>50</sub> values obtained for ultramafic strains (in average, 2.4 ± 0.4 mM) were significantly four times higher than those obtained for *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup>. The Cr-IC<sub>50</sub> (in average, 2.9 ± 0.4 mM) is significantly five times higher than values found for *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup>. No significant difference was observed for Mn-IC<sub>50</sub>. The Ni-IC<sub>50</sub> values obtained for *C. citreum* BE and *C. citreum* BB (in average, 2.8 ± 0.3 mM) were significantly two times higher than those obtained for *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> and *C. citreum* AM

**Table 3.2** Metals IC<sub>50</sub> for *Curtobacterium citreum* strains (mean ± SE n = 3).

Strain	IC <sub>50</sub> (mM)			
	Co	Cr	Mn	Ni
<i>C. citreum</i> DSM20528 <sup>T</sup>	0.5 ± 0.1b*	0.6 ± 0.1b	11.2 ± 1.3a	1.2 ± 0.1b
<i>C. citreum</i> BE	2.6 ± 0.3a	2.5 ± 0.3a	13.5 ± 0.7a	2.5 ± 0.2a
<i>C. citreum</i> BB	2.5 ± 0.7a	3.9 ± 0.6a	nd	3.0 ± 0.3a
<i>C. citreum</i> AM	2.1 ± 0.2a	2.4 ± 0.3a	nd	1.3 ± 0.2b

\*Within a column, values with different letters are significantly different after Fisher's (LSD) test (P < 0.05). nd: not determined

### 3.3.5. Adsorption and bioaccumulation of Ni by *C. citreum* BE and *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup>

The results on intracellular incorporation and biosorption of Ni on the cells surface for *C. citreum* BE and *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> are presented in Table 3.3. For the two strains, the fraction of Ni sorbed at the cells surface was significantly higher than that incorporated in the cells, except at 1 mM for *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> (no significant differences). For *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup>, the

### CHAPITRE 3

amounts of intracellular Ni were on average equal to 2% of initial Ni at 0.5 mM, 3.3% at 1 mM and 0.7% at 5 mM, whereas Ni sorbed on the cells surface were on average equal to 5.7% of initial Ni at 0.5 mM, 2.8% at 1 mM and 1.3% at 5 mM. For *C. citreum* BE, the amounts of intracellular Ni were on average equal to 3.2% of initial Ni at 0.5 mM, 2.8% at 1 mM and 1.3% at 5 mM, whereas Ni sorbed on the cells surface was on average equal to 0.4% of initial Ni at 0.5 mM, 0.6% at 1 mM and 0.5% at 5 mM.

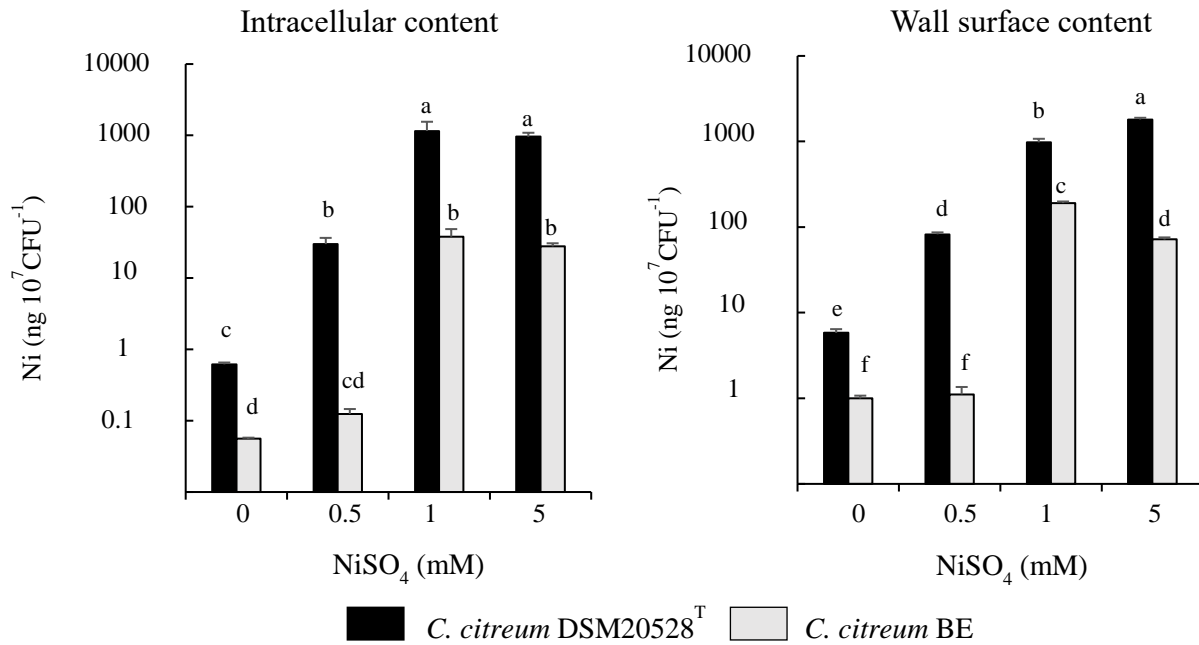
**Table 3.3** Intracellular Ni and wall surface Ni ( $\mu\text{M}$ ) for *Curtobacterium citreum* BE and *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> (mean  $\pm$  SE n = 3).

Ni (mM)	Compartment	<i>C. citreum</i> DSM20528 <sup>T</sup>		<i>C. citreum</i> BE	
		Ni content ( $\mu\text{M}$ )	% <sup>‡</sup>	Ni content ( $\mu\text{M}$ )	%
0	Intracellular	0.4 $\pm$ 0.0d*	-	0.4 $\pm$ 0.0f	-
	Cell surface	4.2 $\pm$ 0.4cd	-	7.7 $\pm$ 0.6d	-
0.5	Intracellular	10.4 $\pm$ 2.3c	(2.1)	1.8 $\pm$ 0.3e	(0.4)
	Cell surface	28.5 $\pm$ 1.5b	(5.7)	15.8 $\pm$ 3.5c	(3.2)
1	Intracellular	32.7 $\pm$ 11.4b	(3.3)	5.5 $\pm$ 1.5d	(0.6)
	Cell surface	27.8 $\pm$ 2.8b	(2.8)	27.5 $\pm$ 1.2b	(2.8)
5	Intracellular	33.7 $\pm$ 4.6b	(0.7)	25.9 $\pm$ 2.7b	(0.5)
	Cell surface	63.7 $\pm$ 3.0a	(1.3)	66.9 $\pm$ 3.7a	(1.3)

\* Within a column, values with different letters are significantly different after Fisher's (LSD) test ( $P < 0.05$ ). <sup>‡</sup>Values in parentheses correspond to the percentage of nickel found in relation to initial Ni

In order to compare the two strains, biosorption of Ni on the cell surface and intracellular compartment were expressed in  $\mu\text{M}$  ( $10^7\text{CFU}$ )<sup>-1</sup>. The comparison between *C. citreum* BE and *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> is shown in Fig 3.4 and the data used are reported in Table S3.11. The fraction

of Ni sorbed on the cells surface and inside the cells were significantly lower for *C. citreum* BE than for *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup>. For the 0.5 mM initial Ni concentration, the mean intracellular Ni content in *C. citreum* BE (i.e.  $0.1 \pm 0.0$  ng ( $10^7$ CFU)<sup>-1</sup>) was significantly 250 times lower than that in *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup>. For the 1 mM initial Ni concentration, the mean intracellular Ni content in *C. citreum* BE (i.e.  $38 \pm 10.5$  ng ( $10^7$ CFU)<sup>-1</sup>) was significantly 30 times lower than that in *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup>. Finally, for the 5 mM initial Ni concentration, the mean intracellular Ni content in *C. citreum* BE (i.e.  $27.8 \pm 2.9$  ng ( $10^7$ CFU)<sup>-1</sup> in average) was significantly 35 times lower than that in *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup>.



**Fig 3.4** Ni intracellular content and wall surface content of *Curtobacterium citreum* BE and *C. citreum* DSM 20528<sup>T</sup> after growth in medium with different concentration of Ni. Bars represent means, and error bars represent errors (n=3). Different letters above bars indicate significant differences between treatments s determined by Fisher’s (LSD) test (P < 0.05).

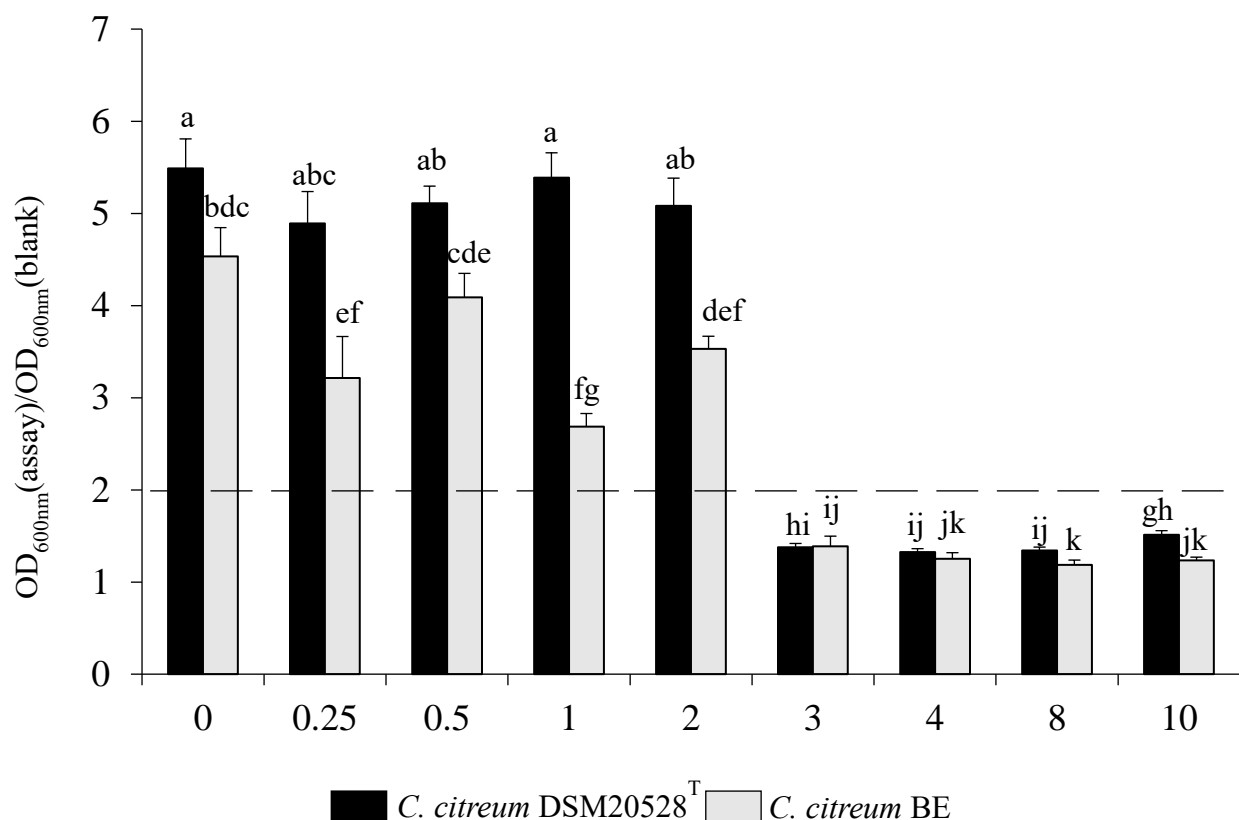
For each Ni concentration tested, the Ni contents on the cells surface were significantly lower for *C. citreum* BE than for *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup>. For the 0.5 mM initial Ni concentration,

the mean Ni content on the cells surface was significantly 74 times lower for *C. citreum* BE (i.e.  $1.1 \pm 0.2 \text{ ng } (10^7\text{CFU})^{-1}$ ) than for *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup>. For the 1 mM initial Ni concentration, the mean Ni content on the cells surface of *C. citreum* BE (i.e.  $190.9 \pm 8.3 \text{ ng } (10^7\text{CFU})^{-1}$ ) was significantly 5 times lower than that on the cells surface of *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup>. Finally, for the 5 mM initial Ni concentration, the mean Ni content on the cells surface of *C. citreum* BE (i.e.  $71.8 \pm 3.9 \text{ ng } (10^7\text{CFU})^{-1}$ ) was significantly 25 times lower than that on the cells surface of *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup>.

### **3.3.6. Kinetic of biofilm formation in presence of Ni by *C. citreum* BE and *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup>**

Biofilm formation by the two *C. citreum* strains studied as a function of Ni concentration (0 to 10 mM) are presented in Fig.3.5 and the data used are reported in Table S3.12. In comparison with the control, Ni addition had no significant effect on the biofilm formation capacity of *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> before the concentration of 3mM was reached. On the opposite, the biofilm formation capacity of *C. citreum* BE decreased with increasing concentration of Ni. Comparison between the two strains indicated that the amount of biofilm formed by *C. citreum* BE was significantly lower than that formed by *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup>. The differences found range from 1.2 times less at 0 mM, 0.5 mM and 2 mM initial Ni concentrations, up to 2 times less at 1 mM initial Ni concentration.





**Fig 3.5** Biofilm formation of *Curtobacterium citreum* DSM20528<sup>T</sup> in black and *C. citreum* BE in grey at 72 h in relation to Ni concentration. Adherent bacteria are stained with a 0.02% crystal violet solution. The results are expressed as the ratio of the absorbance of the assay to the absorbance of the blank (without bacteria). Biofilm production occurs when the ratio is greater than two (dotted line on the graphic). Bars represent means, and error bars represent standard errors (n=6). Different letters above bars indicate significant differences between treatments s determined by Fisher's (LSD) test (P < 0.05).

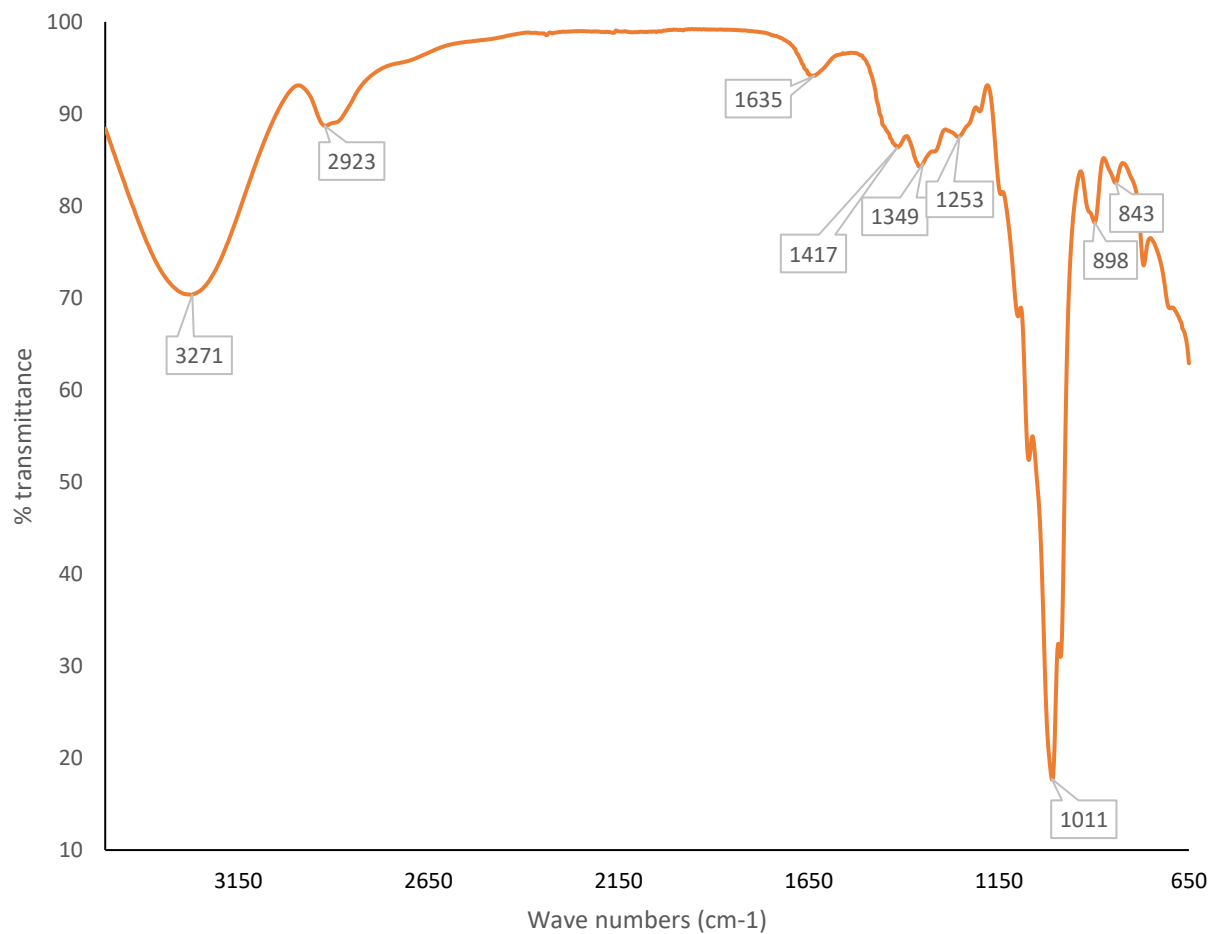
### 3.3.7. EPS production of *C. citreum* BE in presence of Ni and characterization by infrared spectroscopy

FT-IR spectroscopy was employed to detect the main functional groups in the exopolymeric substances produced by *C. citreum* BE. The FT-IR spectrum obtained (Fig 3.6) shows a broad and large absorbance band centered at 3271 cm<sup>-1</sup> that was assigned to the stretch vibration of the hydroxyl groups or hydrogen bonds existing in all polymers. The bands in the regions of 2923 cm<sup>-1</sup> and 1200 cm<sup>-1</sup> to 1400 cm<sup>-1</sup> could be assigned to weak CH-stretching of methylene (-CH<sub>2</sub>) and methyl (-CH<sub>3</sub>) groups. The band at 1635 cm<sup>-1</sup> was assigned to the stretching modes of C=O bonds.

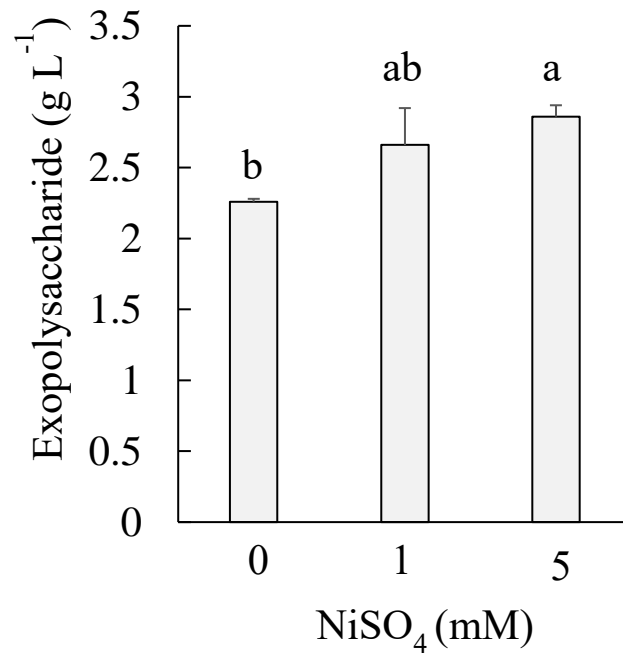
## CHAPITRE 3

The peak at  $1249\text{ cm}^{-1}$  was assigned to the deformation vibration of C=O bonds and the peak at  $1011\text{ cm}^{-1}$  was assigned to the stretching modes of C-O bonds from intra-molecular C-O-C ring. This latter peak thus strongly suggests that the monosaccharides in the EPS have pyranose rings. In addition, the two weak peaks near  $843\text{ cm}^{-1}$  and  $898\text{ cm}^{-1}$  could be respectively assigned to the two  $\alpha$ - and  $\beta$ -ends of carbon-glucoside bonds.

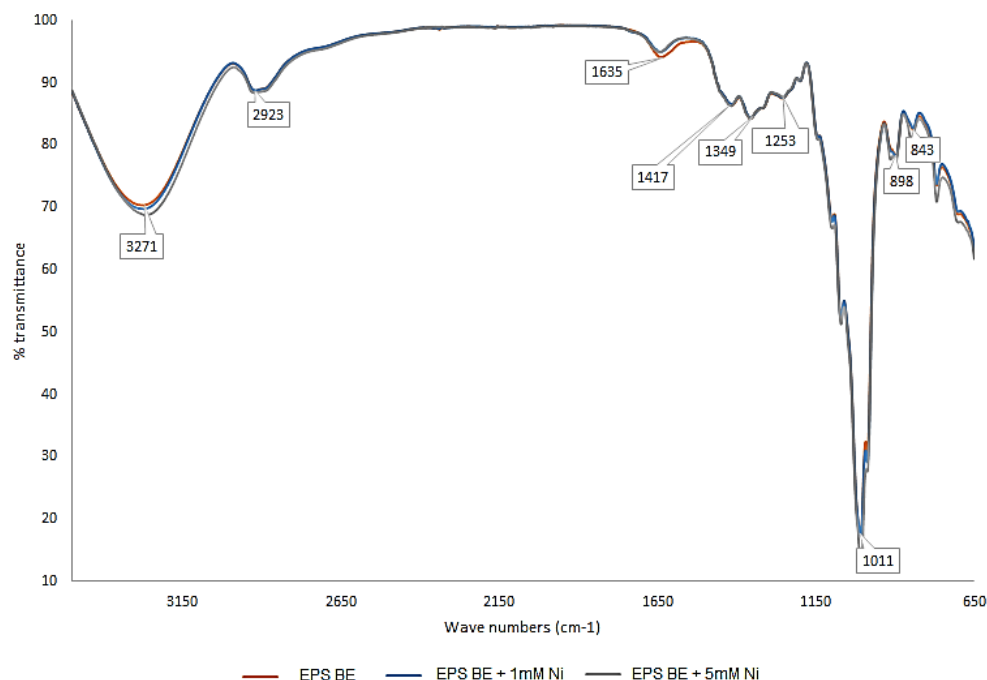
The EPS production by *C. citreum* BE in a medium supplemented or not with Ni are shown in Fig 3.7, and corresponding data are displayed in Table S3.13. The presence of Ni significantly increased the production of EPS (i.e. with a value of  $2.9 \pm 0.1\text{ g l}^{-1}$ , 1.3 times more EPS was produced at a 5 mM initial Ni concentration compared to the control). We quantified the Ni concentration in the medium, as well as the fraction of Ni sorbed by the EPS and that fully chelated by the EPS (Table S13). The results given in Table 3.4 indicated that the EPS produced by *C. citreum* BE was able to chelate Ni. For the 1 mM initial Ni concentration,  $9.2 \pm 0.7\text{ mg Ni}$  were found to be sorbed by the EPS and  $3.5 \pm 0.4\text{ mg Ni}$  were found to be chelated (i.e. respectively, 32% and 12% of initial Ni). For the 5 mM initial Ni concentration,  $45.1 \pm 1\text{ mg Ni}$  were found sorbed by the EPS and  $14.2 \pm 0.7\text{ mg Ni}$  were found chelated (i.e. respectively, 36% and 11% of initial Ni). The functional groups of the *C. citreum* BE EPS involved in the Ni chelation were investigated by FT-IR. As shown in the Fig.8 and Fig.S3, there were shifts in wave numbers of dominant peaks at  $3271\text{ cm}^{-1}$ ,  $1637\text{ cm}^{-1}$  and  $1011\text{ cm}^{-1}$ , which corresponded to the function groups of O-H, C=O and C-O-C, respectively.



**Fig 3.6** Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectrum of the *Curtobacterium citreum* BE EPS in the 650-3500 cm<sup>-1</sup> range showing common absorbance bands, which are characteristic for polysaccharides.



**Fig 3.7** Production of exopolysaccharide by *Curtobacterium citreum* BE in relation to Ni concentration. Bars represent means, and error bars represent standard errors (n=3). Different letters above bars indicate significant differences between treatments as determined by Fisher's (LSD) test ( $P < 0.05$ ).



**Fig 3.8** Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectrum of the *Curtobacterium citreum* BE EPS in the 650-3500 cm<sup>-1</sup> range purified by ultrafiltration after cultivation of the bacteria cells in medium supplemented or not with NiSO<sub>4</sub> (1mM, 5mM).

**Table 3.4** Contents of Ni in the supernatant, adsorbed by the EPS and chelated in EPS of *Curtobacterium citreum* BE, as a function of Ni concentration (mean ± SE n = 3).

Ni	Ni in supernatant		Ni sorbed by the EPS		Ni in the EPS	
	Ni content (mg)	% <sup>‡</sup>	Ni content (mg)	%	Ni content (mg)	(%)
0 mM	0.0 ± 0.0a*	-	0.0 ± 0.0a	-	0.0 ± 0.0a	-
1 mM (29 mg of NiSO <sub>4</sub> )	12.2 ± 0.7a	(42.1)	9.2 ± 0.7b	(31.8)	3.5 ± 0.4c	(12.2)
5 mM (125 mg of NiSO <sub>4</sub> )	58.7 ± 4.1a	(47.0)	45.1 ± 1.0b	(36.1)	14.2 ± 0.7c	(11.4)

\*Within a line, values with different letters are significantly different after Tukey's (HSD) test (P < 0.05). <sup>‡</sup>Values in parentheses correspond to the percentage of nickel found in relation to initial Ni.

### 3.4. Discussion

The analyze of the 16SrRNA sequences and the phylogeny of 10 ultramafic *C. citreum* strains isolated from the rhizosphere of *T. pubescens*, *T. arundinacea* and *C. nervosa* in New Caledonia clearly confirmed that all belong to the *Curtobacterium citreum* species with 100% similarities with the sequences of *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> and *C. citreum* NS330. The characterization of the ten strains based on microbiological and biochemical approaches showed that they belong to the same cluster, which differs from the type strain *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> type strain by three biochemical features. The GC mol% of *C. citreum* BE (72.09%) is comprised in the range of those described for *C. citreum* species (70.5 to 75.2 mol %) (Saddler and Guimarães, 2015) and identical to the GC mol % of *C. citreum* NS330. The ANI calculated between *C. citreum* BE and *C. citreum* NS330, showed a high identity between the two strains with an ANI value of 98.9%. These results confirmed clearly that the ten strains belong to *C. citreum* species. *Curtobacterium citreum* was first isolated from rice in China (Komagata and Izuka, 1964), then isolated from potato (Sturz and Matheson, 1996), red clover (Sturz et al., 1997), rice (Elbeltagy et al., 2000; Mano et al., 2007), Sorghum (de Fretes et al., 2018) or directly from soil (Roane and Kellogg, 1996). *C. citreum* strains are found in shoot tissues (Mano et al., 2007), in roots (Sturz et al., 1997) or free in the rhizosphere (Roane and Kellogg, 1996; Román-Ponce et al., 2017). Since the phenotypic diversity is highly correlated with the diversity in the genotype, to analyze the adaptive characteristics of *C. citreum* BE, we investigated SNP and small fragments Insert or Deletion between *C. citreum* BE and *C. citreum* NS330. For that purpose, 25,014 coding SNPs have been detected between the two genomes including 6,339 non-synonymous mutations, which are likely to have a stronger effect on *C. citreum* BE fitness to the ultramafic settings. Moreover, we found 99 insertions- mutations, 99 deletions- mutations, and 57 Inserts and deletions located in

the region of coding sequence. In ultramafic soils, it has been shown that the mineral composition is responsible of the structure of microbial communities (Bordez et al., 2016; Gourmelon et al., 2016) and the development of particular and adapted species (Guentas et al., 2016; Klonowska et al., 2012; Mengoni et al., 2010). We thus tried to determine if the ultramafic edaphic conditions structure *C. citreum* in ecotype and we asked whether the genomic differences between *C. citreum* BE and the type strain *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> correspond to phenotypic adaptation to ultramafic settings and may be involved in the adaptation of plants to metallic stress.

Although the majority of *Curtobacterium* are associated with plants and play a crucial role in the degradation of organic matter within litter communities (Chase et al., 2016; Ventorino et al., 2015), only few studies have dealt with the effects of inoculation with *Curtobacterium* on plant growth adaptation. Raupach and Kloepper (2000) showed that *C. flaccumfaciens* strain ME1 could significantly promote cucumber growth compared to the control. More recently, Roman Ponce et al. (2017) reported an increase of growth and germination of *Brassica nigra* seeds after the inoculation of a *Curtobacterium* strain. Our results indicate that the three ultramafic *C. citreum* strains did not influence positively Sorghum growth probably in relation to the lack of stimulation effect on the plant nutrition. However, inoculation of *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> has reduced Sorghum root biomass. Sturz et al. (1997) demonstrated on *Trifolium pretense* that a strain of *C. citreum* could significantly reduce the root biomass. Significant diminution of the Co, Cr and Ni concentrations (with the exception of *C. citreum* AM for Ni) was observed in the Sorghum shoots inoculated with ultramafic *C. citreum* strains compared to the control type strain. As no significant differences in Co, Cr and Ni were found in roots of all treatments we suggest that ultramafic *C. citreum* strains are able to reduce metal translocation from roots to shoot. A similar result was observed by Janssen et al. (2015) who showed that a *Curtobacterium* strain was able to reduce Cd,

## CHAPITRE 3

Zn and Pb translocation to the shoots of *Salix viminalis*. According to Etesami (2018), we have investigated the bacterial metal resistant mechanisms in order to understand the observed metal alleviation.

In our experiments, the three ultramafic strains of *C. citreum* showed a higher metal tolerance than *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup>. These results are in agreement with the previous study conducted by Gonin et al. (2013) and with other studies that have shown that ultramafic soils are known to hold bacterial communities more or less adapted to metal stress (Abou-Shanab et al., 2007; Mengoni et al., 2010). Moreover, *Curtobacterium* strains have been found in ultramafic soils, particularly in association with Ni-hyperaccumulator plants: *Alyssum bertolonii* (Barzanti et al., 2007), *Alyssum serpyllifolium* (Becerra-Castro et al., 2011a,b) and *Thlaspi goesingense* (Idris et al., 2004). For example, Barzanti et al. (2007) reported that some *Curtobacterium* strains are able to tolerate up to 15mM Ni and 10 mM Cr. Finally, our results are in agreement with the existence of a correlation between the tolerance of bacteria to metals and the decrease of metal concentration in the plant as suggested by Etesami (2018).

Regarding results of bacterial inoculation on Sorghum and IC<sub>50</sub> profile, a focus was carried out on the mechanisms involved in Ni tolerance in *C. citreum* BE in comparison with *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> by assaying the two strains for two functional traits: Ni biosorption and bioaccumulation and biofilm formation. The results on Ni biosorption and intracellular bioaccumulation revealed a preferential sorption on the cell surface for the two strains. Li et al. (2018) have shown that the biosorption of Cd (II) was more efficient than the bioaccumulation in *Curtobacterium* sp. GX\_31. In our study, between 0.35 and 3.27% of initial Ni was found in the intracellular space for both *C. citreum* strains. These results are in agreement with the study of Li et al. (2018), which showed that between 0.97 and 3.93% of initial Cd was internalized in the cells



## CHAPITRE 3

of *Curtobacterium* sp. GX\_31. These results suggest that one of the tolerance mechanisms to metals used is to limit their diffusion across the cell envelope, as already described by Bruins et al. (2000). In our study, the two studied strains were found to be able to produce biofilm without Ni pressure. However, for Ni concentrations ranging from 0.25 to 2 mM, the biofilm production by *C. citreum* BE was significantly lower compared to that of *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup>. This result could explain the higher amounts of Ni found on the cell surface of *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup>.

The small amounts of Ni found in the cells and on the cell surface for both strains suggest the existence of extracellular sequestration mechanisms. Extracellular sequestration has already been reported as a mechanism of Ni tolerance for *Curtobacterium* strains (Becerra-Castro et al., 2011b; Li et al., 2018). One of the mechanisms used by bacteria for metal immobilization in soil is the excretion of EPS. Indeed, these EPS are able to bind significant amounts of metals thanks to anionic groups such as carbonyl, carboxyl and hydroxyl groups (Ayangbenro and Babalola, 2017; Etesami, 2018; Gupta and Diwan, 2017). In order to highlight this mechanism, the production of EPS by *C. citreum* BE was carried out. Our results indicate that *C. citreum* BE produced EPS, and to our knowledge, it is the first EPS production reported for the *Curtobacterium* genus. The FT-IR peaks found suggest that the EPS is a polysaccharide containing pyranose (Liu et al., 2016; Su et al., 2013). Thus, carbohydrates are the main components in this EPS. The pyranose that are expected to represent a major component of the polysaccharides are considered to have a significant metal binding capacity (Etesami, 2018; Gupta and Diwan, 2017). The adsorption of metals by EPS is energy dependent and can be caused by interaction between metal cations and functional groups of EPS (Zhang et al., 2017). In comparing *C. citreum* BE EPS and metal-laden EPS, shifts in wave numbers of dominant peaks, which represented the functional groups containing oxygen. Indeed, the O of polysaccharides are known to complex with metal in adsorption process which lead to

change their vibration frequency and intensity (Guibaud et al., 2005). So based on this study, the O-H, C=O and COC groups in the *C. citreum* BE EPS played an important role in the interaction with Ni. Our IRTF results thus suggest that the *C. citreum* BE produces EPS to face the edaphic conditions when it is grown in a Ni enriched medium, or more generally in ultramafic soils. Such a behavior has already been reported for *Pseudomonas* sp. EJOA facing Ni toxicity (Chien et al., 2013) or for *Xylella fastidiosa* when facing Zn toxicity (Navarrete and De La Fuente, 2014). Moreover, our results also indicate that the EPS produced by *C. citreum* BE is able to chelate Ni. The amounts of Ni chelated (i.e. 2.65- 9.93 mg g<sup>-1</sup>) are in agreement with Pulsawat et al. (2003), who showed that the EPS produced by *Rhizobium etli* was able to chelate Mn at similar concentrations (i.e. 20 – 60 mg g<sup>-1</sup>). Although we did not carry out the same experiment for *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup>, metals complexation by the EPS from *C. citreum* BE is likely to represent an important adaptation mechanism for bacteria growing on lateritic soils that are characterized by a strong metallic pressure.

### 3.5. Conclusions

The different approaches tested to characterize the ultramafic *C. citreum* strains indicated that these strains are clearly different from *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup>. The taxonomy, the interactions with Sorghum and the metal tolerance suggest the existence of an ecotype related to ultramafic soils. Their ability to reduce shoot metal concentration supports the hypothesis that these ultramafic *C. citreum* strains play a role in the adaptation of plants to the edaphic constraints of ultramafic soils. The ability of *C. citreum* BE to neutralize Ni by EPS production could be of interest for the ecological restoration of land degraded by mining activity. Actually, *Curtobacterium* strains are found in association with AMF and their co-inoculation enhanced plant growth (Long et al., 2017). Knowing that native AMF increased plant growth in New Caledonian ultramafic soil (Amir et al.,

2019, Lagrange et al., 2013) and that germination of AMF spore could be inhibited by high levels of Ni (Amir et al., 2008) the co-inoculation of AMF and *Curtobacterium* strains native from New Caledonian ultramafic soils might constitute a promising way to improve plant growth and metal tolerance on degraded ultramafic soils.

### **3.6. Conflicts of interest**

No potential conflict of interest was reported by the authors.

### **3.7. Funding**

This work was supported by the South Province of New Caledonia (Prix d' Encouragement à la Recherche : PhD Grant).

### **3.8. Acknowledgments**

We are very grateful to the South Province of New Caledonia providing the PhD grant of Alexandre Bourles. We are also grateful to LAMA laboratory for chemical analysis (LAMA-US IMAGO-IRD, New Caledonia). Thanks to G. Toubon, A. Coursan and A. Dumas for the technical support.

### 3.9. References

- Abou-Shanab, R.A.I., van Berkum, P., Angle, J.S., 2007. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere* 68, 360–367. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.051>
- Abou-Shanab, R.I., Delorme, T. a, Angle, J.S., Chaney, R.L., Ghanem, K., Moawad, H., Ghazlan, H. a, 2003. Phenotypic Characterization of Microbes in the Rhizosphere of *Alyssum murale*. *Int. J. Phytoremediation* 5, 367–379. <https://doi.org/10.1080/16226510390268766>
- Aizawa, T., Ve, N.B., Kimoto, K. -i., Iwabuchi, N., Sumida, H., Hasegawa, I., Sasaki, S., Tamura, T., Kudo, T., Suzuki, K. -i., Nakajima, M., Sunairi, M., 2007. *Curtobacterium ammoniigenes* sp. nov., an ammonia-producing bacterium isolated from plants inhabiting acidic swamps in actual acid sulfate soil areas of Vietnam. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1447–1452. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64731-0>
- Altschul, S., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Amir, H., Cavaloc, Y., Laurent, A., Pagand, P., Gunkel, P., Lemestre, M., Médevielle, V., Pain, A., McCoy, S., 2019. Arbuscular mycorrhizal fungi and sewage sludge enhance growth and adaptation of *Metrosideros laurifolia* on ultramafic soil in New Caledonia: A field experiment. *Sci. Total Environ.* 651, 334–343. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.153>
- Amir, H., Jasper, D.A., Abbott, L.K., 2008. Tolerance and induction of tolerance to Ni of arbuscular mycorrhizal fungi from New Caledonian ultramafic soils. *Mycorrhiza* 19, 1–6. <https://doi.org/10.1007/s00572-008-0197-y>
- Anacker, B.L., 2014. The nature of serpentine endemism. *Am. J. Bot.* 101, 219–224. <https://doi.org/10.3732/ajb.1300349>
- Anisimova, M., Gascuel, O., 2006. Approximate likelihood ratio test for branches: a fast, accurate and powerful alternative. *Syst. Biol.* 55, 539–552. <https://doi.org/10.1080/10635150600755453>
- Ayangbenro, A., Babalola, O., 2017. A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14, 94. <https://doi.org/10.3390/ijerph14010094>
- Barzanti, R., Ozino, F., Bazzicalupo, M., Gabbrielli, R., Galardi, F., Gonnelli, C., Mengoni, A., 2007. Isolation and Characterization of Endophytic Bacteria from the Nickel Hyperaccumulator Plant *Alyssum bertolonii*. *Microb. Ecol.* 53, 306–316. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9164-3>
- Becerra-Castro, C., Kidd, P.S., Prieto-Fernández, Á., Weyens, N., Acea, M.-J., Vangronsveld, J., 2011a. Endophytic and rhizoplane bacteria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: isolation and characterisation. *Plant Soil* 340, 413–433. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0613-x>

- Becerra-Castro, C., Prieto-Fernández, A., Álvarez-Lopez, V., Monterroso, C., Cabello-Conejo, M.I., Acea, M.J., Kidd, P.S., 2011b. Nickel Solubilizing Capacity and Characterization of Rhizobacteria Isolated from Hyperaccumulating and Non-Hyperaccumulating Subspecies of *Alyssum Serpyllifolium*. *Int. J. Phytoremediation* 13, 229–244. <https://doi.org/10.1080/15226514.2011.568545>
- Behrendt, U., Ulrich, A., Schumann, P., Naumann, D., Suzuki, K., 2002. Diversity of grass-associated Microbacteriaceae isolated from the phyllosphere and litter layer after mulching the sward; polyphasic characterization of *Subtercola pratensis* sp. nov., *Curtobacterium herbarum* sp. nov. and *Plantibacter flavus* gen. nov., sp. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1441–1454. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02138-0>
- Bordez, L., Jourand, P., Ducouso, M., Carriconde, F., Cavaloc, Y., Santini, S., Claverie, J.M., Wantiez, L., Leveau, A., Amir, H., 2016. Distribution patterns of microbial communities in ultramafic landscape: a metagenetic approach highlights the strong relationships between diversity and environmental traits. *Mol. Ecol.* 25, 2258–2272. <https://doi.org/10.1111/mec.13621>
- Brady, K.U., Kruckeberg, A.R., Bradshaw Jr., H.D., 2005. Evolutionary Ecology of Plant Adaptation to Serpentine Soils. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36, 243–266. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.35.021103.105730>
- Brian-Jaisson, F., 2014. Identification et caractérisation des exopolymères de biofilms de bactéries marines. University of Toulon.
- Brooks, R.R., 1987. Serpentine and its vegetation: a multidisciplinary approach, Dioscoride. ed. Portland, OR.
- Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme, F.W., 2000. Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 198–207. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1860>
- Bulgari, D., Casati, P., Crepaldi, P., Daffonchio, D., Quaglino, F., Brusetti, L., Bianco, P.A., 2011. Restructuring of endophytic bacterial communities in grapevine yellows-diseased and recovered *Vitis vinifera* L. *Plants. Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5018–5022. <https://doi.org/10.1128/AEM.00051-11>
- Bulgari, D., Minio, A., Casati, P., Quaglino, F., Delledonne, M., Bianco, P.A., 2014. *Curtobacterium* sp. Genome Sequencing Underlines Plant Growth Promotion-Related Traits. *Genome Announc.* 2, 10–11. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00592-14>
- Chase, A.B., Arevalo, P., Polz, M.F., Berlemont, R., Martiny, J.B.H., 2016. Evidence for Ecological Flexibility in the Cosmopolitan Genus *Curtobacterium*. *Front. Microbiol.* 7, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01874>
- Chase, A.B., Gomez-Lunar, Z., Lopez, A.E., Li, J., Allison, S.D., Martiny, A.C., Martiny, J.B.H., 2018. Emergence of soil bacterial ecotypes along a climate gradient. *Environ. Microbiol.* 20, 4112–4126. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14405>
- Chase, A.B., Karaoz, U., Brodie, E.L., Gomez-Lunar, Z., Martiny, A.C., Martiny, J.B.H., 2017. Microdiversity of an Abundant Terrestrial Bacterium Encompasses Extensive Variation in Ecologically Relevant Traits. *MBio* 8, 1–11. <https://doi.org/10.1128/mBio.01809-17>

- Chevenet, F., Brun, C., Bañuls, A.-L., Jacq, B., Christen, R., 2006. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics* 7, 439. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-439>
- Chien, C.C., Lin, B.C., Wu, C.H., 2013. Biofilm formation and heavy metal resistance by an environmental *Pseudomonas* sp. *Biochem. Eng. J.* 78, 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.01.014>
- Collins, M.D., Jones, D., 1983. Reclassification of *Corynebacterium flaccumfaciens*, *Corynebacterium betae*, *Corynebacterium oortii* and *Corynebacterium poinsettiae* in the genus *Curtobacterium*, as *Curtobacterium flaccumfaciens* comb. nov. *Microbiology* 129, 3545–3548. <https://doi.org/10.1099/00221287-129-11-3545>
- de Fretes, C.E., Suryani, R., Asih Purwestri, Y., Nuringtyas, T.R., Widiyanto, D., 2018. Diversity of Endophytic Bacteria in Sweet Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) and Their Potential for Promoting Plant Growth. *Indian J. Sci. Technol.* 11, 1–10. <https://doi.org/10.17485/ijst/2018/v11i11/120283>
- Dereeper, A., Audic, S., Claverie, J.-M., Blanc, G., 2010. BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC Evol. Biol.* 10, 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-8>
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.-M., Gascuel, O., 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 36, W465–W469. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn180>
- Echevarria, G., Massoura, S.T., Sterckeman, T., Becquer, T., Schwartz, C., Morel, J.L., 2006. Assesment and control of the bioavailability of Nickel in soils. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 643. <https://doi.org/10.1897/05-051R.1>
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Elbeltagy, A., Nishioka, K., Suzuki, H., Sato, T., Sato, Y.-I., Morisaki, H., Mitsui, H., Minamisawa, K., 2000. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil Sci. Plant Nutr.* 46, 617–629. <https://doi.org/10.1080/00380768.2000.10409127>
- Etesami, H., 2018. Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues: Mechanisms and future prospects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 147, 175–191. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.032>
- Giovanella, P., Cabral, L., Costa, A.P., de Oliveira Camargo, F.A., Gianello, C., Bento, F.M., 2017. Metal resistance mechanisms in Gram-negative bacteria and their potential to remove Hg in the presence of other metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 140, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.010>
- Gonin, M., Gensous, S., Lagrange, A., Ducouso, M., Amir, H., Jourand, P., 2013. Rhizosphere bacteria of *Costularia* spp. from ultramafic soils in New Caledonia: diversity, tolerance to extreme edaphic conditions, and role in plant growth and mineral nutrition. *Can. J. Microbiol.* 59, 164–174. <https://doi.org/10.1139/cjm-2012-0570>

- Gourmelon, V., Maggia, L., Powell, J.R., Gigante, S., Hortal, S., Gueunier, C., Letellier, K., Carriconde, F., 2016. Environmental and Geographical Factors Structure Soil Microbial Diversity in New Caledonian Ultramafic Substrates: A Metagenomic Approach. *PLoS One* 11, e0167405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167405>
- Guentas, L., Gensous, S., Cavaloc, Y., Ducouso, M., Amir, H., De Georges de Ledenon, B., Moulin, L., Jourand, P., 2016. *Burkholderia novacaledonica* sp. nov. and *B. ultramafica* sp. nov. isolated from roots of *Costularia* spp. pioneer plants of ultramafic soils in New Caledonia. *Syst. Appl. Microbiol.* 39, 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.03.008>
- Guibaud, G., Comte, S., Bordas, F., Dupuy, S., Baudu, M., 2005. Comparison of the complexation potential of extracellular polymeric substances (EPS), extracted from activated sludges and produced by pure bacteria strains, for cadmium, lead and nickel. *Chemosphere* 59, 629–638. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.10.028>
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Gupta, P., Diwan, B., 2017. Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnol. Reports* 13, 58–71. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.12.006>
- Hartley, J., Cairney, J.W.G., Meharg, A.A., 1997. Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptive tolerance to potentially toxic metals in the environment? *Plant Soil* 189, 303–319. <https://doi.org/10.1023/A:1004255006170>
- Idris, R., Trifonova, R., Puschenreiter, M., Wenzel, W.W., Sessitsch, A., 2004. Bacterial Communities Associated with Flowering Plants of the Ni Hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2667–2677. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.2667-2677.2004>
- Isnard, S., L'Huillier, L., Rigault, F., Jaffré, T., 2016. How did the ultramafic soils shape the flora of the New Caledonian hotspot ? *Plant Soil* 403, 53–76. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2910-5>
- Izuka, H., Komagata, K., 1965. Microbiological studies on petroleum and natural gas. 111. Determination of *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Alcaligenes*, and *Achromobacter* isolated from oil-brines in Japan. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 11, 1–14. <https://doi.org/10.2323/jgam.11.1>
- Jaffré, T., 1992. Floristic and Ecological Diversity of the Vegetation on Ultramafic Rocks in New Caledonia. *Veg. ultramafic soils* 101–107.
- Janssen, J., Weyens, N., Croes, S., Beckers, B., Meiresonne, L., Van Peteghem, P., Carleer, R., Vangronsveld, J., 2015. Phytoremediation of Metal Contaminated Soil Using Willow: Exploiting Plant-Associated Bacteria to Improve Biomass Production and Metal Uptake. *Int. J. Phytoremediation* 17, 1123–1136. <https://doi.org/10.1080/15226514.2015.1045129>

- Jaspers, E., Overmann, J., 2004. Ecological Significance of Microdiversity: Identical 16S rRNA Gene Sequences Can Be Found in Bacteria with Highly Divergent Genomes and Ecophysologies. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4831–4839. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.4831-4839.2004>
- Kazakou, E., Dimitrakopoulos, P.G., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Troumbis, A.Y., 2008. Hypotheses, mechanisms and trade-offs of tolerance and adaptation to serpentine soils: from species to ecosystem level. *Biol. Rev.* 495–508. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00051.x>
- Kim, M.K., Kim, Y.-J., Kim, H.-B., Kim, S.-Y., Yi, T.-H., Yang, D.-C., 2008. *Curtobacterium ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 2393–2397. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65591-0>
- Klonowska, A., Chaintreuil, C., Tisseyre, P., Miché, L., Melkonian, R., Ducouso, M., Laguerre, G., Brunel, B., Moulin, L., 2012. Biodiversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts (*Cupriavidus taiwanensis*, *Rhizobium mesoamericanum*) in New Caledonia and their adaptation to heavy metal-rich soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 81, 618–635. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)10017-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)10017-X)
- Komagata, K., Izuka, H., 1964. New species of *Brevibacterium* Isolated from Rice. *J. Agric. Chem. Soc. Japan* 38, 496–502. <https://doi.org/10.1271/nogeikagaku1924.38.496>
- Lacava, P.T., Li, W., Araújo, W.L., Azevedo, J.L., Hartung, J.S., 2007. The endophyte *Curtobacterium flaccumfaciens* reduces symptoms caused by *Xylella fastidiosa* in *Catharanthus roseus*. *J. Microbiol.* 45, 388–93.
- Lagrange, A., Ducouso, M., Jourand, P., Majorel, C., Amir, H., 2011. New insights into the mycorrhizal status of Cyperaceae from ultramafic soils in New Caledonia. *Can. J. Microbiol.* 57, 21–28. <https://doi.org/10.1139/W10-096>
- Lagrange, A., L’Huillier, L., Amir, H., 2013. Mycorrhizal status of Cyperaceae from New Caledonian ultramafic soils: Effects of phosphorus availability on arbuscular mycorrhizal colonization of *Costularia comosa* under field conditions. *Mycorrhiza* 23, 655–661. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0503-1>
- Larcher, M., Muller, B., Mantelin, S., Rapior, S., Cleyet-Marel, J.-C., 2003. Early modifications of *Brassica napus* root system architecture induced by a plant growth-promoting *Phyllobacterium* strain. *New Phytol.* 160, 119–125. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00862.x>
- Larkin, A.A., Martiny, A.C., 2017. Microdiversity shapes the traits, niche space, and biogeography of microbial taxa. *Environ. Microbiol. Rep.* 9, 55–70. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12523>
- Larridon, I., Bauters, K., Semmouri, I., Viljoen, J.-A., Prychid, C.J., Muasya, A.M., Bruhl, J.J., Wilson, K.L., Senterre, B., Goetghebeur, P., 2018b. Molecular phylogenetics of the genus *Costularia* (Schoeneae, Cyperaceae) reveals multiple distinct evolutionary lineages. *Mol. Phylogenet. Evol.* 126, 196–209. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.04.016>



- Larridon, I., Verboom, G.A., Muasya, A.M., 2018a. Revised delimitation of the genus *Tetraria*, nom. cons. prop. (Cyperaceae, tribe Schoeneae, Tricostularia clade). South African J. Bot. 118, 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.06.007>
- Leelayuwat, C., Romphruk, A., Lulitanond, A., Trakulsomboon, S., Thamlikitkul, V., 2000. Genotype analysis of *Burkholderia pseudomallei* using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD): indicative of genetic differences amongst environmental and clinical isolates. Acta Trop. 77, 229–237. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(00\)00137-6](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(00)00137-6)
- Leff, J.W., Jones, S.E., Prober, S.M., Barberán, A., Borer, E.T., Firn, J.L., Harpole, W.S., Hobbie, S.E., Hofmockel, K.S., Knops, J.M.H., McCulley, R.L., La Pierre, K., Risch, A.C., Seabloom, E.W., Schütz, M., Steenbock, C., Stevens, C.J., Fierer, N., 2015. Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in grasslands across the globe. Proc. Natl. Acad. Sci. 112, 10967–10972. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508382112>
- Li, X., Li, D., Yan, Z., Ao, Y., 2018. Biosorption and bioaccumulation characteristics of cadmium by plant growth-promoting rhizobacteria. RSC Adv. 8, 30902–30911. <https://doi.org/10.1039/C8RA06270F>
- Liu, X., Huang, Y., Chen, Y., Cao, Y., 2016. Partial structural characterization, as well as immunomodulatory and anti-aging activities of CP2-c2-s2 polysaccharide from *Cordyceps militaris*. RSC Adv. 6, 104094–104103. <https://doi.org/10.1039/C6RA23612J>
- Long, L., Lin, Q., Yao, Q., Zhu, H., 2017. Population and function analysis of cultivable bacteria associated with spores of arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. 3 Biotech 7, 4–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0612-1>
- Mano, H., Tanaka, F., Nakamura, C., Kaga, H., Morisaki, H., 2007. Culturable Endophytic Bacterial Flora of the Maturing Leaves and Roots of Rice Plants (*Oryza sativa*) Cultivated in a Paddy Field. Microbes Environ. 22, 175–185. <https://doi.org/10.1264/jsme2.22.175>
- Mengoni, A., Barzanti, R., Gonnelli, C., Gabbriellini, R., Bazzicalupo, M., 2001. Characterization of nickel-resistant bacteria isolated from serpentine soil. Environ. Microbiol. 3, 691–698. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00243.x>
- Mengoni, A., Schat, H., Vangronsveld, J., 2010. Plants as extreme environments? Ni-resistant bacteria and Ni-hyperaccumulators of serpentine flora. Plant Soil 331, 5–16. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0242-4>
- Midha, S., Bansal, K., Sharma, S., Kumar, N., Patil, P.P., Chaudhry, V., Patil, P.B., 2016. Genomic Resource of Rice Seed Associated Bacteria. Front. Microbiol. 6, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01551>
- Mishra, J., Singh, R., Arora, N.K., 2017. Alleviation of Heavy Metal Stress in Plants and Remediation of Soil by Rhizosphere Microorganisms. Front. Microbiol. 8, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01706>
- Morat, P., Jaffré, T., Tronchet, F., Munzinger, J., Pillon, Y., Veillon, J.-M., Chalopin, M., Birnbaum, P., Rigault, F., Dagostini, G., Tinel, J., Lowry, P.P., 2012. Le référentiel taxonomique Florical et les caractéristiques de la flore vasculaire indigène de la Nouvelle-Calédonie. Adansonia 34, 179–221. <https://doi.org/10.5252/a2012n2a1>

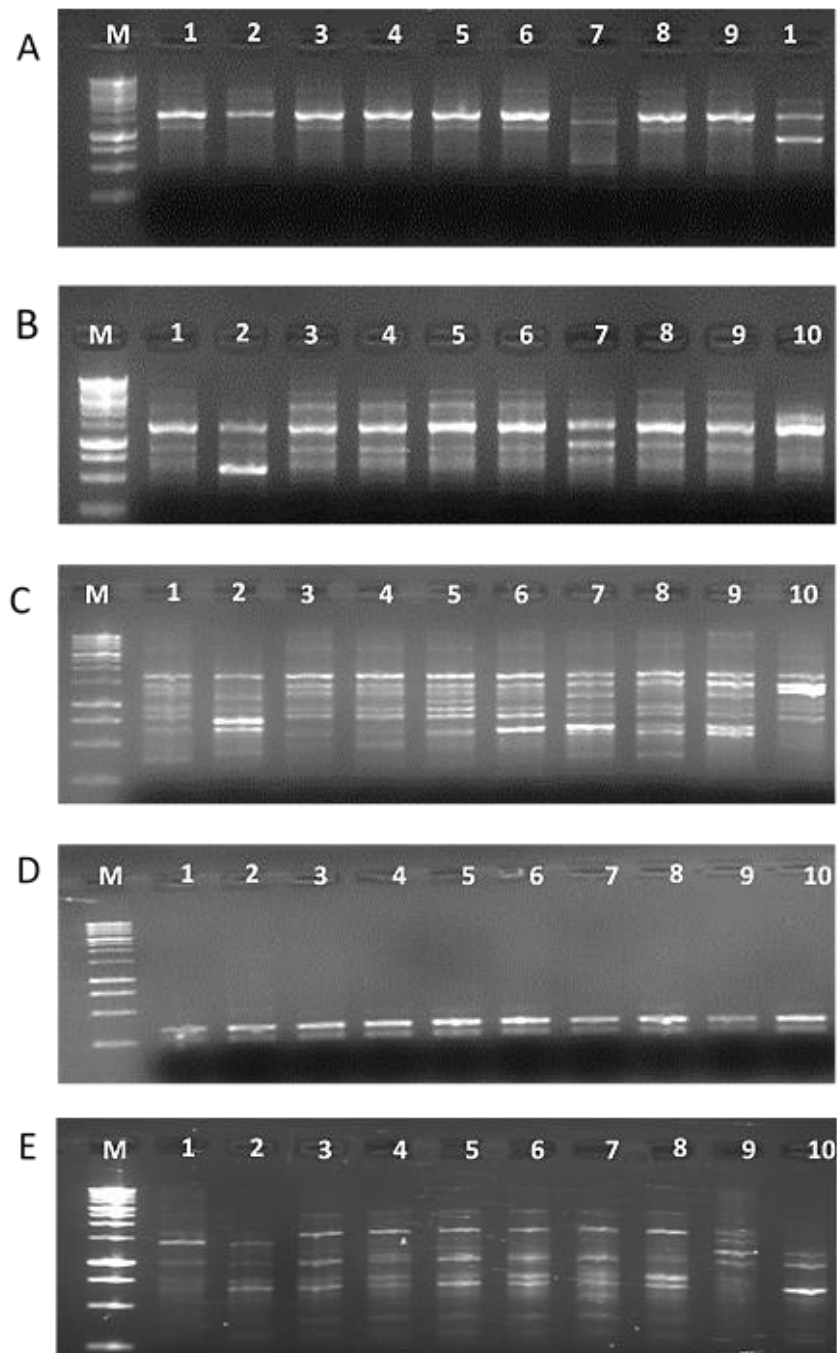
- Myers, N., 2003. Biodiversity Hotspots Revisited. *Bioscience* 53, 916–917. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2003\)053\[0916:BHR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2003)053[0916:BHR]2.0.CO;2)
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B., Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853–858. <https://doi.org/10.1038/35002501>
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G., 2003. Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Sci.* 54, 655–670. <https://doi.org/10.1046/j.1351-0754.2003.0556.x>
- Navarrete, F., De La Fuente, L., 2014. Response of *Xylella fastidiosa* to zinc: Decreased culturability, increased exopolysaccharide production, and formation of resilient biofilms under flow conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1097–1107. <https://doi.org/10.1128/AEM.02998-13>
- O’Dell, R., Rajakaruna, N., 2011. Intraspecific Variation, Adaptation, and Evolution, Serpentine: Evolution and Ecology in a Model System. <https://doi.org/10.1525/california/9780520268357.003.0005>
- O’Toole, G.A., 2011. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *J. Vis. Exp.* 10–11. <https://doi.org/10.3791/2437>
- Pascal, M., De Forges, B.R., Le Guyader, H., Simberloff, D., 2008. Mining and Other Threats to the New Caledonia Biodiversity Hotspot. *Conserv. Biol.* 22, 498–499. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2008.00889.x>
- Pasquet, C., Monna, F., van Oort, F., Gunkel-Grillon, P., Laporte-Magoni, C., Losno, R., Chateau, C., 2018. Mobility of Ni, Co, and Mn in ultramafic mining soils of New Caledonia, assessed by kinetic EDTA extractions. *Environ. Monit. Assess.* 190, 638. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-7029-0>
- Perrier, N., Ambrosi, J.P., Colin, F., Gilkes, R.J., 2006a. Biogeochemistry of a regolith: The New Caledonian Koniambo ultramafic massif. *J. Geochemical Explor.* 88, 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2005.08.015>
- Perrier, N., Amir, H., Colin, F., 2006b. Occurrence of mycorrhizal symbioses in the metal-rich lateritic soils of the Koniambo Massif, New Caledonia. *Mycorrhiza* 16, 449–458. <https://doi.org/10.1007/s00572-006-0057-6>
- Pulsawat, W., Leksawasdi, N., Rogers, P.L., Foster, L.J.R., 2003. Anions effects on biosorption of Mn(II) by extracellular polymeric substance (EPS) from *Rhizobium etli*. *Biotechnol. Lett.* 25, 1267–1270. <https://doi.org/10.1023/A:1025083116343>
- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org>
- Raupach, G.S., Kloepper, J.W., 2000. Biocontrol of Cucumber Diseases in the Field by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria With and Without Methyl Bromide Fumigation. *Plant Dis.* 84, 1073–1075. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.10.1073>
- Roane, T.M., Kellogg, S.T., 1996. Characterization of bacterial communities in heavy metal contaminated soils. *Can. J. Microbiol.* 42, 593–603. <https://doi.org/10.1139/m96-080>

- Roesch, L.F.W., Fulthorpe, R.R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A.K.M., Kent, A.D., Daroub, S.H., Camargo, F.A.O., Farmerie, W.G., Triplett, E.W., 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J.* 1, 283–290. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.53>
- Román-Ponce, B., Reza-Vázquez, D.M., Gutiérrez-Paredes, S., De Haro-Cruz, M. de J., Maldonado-Hernández, J., Bahena-Osorio, Y., Estrada-de los santos, P., Wang, E.T., Vásquez-Murrieta, M.S., 2017. Plant Growth-Promoting Traits in Rhizobacteria of Heavy Metal-Resistant Plants and Their Effects on *Brassica nigra* Seed Germination. *Pedosphere* 27, 511–526. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60347-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60347-3)
- Saddler, G.S., Guimarães, P.M., 2015. *Curtobacterium*, in: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 1–14. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00096>
- Sheu, S.-Y., Chou, J.-H., Bontemps, C., Elliott, G.N., Gross, E., dos Reis Junior, F.B., Melkonian, R., Moulin, L., James, E.K., Sprent, J.I., Young, J.P.W., Chen, W.-M., 2013. *Burkholderia diazotrophica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 435–441. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.039859-0>
- Stoppel, R.D., Schlegel, H.G., 1995. Nickel-resistant bacteria from anthropogenically nickel-polluted and naturally nickel-percolated ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2276–2285.
- Sturz, A. V., Christie, B.R., Matheson, B.G., Nowak, J., 1997. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biol. Fertil. Soils* 25, 13–19. <https://doi.org/10.1007/s003740050273>
- Sturz, A. V., Matheson, B.G., 1996. Populations of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia*-induced bacterial soft rot in potato tubers. *Plant Soil* 184, 265–271. <https://doi.org/10.1007/BF00010455>
- Su, C., Xu, X., Liu, D., Wu, M., Zeng, F., Zeng, M., Wei, W., Jiang, N., Luo, X., 2013. Isolation and characterization of exopolysaccharide with immunomodulatory activity from fermentation broth of *Morchella conica*. *DARU J. Pharm. Sci.* 21, 5. <https://doi.org/10.1186/2008-2231-21-5>
- Tirry, N., Tahri Joutey, N., Sayel, H., Kouchou, A., Bahafid, W., Asri, M., El Ghachtouli, N., 2018. Screening of plant growth promoting traits in heavy metals resistant bacteria: Prospects in phytoremediation. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 0–6. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.06.004>
- Ventorino, V., Aliberti, A., Faraco, V., Robertiello, A., Giacobbe, S., Ercolini, D., Amore, A., Fagnano, M., Pepe, O., 2015. Exploring the microbiota dynamics related to vegetable biomasses degradation and study of lignocellulose-degrading bacteria for industrial biotechnological application. *Sci. Rep.* 5, 1–13. <https://doi.org/10.1002/anie.200602431>
- Vishnivetskaya, T.A., Kathariou, S., Tiedje, J.M., 2009. The *Exiguobacterium* genus: biodiversity and biogeography. *Extremophiles* 13, 541–555. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0243-5>
- Wulff, A., L'Huillier, L., Vea, C., Jaffré, T., 2010. Espèces indigènes utilisables en revégétalisation, in: L'Huillier, L., Jaffré, T., Wulff, A. (Eds.), *Mines et Environnement En Nouvelle-Calédonie : Les Milieux Sur Substrats Ultramaïques et Leur Restauration*. Noumea, pp. 231–344.

### CHAPITRE 3

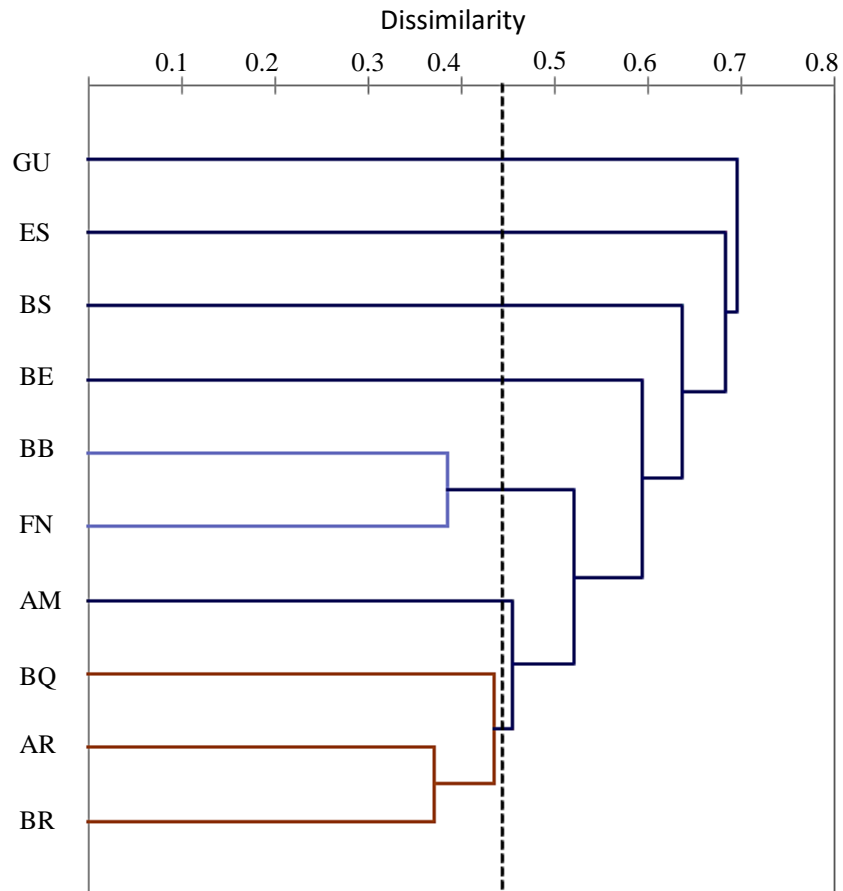
- Yamada, K., Komagata, K., 1972. TAXONOMIC STUDIES ON CORYNEFORM BACTERIA. J. Gen. Appl. Microbiol. 18, 417–431. <https://doi.org/10.2323/jgam.18.417>
- Yao, H., Gao, Y., Nicol, G.W., Campbell, C.D., Prosser, J.I., Zhang, L., Han, W., Singh, B.K., 2011. Links between Ammonia Oxidizer Community Structure, Abundance, and Nitrification Potential in Acidic Soils. Appl. Environ. Microbiol. 77, 4618–4625. <https://doi.org/10.1128/AEM.00136-11>
- Zhang, Z., Cai, R., Zhang, W., Fu, Y., Jiao, N., 2017. A Novel Exopolysaccharide with Metal Adsorption Capacity Produced by a Marine Bacterium *Alteromonas* sp. JL2810. Mar. Drugs 15, 175. <https://doi.org/10.3390/md15060175>

Appendix A. Supplementary data

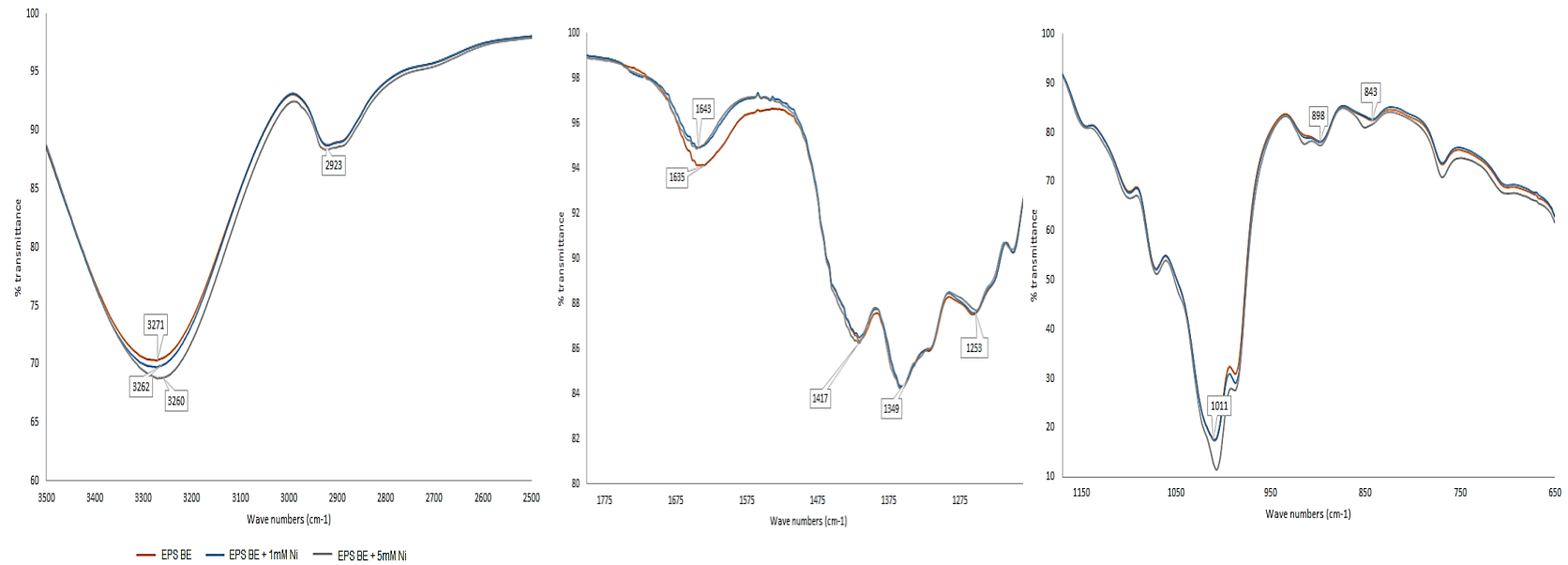


**FigS3.1** Electrophoresis pattern of RAPD-PCR products. A: Geno 70.9 primer, B: RAPD1 primer, C: Geno 80.7 primer, D: RF1 primer and E: OPH13 primer. M: 1Kb DNA ladder (Promega), 1: BB, 2: GU, 3: AM, 4: BQ, 5: BR, 6: AR, 7: BS, 8: FN, 9: BE and 10: ES.

### CHAPITRE 3



**FigS3.2** Phenogram based on dissimilarity obtained by Xlstat program (Jaccard index) of the ten ultramafic *Curtobacterium* strains.



**FigS3.3** Magnifications of the Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectrum of the *Curtobacterium citreum* BE EPS purified by ultrafiltration after cultivation of the bacteria cells in medium with or without NiSO<sub>4</sub> supplementations (1mM, 5mM).

CHAPITRE 3

**Table S3.1** Site location, geographical description and geochemical characteristics of the sites of *Curtobacterium* strain sampling (Gonin et al., 2013).

Location and GPS coordinates	Trazy-Guerioum, Koniambo massif, Kone 21°00'26"S ; 164°50'04"E 21.00 S 164.83 E	Mont-Dore, Plum Road 22°15'54''S166°35'57' 'E 22.26S 166.59 E
Altitude (m)	821	534
Geomorphological type (FAO UNESCO)	Ferralsol*	Cambisol
Sites map	1	2
Main characteristics		
pH (H <sub>2</sub> O)	4.9	5.2
Total elements		
N (g kg <sup>-1</sup> )	0.97	1.63
P (g kg <sup>-1</sup> )	0.043	0.129
K (g kg <sup>-1</sup> )	0.021	Not detected
Ca (g kg <sup>-1</sup> )	0.63	0.46
Mg (g kg <sup>-1</sup> )	7.3	10.4
Fe (g kg <sup>-1</sup> )	397	396
Mn (g kg <sup>-1</sup> )	1.7	2.7
Ni (g kg <sup>-1</sup> )	4.4	3.9
Co (g kg <sup>-1</sup> )	0.66	0.44
Cr (g kg <sup>-1</sup> )	17.7	20.4
Extractable Elements		
Fe DTPA ‡ (mg kg <sup>-1</sup> )	80	95
Ni DTPA (mg kg <sup>-1</sup> )	96	76
Mn DTPA (mg kg <sup>-1</sup> )	658	162
Co DTPA (mg kg <sup>-1</sup> )	61	57
Cr DTPA (mg kg <sup>-1</sup> )	0.3	0.6

\*Soil geomorphological definition according to FAO UNESCO. ‡DTPA: dimethylene triaminopentaacetic acid



CHAPITRE 3

**Table S3.2** List of strains: collection code, sampling site, plant host origin, DNA sequences in EMBL database, adaptation to ultramafic conditions (Gonin et al. 2013). Site 1: Trazy-Guerioum, Koniambo massif, Kone, 21°00'26''S; 164°50'04''E, 21.00 S 164.83 E; Site 2: Mont-Dore, Plum Road, 22°15'54''S 166°35'57''E, 22.26S 166.59 E. (See Table S1 for the description of each site).

Collection codes	Site	Plant host species	16S rDNA sequence EMBL <sup>‡</sup>	UF <sup>‡</sup> -like conditions				Plant Growth Promoting properties					Total score		
				Co	Cr	Mn	Ni	Ca/Mg	Solub	PO <sub>4</sub> <sup>‡</sup>	IAA <sup>‡</sup>	NH <sub>3</sub> <sup>‡</sup>		Siderophore	ACC <sup>‡</sup>
				1	0.1	10	1	(1/16)	PO <sub>4</sub> <sup>‡</sup>	IAA <sup>‡</sup>	NH <sub>3</sub> <sup>‡</sup>	Siderophore	ACC <sup>‡</sup>		
				mM	mM	mM	mM								
BE	2	<i>Tetraria pubescens</i>	FR872423	1*	1	1	1	1	0	1	1	0	0	7	
BB	2	<i>T. pubescens</i>	FR872427	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	5	
AM	2	<i>T. arundinacea</i>	FR872424	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	6	
AR	2	<i>T. pubescens</i>	FR872420	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	4	
BS	2	<i>Chamaedendron nervosa</i>	FR872426	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	5	
BQ	2	<i>T. pubescens</i>	FR872421	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	5	
BR	2	<i>T. pubescens</i>	FR872425	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	5	
GU	1	<i>T. arundinacea</i>	FR872432	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	6	
FN	2	<i>T. pubescens</i>	FR872436	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	5	
ES	2	<i>T. pubescens</i>	FR872438	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	5	

\*Each condition tested was scored as 1 for a positive result or 0 for a negative result. <sup>‡</sup>Abbreviations: EMBL: European Molecular Biology Laboratory, UF: Ultramafic Solub. PO<sub>4</sub>, phosphate solubilization; IAA, indole-3-acetic acid; ACC, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase

CHAPITRE 3

**Table S3.3** Primers list used in the present study for RAPD experiments.

	Primers 5' --> 3'	Tm	References
RF1 (60% GC)	GTAGCTGACG	32 °C	Operon eurofin
OPH13 (70% GC)	GACGCCACAC	34 °C	Operon eurofin
Geno 70.9 (70% GC)	TGCAGCACCG	34 °C	Operon eurofin
RAPD1 (80% GC)	GTTCCGCCCC	36 °C	Operon eurofin
Geno 80.7 (80%GC)	GCACGCCGGA	36 °C	Operon eurofin

CHAPITRE 3

**Table S3.4** Full biochemical characteristics of *Curtobacterium* strains isolated from New Caledonian ultramafic soils and *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> Abbreviations: +: growth; -: no growth; w: weakly.

		Strains of <i>Curtobacterium</i> isolated from New Caledonian ultramafic soils										<i>C. citreum</i> DSM20528 <sup>T</sup>	
API 20NE		BE	BB	AM	AR	BS	BQ	BR	GU	FN	ES		
Nitrates reduction to nitrites		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Nitrites reduction to nitrogen		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tryptophane deamination		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Glucose fermentation		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Arginine dihydrolase		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Urease		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Esculine hydrolysis		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Gelatin hydrolysis		+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	
β galactosidase		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ASSIMILATION	Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	N-acetyl-glucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Potassium gluconate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Capric acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Adipic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Malate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Trisodium citrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Phenylacetic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Oxidase		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

### CHAPITRE 3

Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>GEN III Biolog</b>											
Dextrin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Maltose	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gentiobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Turanose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Stachyose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\alpha$ -D-Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\beta$ -Methyl-D-Glucoside	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-Acetyl-D-Glucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-Acetyl- $\beta$ -D-Mannosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-Acetyl-D-Galactosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w
N-Acetyl-Neuraminic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

CHAPITRE 3

8% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\alpha$ -D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3-Methyl Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Fucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inosine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1% Sodium Lactate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fusidic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Serine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Arabitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w
myo-Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose-6-PO4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose-6-PO4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Aspartic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Serine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Troleandomycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rifamycin SV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Minocycline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycyl-L-Proline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Alanine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

CHAPITRE 3

L-Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Aspartic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Glutamic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Histidine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
L-Pyroglutamic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Serine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lincomycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Guanidine HCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w
Niaproof 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pectin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galacturonic Acid	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+
L-Galactonic Acid Lactone	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Gluconic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucuronic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucuronamide	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mucic Acid	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Quinic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Saccharic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Vancomycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetrazolium Violet	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetrazolium Blue	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl Pyruvate	+	w	w	w	w	w	-	+	w	+	+
D-Lactic Acid Methyl Ester	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Lactic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citric Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\alpha$ -Keto-Glutaric Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

### CHAPITRE 3

D-Malic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Malic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bromo-Succinic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nalidixic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lithium Chloride	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Potassium Tellurite	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\gamma$ -Amino-Butyric Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
$\alpha$ -Hydroxy-Butyric Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
$\beta$ -Hydroxy-D,L-Butyric Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
$\alpha$ -Keto-Butyric Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w
Acetoacetic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Propionic Acid	w	w	-	-	+	+	-	+	+	+	w
Acetic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Formic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aztreonam	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Sodium Butyrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sodium Bromate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

#### API ZYM

Alkaline phosphatase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C4 esterase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C8 esterase lipase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C14 lipase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leucine arylamidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Valine arylamidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w
Cystine arylamidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

### CHAPITRE 3

Trypsin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alpha-chymotrypsin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phosphatase acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Naphtol phosphohydrolase	AS-BI- +	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\alpha$ galactosidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\beta$ galactosidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\beta$ glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ glucosidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\beta$ glucosidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	w
$\alpha$ mannosidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\alpha$ fucosidase	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+



CHAPITRE 3

**Table S3.5** Zone of inhibition (cm) of Ampicillin, Penicillin, Gentamycin, Tetracyclin, Streptomycin and Carbenicillin.

	Dose tested (µg per tablet)	Zone of Inhibition (cm)										<i>C. citreum</i> DSM20528 <sup>T</sup>
		BE	BB	AM	AR	GU	BS	BQ	BR	ES	FN	
Ampicillin	10	1	1.8	1.6	1.6	1.8	1.4	1.4	1.4	nd*	nd	2.4
Penicillin	6	0.8	1.2	1.2	1	1.6	0.8	1.0	1.0	nd	nd	3.0
Gentamycin	15	2.4	2.4	2.2	2.4	2.2	2.4	2.4	2.2	nd	nd	1.4
Tetracyclin	30	1.8	2.0	2.0	2.0	2.4	1.8	2.0	2.0	nd	nd	2.0
Streptomycin	10	1.4	2.0	1.8	1.8	2.0	1.0	2.0	1.8	nd	nd	0.8
Carbenicillin	100	1.8	2.2	2.4	2.2	2.4	2.0	2.2	2.2	nd	nd	4.0

\*not determined

CHAPITRE 3

**Table S3.6** Percentages of polymorphic bands of RAPD experiments of the ten ultramafic *Curtobacterium* strains.

Primer	Sequence	% GC	Number of RAPD bands	Number of polymorphic bands	% of polymorphic bands
RF1	GTAGCTGACG	60%	3	2	67%
OPH13	GACGCCACAC	70%	15	14	93%
Geno 70.9	TGCAGCACCG	70%	9	9	100%
RAPD1	GTTCCGCCCC	80%	9	8	89%
Geno 80.7	GCACGCCGGA	80%	12	11	92%
					88%

**Table S3.7** Statistics of sequencing depth and coverage.

Sample Name	Reference Name	Reference Size (bp)	Covered Length (bp)	Coverage (%)	Average Depth
<i>C. citreum</i> BE	<i>C. citreum</i> NS330	3,453,097	3,127,933	90.58	315

CHAPITRE 3

**Table S3.8** Statistics of SNP annotation comparing with reference *Curtobacterium citreum* NS330.

Sample Name	Region	CDS								Intergenic	Total
	Type	Start_syn	Stop_syn	Start_nonsyn	Stop_nonsyn	Premature_stop	Synonymous	Non synonymous	Total		
<i>C. citreum</i> BE	Number	4	10	26	8	28	15,501	6,339	21,864	3150	25,014
	Rate (%)	0.016	0.040	0.104	0.032	0.112	61.969	25.342	87.407	12.593	--

CHAPITRE 3

**Table S3.9** P, K, Ca and Mg concentration in shoot and root of Sorghum (mean  $\pm$  SE n = 3).

Treatment	P (mg kg <sup>-1</sup> )		K (g kg <sup>-1</sup> )		Ca (g kg <sup>-1</sup> )		Mg (g kg <sup>-1</sup> )	
	Shoot							
Control	317	$\pm$ 14a	16.6	$\pm$ 0.4a	2.35	$\pm$ 0.08a	1.95	$\pm$ 0.03a
<i>C. citreum</i> DSM20528 <sup>T</sup>	373	$\pm$ 18a	15.2	$\pm$ 1.1a	2.5	$\pm$ 0.12a	2.2	$\pm$ 0.15a
<i>C. citreum</i> BE	367	$\pm$ 8a	16.2	$\pm$ 0.2a	2.71	$\pm$ 0.28a	2.13	$\pm$ 0.01a
<i>C. citreum</i> BB	338	$\pm$ 12a	15.8	$\pm$ 0.5a	3.07	$\pm$ 0.21a	2.32	$\pm$ 0.11a
<i>C. citreum</i> AM	351	$\pm$ 19a	17.1	$\pm$ 1.2a	3.03	$\pm$ 0.43a	2.11	$\pm$ 0.04a
	Root							
Control	301	$\pm$ 15a	6.41	$\pm$ 0.35a	3.73	$\pm$ 0.44a	3.96	$\pm$ 0.15a
<i>C. citreum</i> DSM20528 <sup>T</sup>	288	$\pm$ 27a	4.62	$\pm$ 0.16b	3.56	$\pm$ 0.13a	4.03	$\pm$ 0.10a
<i>C. citreum</i> BE	284	$\pm$ 10a	5.35	$\pm$ 0.55ab	3.28	$\pm$ 0.23a	4.05	$\pm$ 0.28a
<i>C. citreum</i> BB	306	$\pm$ 18a	5.36	$\pm$ 0.31ab	3.78	$\pm$ 0.19a	3.03	$\pm$ 0.13a
<i>C. citreum</i> AM	313	$\pm$ 8a	6.00	$\pm$ 0.79a	3.93	$\pm$ 0.70a	4.23	$\pm$ 0.67a

\*Within a column, values with different letters are significantly different after Tukey's (HSD) test or Fisher's (LSD) test ( $P < 0.05$ ).

CHAPITRE 3

**Table S3.10** Metals concentration in shoot and root of Sorghum (mean  $\pm$  SE n = 3).

Treatment	Co (mg kg <sup>-1</sup> )	Cr (mg kg <sup>-1</sup> )	Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	Ni (mg kg <sup>-1</sup> )
	Shoot			
Control	2.00 $\pm$ 0.07a*	24.8 $\pm$ 4.9a	439 $\pm$ 8a	19.2 $\pm$ 0.6a
<i>C. citreum</i> DSM20528 <sup>T</sup>	1.25 $\pm$ 0.14b	16.4 $\pm$ 0.8a	427 $\pm$ 35a	18.2 $\pm$ 2.1a
<i>C. citreum</i> BE	1.08 $\pm$ 0.01b	9.3 $\pm$ 2.1b	378 $\pm$ 20a	11.2 $\pm$ 1.2b
<i>C. citreum</i> BB	1.17 $\pm$ 0.06b	10.4 $\pm$ 2.0b	418 $\pm$ 28a	11.1 $\pm$ 0.5b
<i>C. citreum</i> AM	1.19 $\pm$ 0.05b	11.0 $\pm$ 0.3b	354 $\pm$ 27a	15.9 $\pm$ 1.1ab
	Root			
Control	183 $\pm$ 9a	555 $\pm$ 56a	2208 $\pm$ 8c	678 $\pm$ 45ab
<i>C. citreum</i> DSM20528 <sup>T</sup>	220 $\pm$ 17a	867 $\pm$ 275a	2508 $\pm$ 35bc	973 $\pm$ 139a
<i>C. citreum</i> BE	198 $\pm$ 9a	698 $\pm$ 106a	2430 $\pm$ 20bc	847 $\pm$ 114ab
<i>C. citreum</i> BB	183 $\pm$ 3a	827 $\pm$ 160a	3983 $\pm$ 28ab	499 $\pm$ 31b
<i>C. citreum</i> AM	194 $\pm$ 12a	794 $\pm$ 99a	4860 $\pm$ 27a	538 $\pm$ 46b

\*Within a column, values with different letters are significantly different after Tukey's (HSD) test or Fisher's (LSD) test (P < 0.05).

CHAPITRE 3

**Table S3.11** Intracellular Ni and wall surface Ni ( $\mu\text{g } (10^7\text{CFU})^{-1}$ ) of *Curtobacterium citreum* BE and *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> (mean  $\pm$  SE n = 3).

Ni (mM)	Strains	Intracellular Ni		Wall surface Ni	
		Ni content (ng ( $10^7\text{CFU}^{-1}$ ))	%	Ni content (ng ( $10^7\text{CFU}^{-1}$ ))	%
0	<i>C. citreum</i> DSM20528 <sup>T</sup>	0.6 $\pm$ 0.0c*	-	5.8 $\pm$ 0.6e	-
	<i>C. citreum</i> BE	0.1 $\pm$ 0.0d	-	1.0 $\pm$ 0.1f	-
0.5	<i>C. citreum</i> DSM20528 <sup>T</sup>	29.9 $\pm$ 6.6b	(0.1) ‡	82.3 $\pm$ 4.4d	(0.3)
	<i>C. citreum</i> BE	0.1 $\pm$ 0.0cd	(0.0)	1.1 $\pm$ 0.2f	(0.0)
1	<i>C. citreum</i> DSM20528 <sup>T</sup>	1151.9 $\pm$ 400.0a	(2.0)	977.8 $\pm$ 97.4b	(1.7)
	<i>C. citreum</i> BE	38.0 $\pm$ 10.5b	(0.1)	190.9 $\pm$ 8.3c	(0.3)
5	<i>C. citreum</i> DSM20528 <sup>T</sup>	958.0 $\pm$ 129.9a	(0.3)	1808.3 $\pm$ 84.0a	(0.6)
	<i>C. citreum</i> BE	27.8 $\pm$ 2.9b	(0.0)	71.8 $\pm$ 3.9d	(0.0)

\*Within a column, values with different letters are significantly different after Fisher's (LSD) test ( $P < 0.05$ ). ‡Values in parentheses correspond to the percentage of nickel found in relation to initial Ni.

### CHAPITRE 3

**Table S3.12** Biofilm formation of *Curtobacterium citreum* BE and *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> at 72h. Adherent bacteria are stained with a 0.02% crystal violet solution. The results are expressed as the ratio of the absorbance of the assay to the absorbance of the blank (without bacteria).

Ni (mM)	<i>C. citreum</i> BE	<i>C. citreum</i> DSM20528 <sup>T</sup>
0	<b>4.5</b> ± <b>0.3bcd</b> <sup>*,‡</sup>	<b>5.5</b> ± <b>0.3a</b>
0.25	<b>3.2</b> ± <b>0.5ef</b>	<b>4.9</b> ± <b>0.3abc</b>
0.5	<b>4.1</b> ± <b>0.3cde</b>	<b>5.1</b> ± <b>0.2ab</b>
1	<b>2.7</b> ± <b>0.1fg</b>	<b>5.4</b> ± <b>0.3a</b>
2	<b>3.5</b> ± <b>0.1def</b>	<b>5.1</b> ± <b>0.3ab</b>
3	1.4 ± 0.1ij	1.4 ± 0.0hi
4	1.3 ± 0.1jk	1.3 ± 0.0ij
8	1.2 ± 0.1k	1.3 ± 0.0ij
10	1.2 ± 0.0jk	1.5 ± 0.0gh

\*Within a column, values with different letters are significantly different after Fisher's (LSD) test ( $P < 0.05$ ). <sup>‡</sup>Biofilm production (in bold) occurs when the ratio is greater than two (Brian Jaisson 2014).

**Table S3.13** The productions of EPS by *Curtobacterium citreum* BE in relation to Ni (mean ± SE n = 3).

Treatment	EPS (g L <sup>-1</sup> )			Ni in the EPS (mg g <sup>-1</sup> )		
LB	2.3	±	0.0b*	0.0	±	0.0c
LB + 1 mM NiSO <sub>4</sub>	2.7	±	0.3ab	2.7	±	0.3b
LB + 5 mM NiSO <sub>4</sub>	2.9	±	0.1a	9.9	±	0.5a

\*Within a column, values with different letters are significantly different after Fisher's (LSD) test ( $P < 0.05$ ).

**4. Chapitre 4 Effets de la co-inoculation de *Curtobacterium citreum* BE et de champignons mycorhiziens à arbuscules sur la croissance et l'adaptation des plantes au sol ultramafique**



## Introduction

Les chapitres précédents ont mis en avant que les inoculations bactériennes de *Paraburkholderia ultramafica* STM10279<sup>T</sup>, *Caballeronia novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> et *Curtobacterium citreum* BE entraînaient une diminution significative des teneurs en métaux dans les plantes. Cependant, ces diminutions de concentrations en métaux n'ont aucune influence positive sur la croissance des plantes. L'absence d'amélioration de la nutrition des plantes ainsi que des adaptations propres à la plante vis-à-vis des métaux ont été suggérées pour expliquer ce phénomène.

Dans une optique d'amélioration de la nutrition minérale, des essais de co-inoculation avec des champignons mycorhiziens à arbuscules (AMF), reconnus pour leurs rôles dans l'amélioration de la nutrition minérale de *Tetraria comosa* (Gensous, 2014 ; Lagrange et al., 2013, 2011) et *Metrosideros laurifolia* (Amir et al., 2019 ; Crossay, 2018 ; Gensous, 2014) ont été réalisés. *C. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> n'a pas été utilisée au vu des résultats négatifs qu'avait son inoculation sur la croissance des plantes (chapitre 2). Concernant *P. ultramafica* STM10279<sup>T</sup>, l'expérimentation a été réalisée, mais aucune amélioration significative positive n'a été observée en comparaison du traitement avec les AMF seuls (Annexe 1, 2 et 3). Un focus a donc été réalisé pour l'écriture d'une publication sur la co-inoculation avec *Curtobacterium citreum* BE, pour laquelle une amélioration significative de la croissance a été observée en comparaison du traitement avec les AMF seuls.

Cet article a été soumis à la revue *Mycorrhiza*. Il présente l'effet de la co-inoculation de *C. citreum* BE et de deux champignons mycorhiziens à arbuscules isolés des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie : *Rhizophagus neocaledonicus* et *Claroideoglossum etunicatum* nc. Ils ont été sélectionnés suite au travail de Crossay (2018) qui a montré qu'il s'agissait de la meilleure association à utiliser (compromis entre nombre d'espèces et effet sur *Metrosideros laurifolia*). Ce travail vise à démontrer la complémentarité des effets bénéfiques de *C. citreum* BE et des AMF, entraînant une amélioration significative de la croissance des plantes.

L'intégralité des expérimentations ont été réalisées par moi-même, avec l'aide d'un stagiaire de Master 2 que j'ai encadré (C. Charvis).

**Improvement of growth and mycorrhizal colonization of two New Caledonian endemic plant species by co-inoculation of *Curtobacterium citreum* BE and arbuscular mycorrhizal fungi on ultramafic soil**

Alexandre BOURLES<sup>1</sup>, Linda GUENTAS<sup>1,2,†</sup>, César CHARVIS<sup>1</sup>, Simon GENSOUS<sup>3</sup>, Clarisse MAJOREL<sup>1</sup>, Thomas CROSSAY<sup>1</sup>, Yvon CAVALOC<sup>1</sup>, Valérie BURTET-SARRAMEGNA<sup>1</sup>, Philippe JOURAND<sup>4</sup>, Hamid AMIR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut de Sciences Exactes et Appliquées, Université de la Nouvelle-Calédonie, BP R4 98851 Noumea, New Caledonia

<sup>2</sup>Université de Toulon, Laboratoire MAPIEM EA 4323, SeaTech-Ecole d'ingénieurs BP 20132 83957 La Garde Cedex, France

<sup>3</sup>Institut Agronomique Néo-Calédonien, Equipe ARBOREAL, groupe EcoRCE, BP 73 Port-Laguerre, 98890 Païta, Nouvelle-Calédonie

<sup>4</sup>IRD, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM UMR040), Campus International de Baillarguet, TA A-82/J, Montpellier F-34398 Cedex 05, France

**†Corresponding author:** [linda.guentas@univ-nc.nc](mailto:linda.guentas@univ-nc.nc) (L. Guentas), Université de la Nouvelle-Calédonie, BP R4 98851 Noumea, New Caledonia +687290262

**Abstract**

The ecological restoration of nickel mining-degraded areas in New Caledonia is strongly limited by soil mineral nutrient, metal toxicity and slow growth rate of the native plant species. In order to improve plant growth for the restoration program, special attention was paid to the interaction of plant and soil microorganisms. In this study, we evaluated the influence of inoculation with *Curtobacterium citreum* BE isolated from New Caledonian ultramafic soils on plant growth and on arbuscular mycorrhizal symbiosis of *Tetraria comosa* (Cyperaceae) and *Metrosideros laurifolia* (Myrtaceae), two endemic plants used in restoration programs.. A greenhouse experiment on ultramafic substrate was conducted with an inoculum comprising two arbuscular mycorrhizal species isolated from New Caledonian ultramafic soils: *Rhizophagus neocaledonicus* and *Claroideoglossum etunicatum* nc. The co-inoculation of the AMF and *C. citreum* BE significantly enhanced the dry weight of the two plants compared to the non-inoculated control: three times respectively for shoots and roots of *T. comosa*; Fifteen and nine times respectively for shoots and roots of *M. laurifolia*. These differences were positively correlated with mycorrhizal colonization which was improved by *C. citreum* BE. Co-inoculated plants were characterized by a better mineral nutrition, a higher Ca/Mg ratio and a lower metal translocation. In conclusion, this study showed that co-inoculation of the two studied plants with AMF and *C. citreum* BE may enhance the success of ecological restoration of ultramafic mine-degraded areas.

**Keywords:** Mycorrhiza helper bacteria, Ultramafic soil, New Caledonia, Plant nutrition, Metal alleviation

## 4.1. Introduction

The majority of terrestrial plants are known to form specialized mycorrhizal structures with symbiotic fungi (Smith and Read 2008). Among them arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) belonging to phylum Glomeromycota are known to promote plant growth by enhancing mineral nutrition, in particular phosphorus, calcium and potassium (Smith and Read 2008). Diverse bacterial taxonomic groups live in association with AMF structures in different stages of their life cycle and in a wide variety of soil environments (Bonfante and Anca 2009). Various bacteria form biofilms on spores and mycelia and may occur within the cytoplasm of both spores and mycelia (Bianciotto et al. 1996a, b). Several studies have reported that the establishment and the functioning of mycorrhizal symbioses can be positively influenced by bacteria that have been named as mycorrhiza helper bacteria (Garbaye 1994; Frey-Klett et al. 2007). Mycorrhiza helper bacteria (MHB) can (i) promote spore germination, (ii) change soil properties, (iii) help to the mycelial growth, (iv) produce stimulatory signals and allows the recognition of fungi by the plants and finally (v) enhance the colonisation of roots by fungi (Frey-Klett et al. 2007; Bidondo et al. 2011). Plants, AMF, and bacteria can be considered as tripartite associations resulting in a consortium that promotes plant growth (Bonfante and Anca 2009; Turrini et al. 2018).

Ultramafic soils (also known as serpentinic soils) are resulting from weathering and pedogenesis of ultramafic bedrocks (Brooks 1987). These soils are characterized by (i) low levels of major plant nutrients (N, P, K), (ii) a strong unbalanced Ca/Mg ratio and (iii) the presence of iron oxides with high levels of metals including Ni, Co, Cr and Mn, (Brooks 1987). In such soils, labile metals (available to organisms) are therefore found in large quantities (Pasquet et al. 2018). In these extreme edaphic conditions, plants have developed several adaptive mechanisms such as (i) slower growth (ii) ability to limit Mg absorption, and (iii) strategies to tolerate relatively high metal concentrations (Brady et al. 2005; Kazakou et al.

2008; Jaffré and L'Huillier 2010a). Among these strategies, the association with specific microorganisms has been described to play a key role in plant tolerance to harsh edaphic conditions (Mengoni et al. 2010; Wang 2017, Etesami, 2018). Occurrence of bacteria associated with AMF on metal contaminated soils have been reported (Iffis et al. 2014) and the beneficial role of plant growth promoting bacteria and AMF on plant responses to metal stress suggested the occurrence of synergistic mechanisms for promoting plant growth (Gamalero et al. 2009).

In New Caledonia, a tropical archipelago in the South Pacific Ocean, one third of the main island is covered by ultramafic soils. As a result, about 85% of the vascular flora growing on these soils (1788 species) are endemic (Isnard et al. 2016) and ultramafic obligate flora is particularly remarkable by its very high endemism (96.7%; Isnard et al. 2016). However, ultramafic settings are exploited for economically valuable ores like Ni, Co and Cr (Pascal et al. 2008) classifying New Caledonia among the biodiversity hotspots (Myers et al. 2000; Myers 2003). The use of microorganisms for ecological restoration of mine degraded areas seems to be a promising way (Amir and Ducouso, 2010). Several studies revealed that AMF promote plant growth by enhancing mineral uptake and plant tolerance against metal on New Caledonian ultramafic soils (Amir et al. 2013, 2019; Lagrange et al. 2013). The first study on the promotion by rhizobacteria of plant growth on New caledonian ultramafic soils was conducted by Gonin et al. (2013). These authors have isolated from ultramafic soils a collection of *Proteobacteria*, including 21 genera, dominated by the genera *Burkholderia* (28%) and *Curtobacterium* (15%). Among them *Paraburkholderia ultramafica* STM10279<sup>T</sup> (Guentas et al. 2016) and *Curtobacterium citreum* BE presented the best plant growth promoting properties in their respective genus (Gonin et al. 2013). This study has suggested a key role of these bacteria in plant growth, nutrition and tolerance to the ultramafic constraints. A preliminary study on the interactions between AMF and *P. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> showed no significant positive effects on plant growth promotion (unpublished data).

Recently, we have shown that ultramafic soils structure *Curtobacterium citreum* in ecotype adapted to the ultramafic constraints (Bourles et al. submitted). The ultramafic ecotype showed high tolerance to different metals and ability to reduce metal concentration in Sorghum (Bourles et al. submitted). Considering this interesting potential of *C. citreum* BE, we designed the present study to evaluate the possible role of *C. citreum* BE on plant growth and its influence on the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Our hypothesis was that co-inoculation of *C. citreum* BE and AMF could produce synergistic effects on plant leading to better plant growth and tolerance to edaphic constraints.

For this purpose, an experiment was performed under greenhouse conditions, on ultramafic soil, with a combination of two AMF isolated from New Caledonian ultramafic soils, belonging to the species *Rhizophagus neocaledonicus* and *Claroideoglossum etunicatum* (Crossay, 2018; Crossay et al. 2018). In order to evaluate the effect of the rhizobacteria on mycorrhizal colonization, two plant species with two different mycorrhizal status were used. *Tetraria comosa*, (ex *Costularia comosa*; Larridon et al. 2018), a weakly mycorrhizal Cyperaceae (Lagrange et al. 2011, 2013) and *Metrosideros laurifolia* (ex *Carpolepis laurifolia*; Pillon et al. 2015), a highly mycorrhizal Myrtaceae (Amir and Ducouso 2010). The first is one of the most frequent species of the herbaceous stratum and the second a frequent small tree. The two are endemic to New Caledonian ultramafic environments and are frequently used in ecological restoration programs (Wulff et al. 2010).

## **4.2. Materials and methods**

### **4.2.1. Bacterial strain**

The strain *C. citreum* BE was isolated by Gonin et al. (2013) who reported plant growth promoting properties of this bacteria. Full description of *C. citreum* BE including morphological, biochemical, molecular characterization and metal tolerance was carried out by Bourles et al. (submitted). All these characteristics are reported in Table S4.1.

#### 4.2.2. AMF isolates

Based on the study of Crossay et al. (submitted) concerning the stimulation of *M. laurifolia* growth by different AMF isolates, two of these symbionts belonging to the species *Rhizophagus neocaledonicus* and *Claroideoglomus etunicatum* *nc* were chosen. Origin, taxonomic description and affiliation of these AMF isolates from ultramafic maquis soil in New-Caledonia, were fully described (Crossay, 2018; Crossay et al. 2018). Inoculum of each isolate was graciously provided by Thomas Crossay (Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement) and was grown using the "cone-tainer technique" (Koske and Gemma 1997; <https://invam.wvu.edu/methods/cultures/single-species-cultures>) as described by Crossay et al. (2018).

#### 4.2.3. Bacterial inoculum

A primary culture was performed by inoculating 10 mL of Lysogenic Broth Lennox medium (LB, tryptone: 10 g L<sup>-1</sup>, yeast extract: 5 g L<sup>-1</sup>, NaCl: 5g L<sup>-1</sup>; CONDA, Spain) by one colony of *C. citreum* BE. The culture was incubated at 28 °C under rotary shaking (125 rpm). After 48 h, the primary culture was used to inoculate 100 mL of LB at an optical density of 600 nm (OD<sub>600</sub>) equal to 0.1. The culture was incubated at 28 °C under orbital agitation (125 rpm). After 3 days, the cells pelleted by centrifugation (Sigma, 2K15, 5000 g, 20 min) were washed twice with sterile distilled water. Cells suspension was adjusted to an OD<sub>600</sub> of 0.5 corresponding to a bacterial concentration between 10<sup>7</sup> and 10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup> a final as suggested by Larcher et al. (2003). The purity and the CFU mL<sup>-1</sup> of the inoculum were carried out by counting the colony forming unit on plates.

#### 4.2.4. AMF inoculum

Inocula consisted of ultramafic soil of single species cultures with Sorghum. The substrate of each pure culture was verified for the presence of viable AMF spores of the correct morphotype. Inoculum of each AMF isolate consisted of 20 g of mixture of rhizosphere soil containing

homogenized spores, mycelium and colonized small root fragments. The inoculum (20g of soil) contained 600 spores (approximately 360 spores of *Rhizophagus neocaledonicus* and 240 spores of *Claroideoglossum etunicatum* nc).

#### 4.2.5. Ultramafic substrate

The substrate used was a mixture composed with (i) 2mm sieved colluvial lateritic soil (ferralsol) sampled in Plum area in New Caledonia (22°16'59''S, 166°39'12''E) and (ii) commercial compost (4:1 v/v). Characteristics of the ferralsol are: coarse sand, 39.4%; fine sand, 22.1%; silt-clay, 37.2%; pH H<sub>2</sub>O, 5.9; pH KCl, 5.6; total C, 42.1 g kg<sup>-1</sup>; total N, 2.2 g kg<sup>-1</sup>; total P, 147 mg kg<sup>-1</sup>; available P (Mehlich), 3 mg kg<sup>-1</sup>; total Ca, 1.06 g kg<sup>-1</sup>; total Mg, 5.08 g kg<sup>-1</sup>; Ca/Mg, 0.207. Metals concentrations of the ferralsol are as follows: Co, 0.87 g kg<sup>-1</sup>; Cr, 22 g kg<sup>-1</sup>; Fe, 348 g kg<sup>-1</sup>; Mn, 10 g kg<sup>-1</sup>; Ni, 5.6 g kg<sup>-1</sup> and available metal extracted by dimethylene triaminopentaacetic acid (DTPA) are as follows: Co<sub>DTPA</sub>, 68 mg kg<sup>-1</sup>; Cr<sub>DTPA</sub>, 0.17 mg kg<sup>-1</sup>; Fe<sub>DTPA</sub>, 71 mg kg<sup>-1</sup>; Mn<sub>DTPA</sub>, 1.1 g kg<sup>-1</sup>; Ni<sub>DTPA</sub>, 130 mg kg<sup>-1</sup>. The composition of commercial compost is as follows: N, 1.7 mg g<sup>-1</sup>; P<sub>total</sub>, 150 mg kg<sup>-1</sup>; P<sub>Olsen</sub>, 7 mg kg<sup>-1</sup>; K, 139 mg kg<sup>-1</sup> (Terreau universel, Agrofino, France). The compost amended ultramafic soil was autoclaved three times at 120 °C for 1 h, with an interval of 24 h before being used in the greenhouse. The addition of the commercial compost to the substrate for the greenhouse experiment was necessary because the growth of the plantlets is very slow in a sterile pure lateritic topsoil under greenhouse conditions.

#### 4.2.6. Pots experiment

*T. comosa* and *M. laurifolia* seeds, provided by SIRAS Pacifique (Noumea), were sown on the substrate described previously. After four months, the seedlings were washed with sterile water and transplanted into one-liter plastic containers filled with the compost amended ultramafic soil. For bacterial treatments, 5 ml of bacterial suspension was applied on roots of each plantlet during transplantation. For AMF treatments, plants were inoculated separately with 20 g of the



AMF inoculum placed in contact of the roots before potting the plants. For co-inoculation treatments (AMF and bacteria), 5 ml of bacterial suspension and 20 g of AMF inoculum were applied on roots of each plantlet. Control treatment consisted of 5ml of sterilized water applied to a set of control plants and 20 g of autoclaved soil. Fifteen replicate pots for each treatment (AMF, bacterial, co-inoculation and control) were set up, for the two plants species for a total of 120 pots. Plants were grown under greenhouse conditions (8 months for *T. comosa* and 7 months for *M. laurifolia*) and were irrigated manually every two days with water. Each two months, growth monitoring was carried out, by measuring the height of the largest leaf for *T. comosa* (the plant does not have a stem) and of the stem for *M. laurifolia*. Two weeks before harvest, soil samples (20 g) were recovered for the evaluation of AMF sporulation. Approximately 50 mg of fresh roots of each plant were also collected for the evaluation of mycorrhizal colonization. At the end of the experiment, all the plants were harvested and the soil was removed from roots by extensive washing. The shoots and roots were separated and their respective biomasses were weighed after 72 h drying at 60 °C, as suggested by (Huang et al. 2017).

#### **4.2.7. Mycorrhizal colonization**

For each treatment, fine roots of all samples were taken. The roots were stained with Trypan blue (Koske and Gemma 1989). Root fragments were placed in 10% KOH bath at 90 °C for 90 min. The roots were then washed with distilled water and stained with Trypan blue (15 min at 90 °C). For each plant, 10 root segments of 1-2 cm length were mounted on glass slides in 10% glycerol and observe under an optical microscope. A root segment was considered to be mycorrhized when arbuscules, vesicles or intracellular hyphal coils were clearly identified. Mycorrhizal density (M), mycorrhizal frequency (F), arbuscular abundance (A) were determined according to Trouvelot et al. (1986). Arbuscules were not quantified in *T. comosa*.

The oxidic nature of the soils in which the roots were lying (dominance of iron oxy-hydroxides dark red in colour) made the visualisation of arbuscules difficult (Perrier et al. 2006).

#### **4.2.8. Quantification of AMF viable spores in soil**

Subsamples were taken at six and half month and seven and half month for *M. laurifolia* and *T. comosa* respectively. Spores were extracted by wet sieving and sucrose density gradient centrifugation, using a modified method of Daniels and Skipper (1982). For each pot culture, 20 g of dried soil were wet sieving and were suspended in 20 mL of water in a 50 mL conic tube. A 25-mL sucrose solution (70% v/w) was injected to the bottom of the tube; forming a stepped density gradient that was centrifuged at 900 g for 3 min. Spores of AMF were collected from the interface of sucrose solution, washed with tap water on a 36 µm sieve for 2 min, and transferred to a 50 mL conic tube with 10 mL of water. Finally, conic tube was vortexed and 10 successive aliquots of 100 µL were immediately transferred to Petri dishes square to count and identify spores under a stereomicroscope. The number of viable spores was finally expressed for 100 g of soil.

#### **4.2.9. Chemical analysis**

The fifteen samples of plant tissues were pooled by five and ground to powder. Detectable quantities of Ca, Mg, Na, K, P, Co, Cr, Fe, Mn and Ni in shoots and roots were measured by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP OES, Varian®, Varian 730-ES, Palo Alto, USA) after digestion in a mixture (4:1, v/v) of HNO<sub>3</sub> (69%) and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (37%) at Laboratoire des Moyens Analytiques (LAMA-US IMAGO-IRD, New Caledonia). The gain or loss of element was calculated as [(Concentration in the tissue of inoculated plant – Concentration in the tissue of control plant) \* 100] / Concentration in the tissue of control plant] (Gonin et al. 2013). Nutrient content which correspond to the quantity of nutrient uptake by the plant was calculated as [(Shoot concentration \* Shoot dry weight) + (Root concentration \* Root

dry weight)]. The Translocation Factor (TF) was calculated as [Concentration in the shoots of inoculated plant / Concentration in the roots of inoculated plant] (Galal and Shehata 2015).

#### 4.2.10. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R software version 3.3.1 (R Core Team, 2018). For growth over time, comparisons were carried out using a repeated Anova. All other data were analyzed with a parametric tests (t student test; one-way ANOVA, followed by the Tukey's HSD; Honestly Significant Difference test;  $P < 0.05$ ) or with non-parametric tests (Wilcoxon sign test; Kruskal-Wallis test; followed by a Fisher LSD, Least Significant Difference test;  $P < 0.05$ ) when data did not follow the assumptions of a parametric test. Methods were applied independently for each plant species and each variable. Finally, a Principal Component Analysis (PCA) was made followed by a Hierarchical Clustering on Principal Components (HCPC).

### 4.3. Results

#### 4.3.1. Mycorrhizal colonization

The mycorrhizal density (M), the mycorrhizal frequency (F) and the abundance of arbuscules (A) for the two plant species inoculated with AMF are illustrated in Fig 4.1 and the data used are reported in Table S4.2. Mycorrhizal structures were not detected in the roots of non-mycorrhizal plants. Mycorrhizal density for the co-inoculated plants of *T. comosa* (Fig.1a) was relatively low ( $7.1 \pm 1.9\%$ ), but significantly higher than the AMF treatment which was nearly nil, and F value was  $33.5 \pm 5.4\%$ , 14 times significantly higher than the AMF treatment. The mycorrhizal frequency for the co-inoculation treatment of *M. laurifolia* (Fig.1b) was equal to  $71 \pm 5\%$ , 1.4 times significantly higher than the AMF treatment. Although no significant differences were found, a greater M ( $18 \pm 3\%$ , two times upper) and A ( $4.3 \pm 2.1\%$ , eleven times upper) were observed on *M. laurifolia* roots following the co-inoculation with *C. citreum* BE compared to the single inoculation of the AMF.

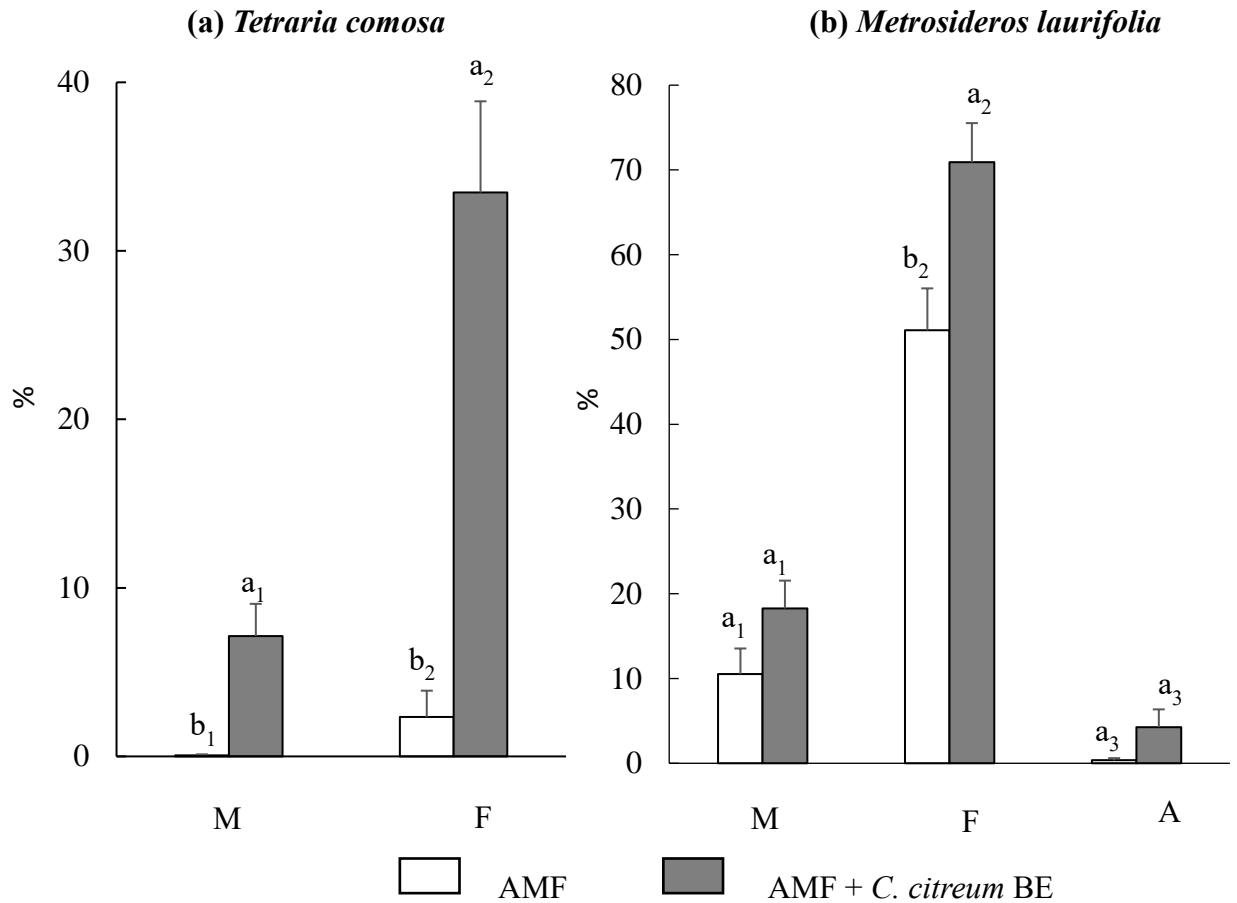
**4.3.1. Spore quantification**

The spore production in relation to the treatments is reported in Table 4.1. The spore production in the inoculated pots was relatively low (less than 400 per 100 g of soil). The co-inoculation treatment of the two plant species increased the number of spores for both AMF species when compared to the AMF treatment. The co-inoculation treatment of *T. comosa* significantly increased the number of spores of *R. neocaledonicus* (three times) when compared with the AMF treatment. The number of spores of *C. etunicatum nc* increased with the inoculation of *C. citreum* BE (two times) compared to the single inoculation of the AMF but it was not significantly different. The co-inoculation treatment on *M. laurifolia* significantly increased the spores of *R. neocaledonicus* (two times) and the spores of *C. etunicatum nc* (two times) when compared to the AMF treatment.

**Table 4.1** AMF spore production in pots of *Tetraria comosa* (after 7.5 months) and *Metrosideros laurifolia* (after 6.5 months) inoculated with AMF (mean  $\pm$  SE n = 15).

Plant	Treatment	<i>Rhizophagus neocaledonicus</i>		<i>Claroideoglossum etunicatum nc</i>	
		(spores 100g soil <sup>-1</sup> )		(spores 100g soil <sup>-1</sup> )	
<i>T. comosa</i>	AMF	123	$\pm$ 42b <sub>1</sub>	75	$\pm$ 20a <sub>2</sub>
	AMF + <i>C. citreum</i> BE	228	$\pm$ 40a <sub>1</sub>	158	$\pm$ 37a <sub>2</sub>
<i>M. laurifolia</i>	AMF	99	$\pm$ 23b <sub>3</sub>	157	$\pm$ 42b <sub>4</sub>
	AMF + <i>C. citreum</i> BE	210	$\pm$ 40a <sub>3</sub>	356	$\pm$ 65a <sub>4</sub>

Value with the same lower case letters are not significantly different at  $P < 0.05$  according to Wilcoxon sign test. Same coefficient to letters refers to analysis of one AMF species sporulation for one plant species.



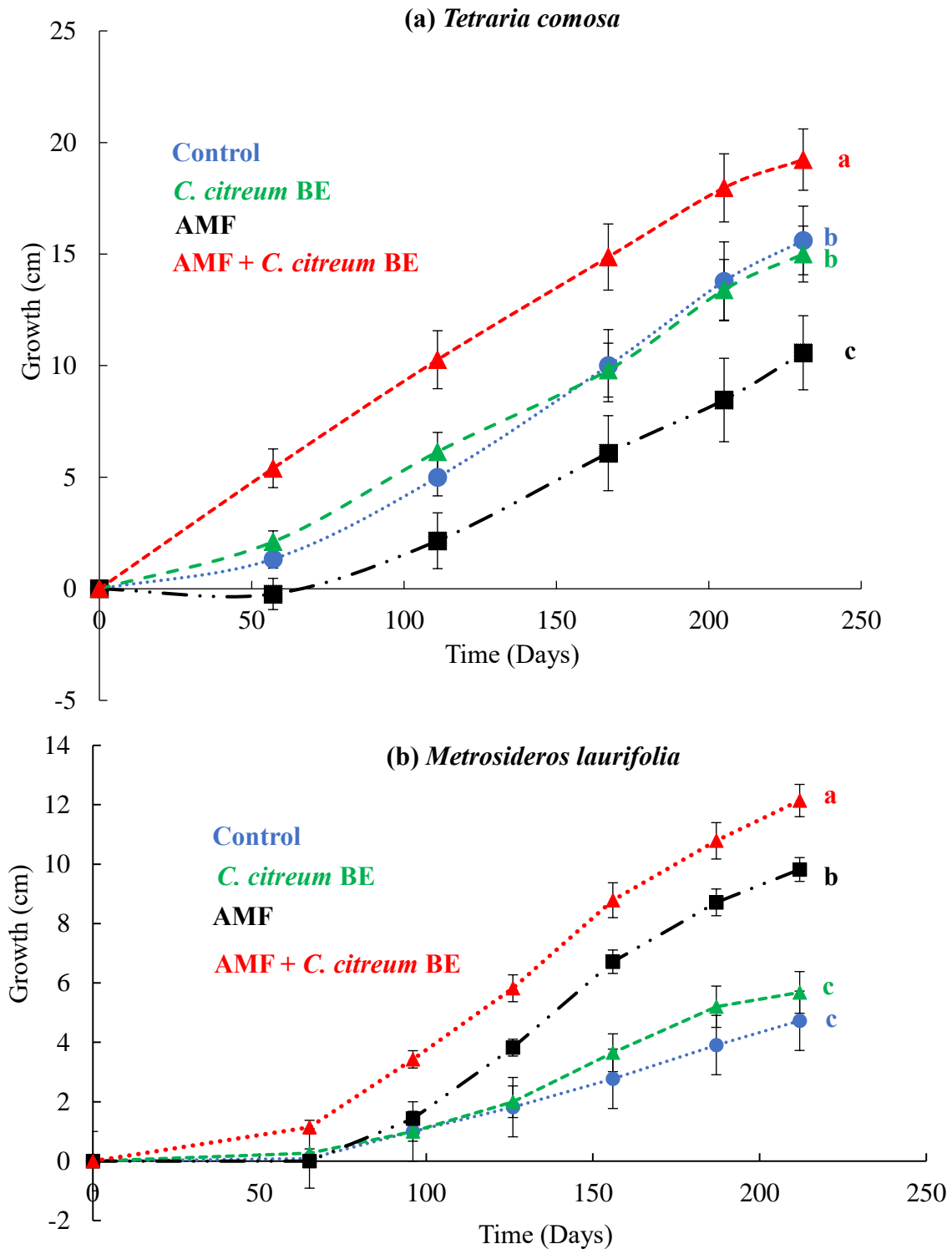
**Fig 4.1** Density (M), Frequency (F) of mycorrhization and Arbuscular abundance (A) of (a) *Tetraria comosa* (after 8 months) and (b) *Metrosideros laurifolia* (after 7 months). Bars represent means, and error bars represent standard errors (n = 15). Mycorrhizal structures were not observed in control and in plants inoculated only with *C. citreum* BE. Arbuscules could not be observed in *T. comosa* root. Value with the same lower case letters are not significantly different at  $P < 0.05$  according to Wilcoxon sign test. Same coefficient to letters refers to analysis of one mycorrhizal parameter for one plant species.

### 4.3.2. Plant height

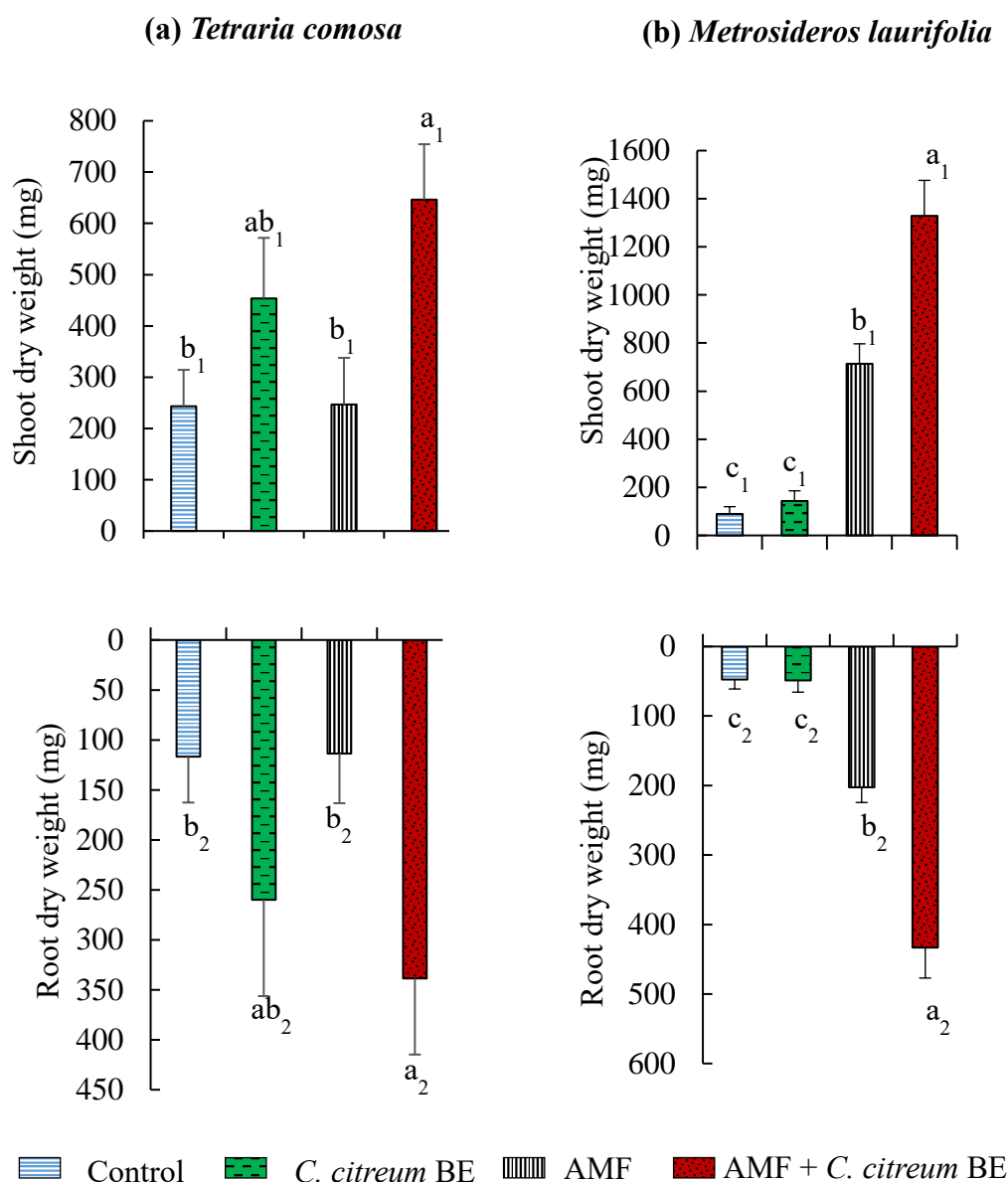
The influence of bacterial and/or AMF inoculation on growth of the two plant species are illustrated in Fig 4.2 and the data used are reported in Table S4.3 and S4.4 For the two plant species, the co-inoculation treatment significantly enhanced plant height. Significant differences were not observed between control and plants inoculated only with *C. citreum* BE. Regarding, plants with only the AMF, the response differed according to the plant species, for *M. laurifolia*, plants inoculated only with the AMF was the second better treatment while for *T. comosa*, a negative effect compared to the controls is observed.

### 4.3.3. Shoot and root biomasses

The influence of bacterial and/or AMF inoculation on dry weight of the shoots and the roots of the two plant species are presented in Fig 4.3 and the data used are reported in Table S4.5 Shoot and root dry weight of co-inoculated plants of *T. comosa* (Fig 4.3a) showed the only values significantly higher than the control with a mean three times higher for the shoots ( $646 \pm 108$  mg) and the roots ( $339 \pm 76$  mg). For *M. laurifolia* (Fig 4.3b), significant increases of dry weight tissues were observed (in average, eight times higher for the shoots and four times for the roots) between plants inoculated with the AMF and control plants. The co-inoculation treatment increased shoot ( $1329 \pm 148$  mg; fifteen times) and root ( $433 \pm 44$  mg; nine times) dry weight when compared to the control. Significant increases of dry weight were observed in *M. laurifolia* co-inoculated with the AMF and *C. citreum* BE for shoots (two times) and roots (two times) compared with *M. laurifolia* plants inoculated only with the AMF. The visual differences between the tested treatments are presented in FigS4.1 and S4.2.



**Fig 4.2** Influence of bacterial and/or AMF inoculation on (a) *Tetraria comosa* and (b) *Metrosideros laurifolia* growth (means values of gain of height with standard errors) in greenhouse experiment. Curve with the same lower case letters are not significantly different at  $P < 0.05$  according to repeated anova test.



**Fig 4.3** Influence of bacterial and/or AMF inoculation on (a) *Tetraria comosa* (after 8 months) and (b) *Metrosideros laurifolia* (after 7 months) biomasses (dry weight). Bars represent means, and error bars represent standard errors (n = 15). Value with the same lower case letters are not significantly different at P < 0.05 according to LSD test. Same coefficient to letters refers to analysis of one plant part analysis for one plant species.

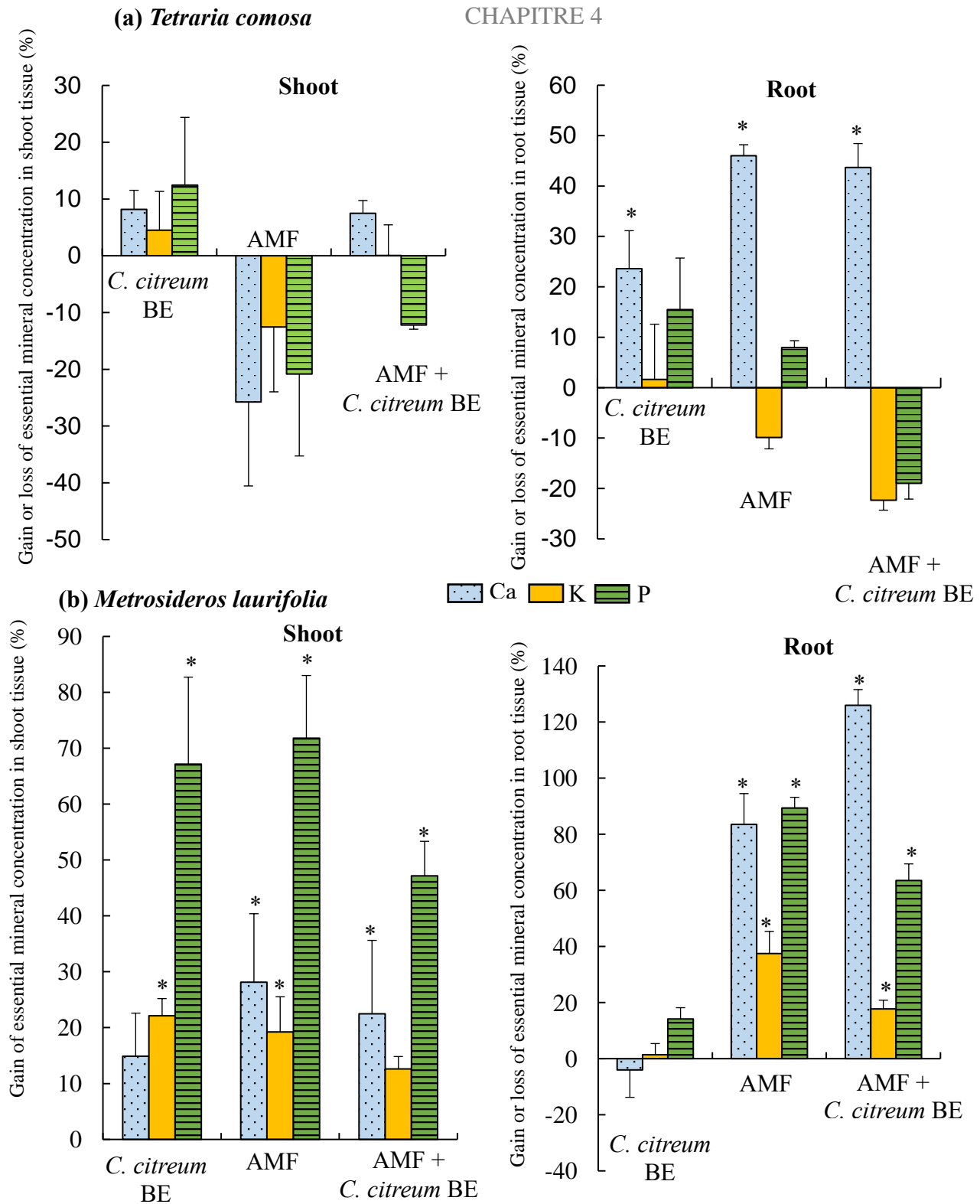
#### 4.3.4. Nutrient analysis

Variation of Ca, K and P contents in roots and shoots of the two inoculated-plants in comparison with the non-inoculated ones are presented in Fig 4.4 while full data are reported in Table S4.6. For *T. comosa* (Fig 4.4a), no significant differences were observed for mineral concentration in shoots of the different treatments. In roots of *T. comosa*, the inoculation with *C. citreum* BE



have significantly enhanced Ca concentration ( $2.0 \pm 0.1 \text{ g. kg}^{-1}$ ; 23%) when compared to the control. The presence of the AMF (single inoculation and co-inoculation treatments) have improved Ca concentration in *T. comosa* roots (in average,  $2.3 \pm 0.1 \text{ g. kg}^{-1}$ ; 46%) when compared to the control resulting in a significant increase of Ca/Mg ratio in roots (in average  $1.5 \pm 0.02$ ; 38%; Table 4.2). In shoots of *M. laurifolia*, inoculation with *C. citreum* BE have significantly enhanced K concentration ( $9.3 \pm 0.2 \text{ g. kg}^{-1}$ ; 22%) and P concentration ( $421 \pm 39 \text{ mg. kg}^{-1}$ ; 67%) when compared to the control (Fig 4.4b). The two treatments containing AMF also induced an increase of Ca concentration (in average,  $8.8 \pm 0.9 \text{ g. kg}^{-1}$ ; 25%) and P concentration (in average,  $401 \pm 22 \text{ mg. kg}^{-1}$ ; 60%) in shoots of *M. laurifolia* when compared to the control. In roots, AMF inoculations have enhanced K concentrations (in average,  $10.4 \pm 0.5 \text{ g. kg}^{-1}$ ; 28%) and P concentration (in average,  $415 \pm 10 \text{ mg. kg}^{-1}$ ; 77%) of plant tissues of *M. laurifolia* when compared to the control. Calcium concentration in roots of *M. laurifolia* was significantly enhanced with AMF ( $5.5 \pm 0.3 \text{ g. kg}^{-1}$ ; 84%) and for co-inoculated plants ( $6.8 \pm 0.2 \text{ g. kg}^{-1}$ ; 126%) when compared to the control (Fig.4b).

No significant differences of the Ca/Mg ratio was induced by all the treatments in shoot tissues of *T. comosa* (Table 4.2). In root tissues the AMF treatment significantly enhanced Ca/Mg ratio (in average,  $1.5 \pm 0.02$ ; 38%) when compared to the control. In shoots of *M. laurifolia*, the presence of AMF, with and without *C. citreum* BE, significantly enhanced Ca/Mg ratio (in average,  $2.5 \pm 0.1$ ; 25%) compared to the control. The Ca/Mg ratio in root is enhanced (i) from 46% ( $1.5 \pm 0.1$ ) with the inoculation of the AMF and (ii) from 79% ( $1.88 \pm 0.03$ ) with the co-inoculation treatment when compared to the control.



**Fig 4.4** Effect of inoculation on essential mineral concentration in (a) *Tetraria comosa* (after 8 months) and (b) *Metrosideros laurifolia* (after 7 months) grown on ultramafic substrate. Relative variations of element concentration in shoots and roots are expressed as % of element concentration in dry mass of tissues of inoculated plants compared with controls. Bars represent means, and error bars represent standard errors (n = 3). “\*” indicates significant differences compared to the control at P < 0.05 according to Tukey’s HSD or Fisher LSD test.

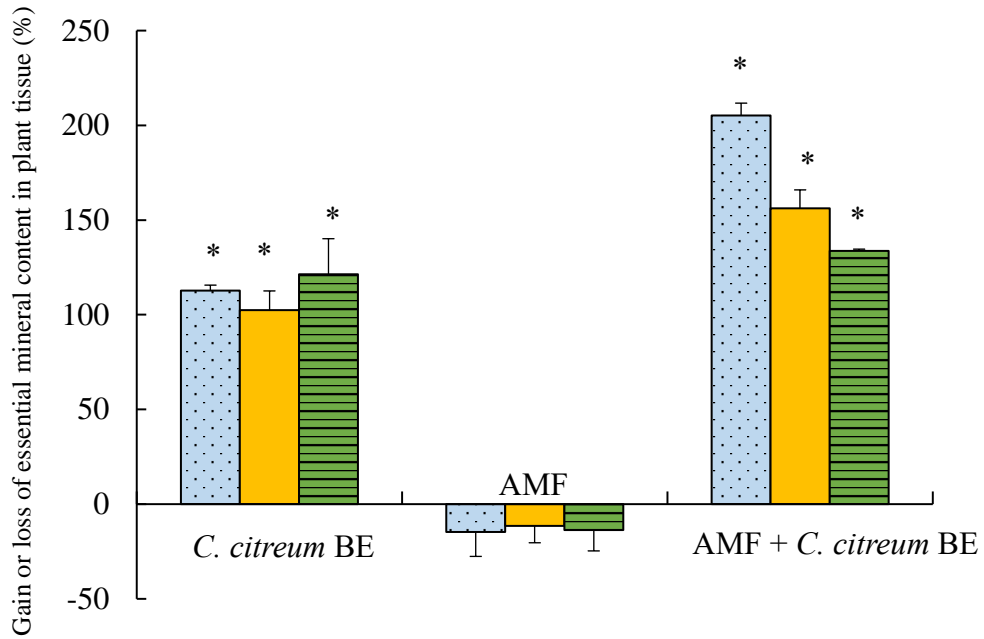
**Table 4.2** Ca/Mg ratio in (after 8 months) and *Metrosideros laurifolia* (after 7 months) as a function of various treatments (mean  $\pm$  SE n = 3).

Plant	Treatment	Ca/Mg in shoot	Ca/Mg in root
<i>T. comosa</i>	Control	2.63 $\pm$ 0.10a <sub>1</sub>	1.09 $\pm$ 0.04b <sub>2</sub>
	<i>C. citreum</i> BE	2.94 $\pm$ 0.18a <sub>1</sub>	1.06 $\pm$ 0.04b <sub>2</sub>
	AMF	2.58 $\pm$ 0.18a <sub>1</sub>	1.49 $\pm$ 0.02a <sub>2</sub>
	AMF + <i>C. citreum</i> BE	3.07 $\pm$ 0.04a <sub>1</sub>	1.44 $\pm$ 0.01a <sub>2</sub>
<i>M. laurifolia</i>	Control	2.00 $\pm$ 0.05b <sub>3</sub>	1.05 $\pm$ 0.01c <sub>4</sub>
	<i>C. citreum</i> BE	2.05 $\pm$ 0.06b <sub>3</sub>	0.90 $\pm$ 0.07c <sub>4</sub>
	AMF	2.51 $\pm$ 0.10a <sub>3</sub>	1.53 $\pm$ 0.05b <sub>4</sub>
	AMF + <i>C. citreum</i> BE	2.48 $\pm$ 0.15a <sub>3</sub>	1.88 $\pm$ 0.03a <sub>4</sub>

Value with the same lower case letters are not significantly different at  $P < 0.05$  according to Tukey's HSD. Same coefficient to letters refers to analysis of one plant part for one plant species.

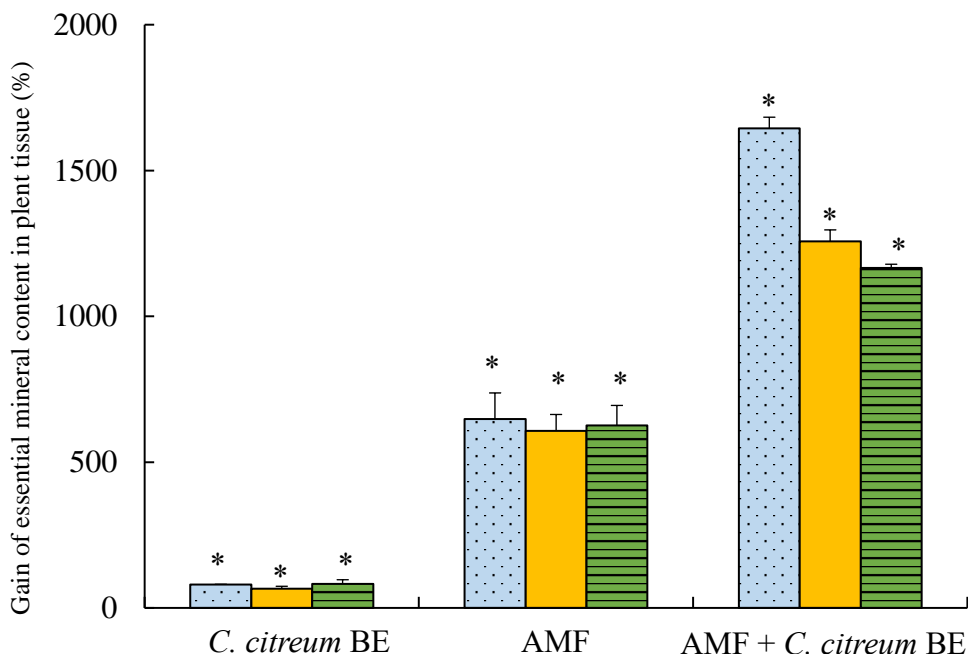
Variation of the Ca, K and P content in the roots and shoots of the *T. comosa* inoculated-plants in comparison to the non-inoculated plants are presented in Fig 4.5a, while full data are reported in Table S4.7. In relation to the high biomass increase, the co-inoculation treatment significantly enhanced Ca content (3.8 mg plant<sup>-1</sup>; 205%), K content (7.5 mg plant<sup>-1</sup>; 156%) and P content (290  $\mu$ g plant<sup>-1</sup>; 134%) when compared to the control. The inoculation of *C. citreum* BE significantly enhanced Ca, K and P contents compared to the control. No significant differences were observed between AMF inoculated plants of *T. comosa* and the control. Variation of the Ca, K and P content in the roots and shoots of *M. laurifolia* inoculated-plants in comparison to the non-inoculated plants are presented in Fig 4.5b while full data are reported in Table S4.7. In relation to the high biomass increase, all treatment significantly increased Ca, K and P contents in shoot and root in relation to the increase of the biomass. The co-inoculation treatment significantly enhanced Ca content (9.1 mg plant<sup>-1</sup>; 1644%), K content (18.46 mg plant<sup>-1</sup>; 1257%) and P content (730  $\mu$ g plant<sup>-1</sup>; 1166%) in plant tissues when compared to the control.

(a) *Tetraria comosa*



(b) *Metrosideros laurifolia*

Ca K P



**Fig 4.5** Effect of inoculation on essential mineral content in (a) *Tetraria comosa* (after 7 months) and (b) *Metrosideros laurifolia* (after 8 months) grown on ultramafic substrate. Relative variations of element content in shoots and roots are expressed as % of element content in dry mass of tissues of inoculated plants compared with controls. Bars represent means, and error bars represent errors (n = 3). “\*” indicates significant differences compared to the control at P < 0.05 according to Tukey’s HSD or Fisher LSD test.

### 4.3.1. Metal content analysis

Variation of metal content in roots and shoots of the two inoculated-plants species in comparison to the non-inoculated ones are expressed using the translocation factor (TF) presented in Table 4.3. Variation of metal content in shoot and root are presented in FigS4.3 and full data are reported in Table S4.8. Metal TF in *T. comosa* were divided in average by three for Co (in average,  $0.13 \pm 0.04$ ) and by two for Cr (in average,  $0.19 \pm 0.05$ ) and Ni (in average,  $0.5 \pm 0.06$ ) for all the AMF treatments in comparison with control (Table 3). Regarding *M. laurifolia* significant diminution of Co, Cr and Fe translocation factors compared to the control were also observed in the AMF treatments. Translocation factors were dividing in average by three for Co ( $0.02 \pm 0.00$ ) and Fe ( $0.01 \pm 0.00$ ) and by five for Cr ( $0.01 \pm 0.00$ ) when compared to the control. For the two plant species, no significant differences were observed between plants inoculated with *C. citreum* BE and the controls.

CHAPITRE 4

**Table 4.3** Translocation factor (TF) in *Tetraria comosa* and *Metrosideros laurifolia* as a function of various treatments (mean  $\pm$  SE n = 3).

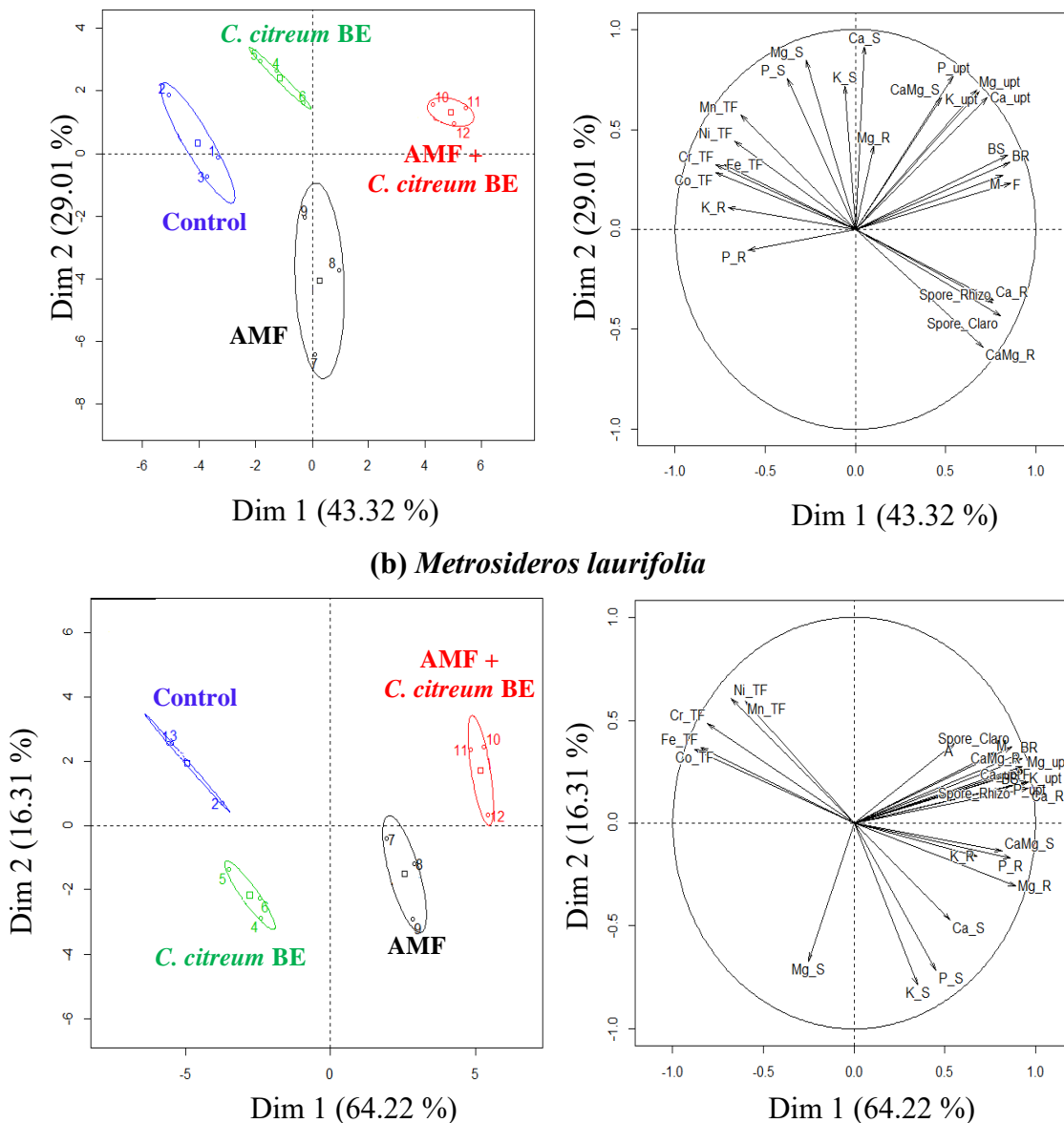
		Co	Cr	Fe	Mn	Ni
<i>T. comosa</i>	Control	0.38 $\pm$ 0.05a <sub>1</sub>	0.52 $\pm$ 0.08a <sub>2</sub>	0.34 $\pm$ 0.05a <sub>3</sub>	0.54 $\pm$ 0.05ab <sub>4</sub>	1.09 $\pm$ 0.16a <sub>5</sub>
	<i>C. citreum</i> BE	0.24 $\pm$ 0.04ab <sub>1</sub>	0.32 $\pm$ 0.07ab <sub>2</sub>	0.23 $\pm$ 0.06ab <sub>3</sub>	0.57 $\pm$ 0.06a <sub>4</sub>	0.68 $\pm$ 0.07ab <sub>5</sub>
	AMF	0.14 $\pm$ 0.04b <sub>1</sub>	0.18 $\pm$ 0.04b <sub>2</sub>	0.12 $\pm$ 0.04b <sub>3</sub>	0.32 $\pm$ 0.03b <sub>4</sub>	0.44 $\pm$ 0.06b <sub>5</sub>
	AMF + <i>C. citreum</i> BE	0.15 $\pm$ 0.03b <sub>1</sub>	0.20 $\pm$ 0.05b <sub>2</sub>	0.14 $\pm$ 0.03ab <sub>3</sub>	0.35 $\pm$ 0.06ab <sub>4</sub>	0.56 $\pm$ 0.06b <sub>5</sub>
		Co	Cr	Fe	Mn	Ni
<i>M. laurifolia</i>	Control	0.05 $\pm$ 0.01a <sub>6</sub>	0.05 $\pm$ 0.01a <sub>7</sub>	0.03 $\pm$ 0.01a <sub>8</sub>	1.20 $\pm$ 0.11a <sub>9</sub>	0.07 $\pm$ 0.01a <sub>10</sub>
	<i>C. citreum</i> BE	0.03 $\pm$ 0.00ab <sub>6</sub>	0.02 $\pm$ 0.00b <sub>7</sub>	0.02 $\pm$ 0.00ab <sub>8</sub>	0.87 $\pm$ 0.11ab <sub>9</sub>	0.04 $\pm$ 0.01ab <sub>10</sub>
	AMF	0.02 $\pm$ 0.00b <sub>6</sub>	0.01 $\pm$ 0.00b <sub>7</sub>	0.01 $\pm$ 0.00b <sub>8</sub>	0.62 $\pm$ 0.09b <sub>9</sub>	0.03 $\pm$ 0.01b <sub>10</sub>
	AMF + <i>C. citreum</i> BE	0.02 $\pm$ 0.00b <sub>6</sub>	0.01 $\pm$ 0.00b <sub>7</sub>	0.01 $\pm$ 0.00b <sub>8</sub>	0.88 $\pm$ 0.04ab <sub>9</sub>	0.04 $\pm$ 0.00ab <sub>10</sub>

Value with the same lower case letters are not significantly different at P < 0.05 according to Tukey's HSD. Same coefficient to letters refers to analysis of one TF for one plant species.

### 4.3.2. Global analysis

In view of the high number of variables, a Principal Component Analysis (PCA) was carried out for each plant species. PCA results are presented in Fig 4.6. The analysis showed that two principal components (PC1 and PC2) explained 72.33% of the total variation for *T. comosa* (Fig 4.6a) and 80.53% for *M. laurifolia* (Fig 4.6b). For the two plant species, each sample is grouped by treatment that was significantly different. The variables involved in the clustering of each group are presented in Table S4.9. Control plants of *Tetraria comosa* (Fig 4.6a) are characterized by significantly higher Co, Cr, Fe and Ni translocation compared to the other treatments. The plants co-inoculated with the AMF and *C. citreum* BE are characterised by significantly higher (i) level of mycorrhizal density and mycorrhizal frequency, (ii) number of spores, (iii) root and shoot biomasses, (iv) content of Ca, Mg K and P compared to the other treatments. Regarding *M. laurifolia* (Fig 4.6b), the controls are characterised by significantly higher Co, Cr, Fe, Mn and Ni translocation and by lower (ii) P and K concentration in shoot and P and Mg concentration in root compared to the others treatments. The plants co-inoculated with the AMF and *C. citreum* BE are characterised by significantly higher (i) level of mycorrhizal density, mycorrhizal frequency and arbuscular abundance, (ii) number of spores, (iii) root and shoot biomasses, (iv) content of Mg, Ca, K and P, (v) concentration of Ca in root.

(a) *Tetraria comosa*



**Fig 4.6** Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Classification on Principal Component (HCPC). PCA and HCPC were performed for (a) *Tetraria comosa* with 25 variables: dry weight tissue of shoot (BS) and roots (BR), density (M) and frequency (F) of mycorrhization, sporulation of *Rhizophagus neocaledonicus* (Spore\_Rhizo) and *Claroideoglomus etunicatum nc* (Spore\_Claro), major element concentration in shoot (ie. Ca<sub>S</sub>) and roots (ie. Ca<sub>R</sub>) (Ca, Mg, K, P), major element content (ie. Ca<sub>upt</sub>) (Ca, Mg, K, P), Ca/Mg ratio in shoot (CaMg<sub>S</sub>) and roots (CaMg<sub>R</sub>) and metal translocation factor (ie. Co<sub>TF</sub>) (Co, Cr, Fe, Mn, Ni) and (b) 26 variables (same variables + the abundance of arbuscules (A)) for *Metrosideros laurifolia*. Analyses were carried out using R software with the ‘FactoMineR’ package. HCPC used Euclidean distances for calculating dissimilarities between observations and average method to define cluster.



## CHAPITRE 4

In order to determine the correlations between the different variables, a correlogram was performed (available in FigS4.4) and the correlations between the biomasses and the other variables are presented in Table 4.4. Regarding *T. comosa*, significant positive correlations were observed between the biomasses and (i) sporulation (in average, 0.82), (ii) mycorrhizal colonization (in average, 0.95), (iii) Ca/Mg ratio (in average, 0.75) and nutrient content (in average, 0.89). Significant negative correlation were observed with the metal translocation factor (in average, -0.80) and P content (in average, -0.70). For *M. laurifolia*, significant positive correlations were observed between the biomasses and (i) sporulation (in average, 0.99), (ii) mycorrhizal colonization (in average, 0.95), (iii) Ca, K and P concentration (in average, 0.76), (iv) Ca/Mg ratio (in average, 0.96) and nutrient content (in average, 1). Significant negative correlations were observed with the metal translocation factor (in average, -0.80).

CHAPITRE 4

**Table 4.4** Correlation coefficient of shoot biomass (BS) and root biomass (BR) with the 23 variables: density (M) and density (F) of mycorrhization, sporulation of *Rhizophagus neocaledonicus* (Spore\_Rhizo) and *Claroideoglo mus etunicatum* (nc) (Spore\_Claro), major element concentration in shoot (ie. Ca\_S) and roots (ie. Ca\_R) (Ca, Mg, K, P), major element content (ie. Ca\_upt) (Ca, Mg, K, P), Ca/Mg ratio in shoot (CaMg\_S) and roots (CaMg\_R) and metal translocation factor (ie. Co\_TF) (Co, Cr, Fe, Mn, Ni) for *Tetraria comosa* and the 24 variables (same variables + the abundance of arbuscules (A)) for *Metrosideros laurifolia*.

		Spore_Rhizo	Spore_Claro	F	M	Ca_S	Mg_S	K_S	P_S	Ca_R	Mg_R	K_R		
<i>Tetraria comosa</i>	BS	0.8	0.81	0.97	0.95	NS	NS	NS	-0.49	0.79	NS	0.89		
	P value	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.455	0.1145	0.7422	0.012	< 0.0001	0.3099	< 0.0001		
	BR	0.84	0.83	0.98	0.98	NS	NS	NS	-0.54	0.79	NS	0.87		
	P value	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.633	0.0733	0.6043	0.0056	< 0.0001	0.5501	< 0.0001		
		P_R	CaMg_S	CaMg_R	Co_TF	Cr_TF	Fe_TF	Mn_TF	Ni_TF	Ca_upt	Mg_upt	K_upt	P_upt	
	BS	-0.86	0.8	0.71	-0.85	-0.84	-0.84	-0.73	-0.74	0.95	0.92	0.93	0.82	
	P value	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	
	BR	-0.9	0.76	0.74	-0.83	-0.83	-0.82	-0.75	-0.74	0.93	0.9	0.91	0.78	
	P value	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	
			Spore_Rhizo	Spore_Claro	F	M	A	Ca_S	Mg_S	K_S	P_S	Ca_R	Mg_R	K_R
	<i>Metrosideros laurifolia</i>	BS	0.98	0.99	0.99	0.97	0.89	0.68	-0.6	0.52	0.62	0.99	0.92	0.89
		P value	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.0001	0.0013	0.0059	0.0008	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
BR		0.98	0.99	0.99	0.97	0.9	0.65	-0.62	0.48	0.57	0.99	0.91	0.87	
P value		< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.0003	0.7	0.0128	0.0023	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	
		P_R	CaMg_S	CaMg_R	Co_TF	Cr_TF	Fe_TF	Mn_TF	Ni_TF	Ca_upt	Mg_upt	K_upt	P_upt	
BS		0.94	0.92	1	-0.93	-0.9	-0.93	-0.81	-0.84	1	1	1	1	
P value		< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.0001	
BR		0.92	0.91	1	-0.91	-0.87	-0.91	-0.77	-0.81	1	1	1	1	
P value		< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.0001	

NS: No significant correlation (P > 0.05)

## 4.4. Discussion

Overall, the tested treatments showed different positive effects on growth and tolerance to ultramafic soil of the two endemic plant species.

### 4.4.1. Effects of the treatments on mycorrhizal colonization

The evaluation of the mycorrhization showed that the co-inoculation with *C. citreum* BE clearly enhanced the mycorrhizal colonization for the two plant species. The stimulation of mycorrhizal colonization by bacteria was reported by different studies (Vivas et al. 2006a,b; Fernández Bidondo et al. 2016; Long et al. 2017; Xie et al. 2018). The main mechanisms involved are the promotion of spore germination and hyphal growth (Frey-Klett et al. 2007; Koele et al. 2009; Selvakumar et al. 2018). Improvements of spore germination and hyphal elongation were reported after the inoculation of a strain of *Curtobacterium* to *Glomus margarita* on *Medicago sativa* (Long et al. 2017). The authors explained this phenomenon by the ability of their *Curtobacterium* strain to degrade chitin, which is one of main components of AMF spore walls, and thereby improved fungal spore germination. Knowing that *Curtobacterium* species are reported as among the most chitin degraded bacteria (Borkott and Insam, 1990), we can assume that chitin degradation is one of the mechanisms possibly involved. Moreover, preliminary results showed that AMF spore germination were enhanced in presence of *C. citreum* BE (data not shown). In New Caledonian ultramafic soils, AMF spore germination may be inhibited by high level of Ni (Amir et al. 2008). As *C. Citreum* BE showed a high metal tolerance and an ability to produce exopolysaccharide (EPS) involved in the immobilization of nickel (Bourles et al. submitted), this mechanism may also play a large part in the enhancement of mycorrhizal colonization. Moreover, EPS are implicated in biofilm formation that help the bacteria to aggregate and attach to spore walls (Bianciotto et al. 2001; Miransari 2011; Selvakumar et al. 2016). Another hypothesis that could explain the faster

establishment of mycorrhizal symbiosis is the ability of *C. citreum* BE to improve root biomass (more than two times, even if the difference with the control was not significant at  $p < 0.05$ ). The increase of root growth allowed larger areas of exchange increasing meeting opportunity with the AMF (Frey-Klett et al. 2007; Tarkka and Frey-Klett 2008). The three hypotheses are not mutually exclusive and are reported as being responsible of the improvement of the mycorrhizal colonization (Fernández Bidondo et al. 2016). All these properties matched with mycorrhiza helper bacteria definition (Frey-Klett et al. 2007; Koele et al. 2009; Selvakumar et al. 2018) and support the fact that our strain belongs to this group. The enhancement of mycorrhizal colonization in *T. comosa* is particularly interesting because its family (Cyperaceae) is generally considered as non-mycorrhizal (Brundrett and Tedersoo 2019), whereas this species endemic to New Caledonian ultramafic soils is functionally mycorrhizal with low levels of mycorrhization (Perrier et al. 2006; Lagrange et al. 2011, 2013). As *C. citreum* BE was isolated from the rhizosphere of *Tetraria* species, the role of this bacteria in mycorrhizal symbiosis of the plant may be important. The improvement of the mycorrhizal colonization by the bacteria provides additional input on the mycorrhizal status of this Cyperaceae. *Curtobacterium citreum* BE has also stimulated AMF sporulation, and this despite the low densities of spores measured. Indeed, the slow growth rate of the plants in ultramafic soil induces a slow mycorrhizal development and then also a tardive sporulation which is just beginning at 7 months.

#### **4.4.2. Effects of the treatments on plant growth**

Several studies have reported the effects of AMF inoculation on plant mineral nutrition (Smith and Smith 2011), water stress (Augé 2001) and metal toxicity (Amir et al. 2014; Wang 2017). Among these, few studies deal with the effects of AMF inoculation on growth and tolerance of *T. comosa* and *M. laurifolia* to ultramafic soils (Lagrange et al. 2013; Amir et al. 2019). In our study, the

inoculation of native AMF isolates significantly enhanced *M. laurifolia* growth. The AMF mixture used here, has been yet tested in greenhouse conditions on *M. laurifolia* (Crossay et al. submitted) and our results are in agreement with this study. Improvement of *T. comosa* growth with the AMF alone was not observed suggesting the existence of a synergistic effect between the fungal symbionts and *C. citreum* BE. A clear growth enhancement was also observed for *M. laurifolia* plants co-inoculated with the AMF and *C. citreum* BE compared to plants inoculated only with the AMF, supporting again the synergetic hypothesis. Enhancement of plant biomass by the co-inoculation of AMF and bacterial strain in comparison to AMF inoculation has already been reported (Barea et al. 2002b; Vivas et al. 2006b; Xie et al. 2018).

#### **4.4.3. Effect of the treatments on plant mineral nutrition**

The increase in growth of inoculated plants was coupled with a better mineral nutrition. On ultramafic soils, the low availability of essential mineral elements such as P, K and Ca, and the unbalanced Ca/Mg ratio are important limiting factors for plants (Brooks 1987). Regarding the role of AMF, several studies have shown a positive implication in plant nutrition by improving nutrient absorption (Smith and Smith 2011) and reducing Ca/Mg ratio (Amir et al. 2013, 2019; Crossay et al. submitted). For *M. laurifolia*, the AMF increased P, K and Ca concentration in shoot and roots. In case of *T. comosa*, only the increase of Ca concentration in roots was observed in inoculated plants. Calcium magnesium ratio was higher in the leaves and in the roots of the two plants species inoculated with the AMF. As Ca is rare and Mg abundant in ultramafic soils, this increase is an important contribution of AMF symbiosis to plant tolerance to ultramafic soils. Indeed, this low ratio is a limiting factor in these soils because of the competition between Mg and Ca (Jaffré and L'Huillier 2010b). Regarding the effect of *C. citreum* BE alone, in *M. laurifolia*, P concentration in shoots was increased, but significantly lower concentration was found in roots resulting in a

significantly higher proportion of P translocated to the aerial part in comparison with the other treatments. Bourles et al. (submitted) observed the same effect on Sorghum with the inoculation of *C. citreum* BE suggesting that *C. citreum* BE are a phosphate solubilizing bacteria (PSB). Several experiments have demonstrated synergistic microbial interactions between PSB and arbuscular mycorrhizal fungi (Barea et al. 2002a; Yousefi et al. 2011; Taktek et al. 2015; Battini et al. 2017). Phosphorus is rare and weakly available in ultramafic soils, as it is strongly adsorbed to iron oxides, particularly in New Caledonia (Dubus and Becquer 2001; Jaffré and L'huillier 2010b). The synergy between *C. citreum* BE involved in P bioavailability, thus facilitating its uptake by the AMF and its translocation from roots to shoot seems then to be crucial for plant growth in this type of soil. In *T. comosa*, this effect is less pronounced, it can be explained by the presence in this species of dauciform roots recognized as being involved in P nutrition (Lambers et al. 2006).

#### **4.4.4. Effect of the treatments on metal translocation**

Metal alleviation with the inoculation of AMF and/or bacteria on metal stress soil were earlier reported (Orłowska et al. 2011; Doubková and Sudová, 2014; Amir et al. 2014; Etesami 2018). Our results showed an alleviation of metal translocation in *M. laurifolia* and *T. comosa* in the presence of the AMF. Crossay et al. (submitted) have shown that inoculation of *Rhizophagus neocaledonicus* and *Claroideoglosum etunicatum* nc on *M. laurifolia* reduced metal translocation from roots to shoots. As metal contents in mycorrhizal roots are higher than in control ones, it seems evident that the mycorrhizal root system retained a large part of the entering metals (Amir et al. 2014, 2019; Crossay et al submitted). Regarding, the effect of *C. citreum* BE alone, in the two plants species, reduction of the metal translocations was also observed. These results are consistent with those obtained with the same strain in Sorghum (Bourles et al. submitted). These authors suggested that the EPS produced by *C. citreum* BE, which are able to chelate metal, was

responsible of the alleviation of metal translocation from root to shoot in Sorghum. Vivas et al. (2006b) showed that complementarity effect of AMF and bacteria on the alleviation of Zn could be observed. In our study, no improvement of the alleviation of metal was observed with the co-inoculation of the AMF and *C. citreum* BE compared to the plant inoculated only with the AMF. These results suggest that the AMF are mainly responsible of the alleviation of metal in plants.

Our study showed a beneficial role of the co-inoculation of AMF isolates and *C. citreum* BE, suggesting their synergetic influence on plant development. The increase in plant growth was related with (i) an improvement of mycorrhizal colonization, (ii) a better P, K and Ca nutrition, with a higher Ca/Mg ratio, and (iii) a decrease of the translocation factors of different metals. In the light of our results, it appeared that different mechanisms seem to be in place depending on the plant species requirement. Regarding all results, we suggest that co-inoculation might constitute a promising way in order to improve plant growth and plant metal tolerance on ultramafic soils. It can be used as a tool in global strategies for successfully restoring postmining ultramafic areas in New Caledonia.

### **4.5. Acknowledgements**

The authors thank the LAMA laboratory (LAMA-US IMAGO-IRD, New Caledonia) for chemical analyses and M. Voide for the technical support. We are very grateful to the South Province of New Caledonia providing the PhD grant of Alexandre Bourles. This work was supported by the Province Sud of New Caledonia (Prix d'Encouragement à la Recherche: Thesis Grant).

### **4.6. Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

## 4.7. References

- Amir H, Cavaloc Y, Laurent A, et al (2019) Arbuscular mycorrhizal fungi and sewage sludge enhance growth and adaptation of *Metrosideros laurifolia* on ultramafic soil in New Caledonia: A field experiment. *Sci Total Environ* 651:334–343. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.153>
- Amir H, Ducouso M (2010) Les bactéries et les champignons du sol su roches ultramafiques. In: L’Huillier L, Jaffré T, Wulff A (eds) Mines et environnement en Nouvelle-Calédonie : les milieux sur substrats ultramafiques et leur restauration., IAC Ed. Noumea, pp 129–145
- Amir H, Jasper DA, Abbott LK (2008) Tolerance and induction of tolerance to Ni of arbuscular mycorrhizal fungi from New Caledonian ultramafic soils. *Mycorrhiza* 19:1–6. <https://doi.org/10.1007/s00572-008-0197-y>
- Amir H, Jourand P, Cavaloc Y, Ducouso M (2014) Role of mycorrhizal fungi on the alleviation of heavy metal toxicity on plant. In: Solaiman (ed) *Mycorrhizal fungi : Use in sustainable agriculture and forestry*, Springer. Soil Biology Series
- Amir H, Lagrange A, Hassaïne N, Cavaloc Y (2013) Arbuscular mycorrhizal fungi from New Caledonian ultramafic soils improve tolerance to nickel of endemic plant species. *Mycorrhiza* 23:585–595. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0499-6>
- Augé RM (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11:3–42. <https://doi.org/10.1007/s005720100097>
- Barea J-M, Azcón R, Azcón-Aguilar C (2002a) Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:343–51 <https://doi.org/10.1023/A:1020588701325>
- Barea JM, Toro M, Orozco MO, et al (2002b) The application of isotopic ( $^{32}\text{P}$  and  $^{15}\text{N}$ ) dilution techniques to evaluate the interactive effect of phosphate-solubilizing rhizobacteria, mycorrhizal fungi and *Rhizobium* to improve the agronomic efficiency of rock phosphate for legume crops. *Nutr Cycl Agroecosystems* 63:35–42. <https://doi.org/10.1023/A:1020589732436>
- Battini F, Grønlund M, Agnolucci M, et al (2017) Facilitation of phosphorus uptake in maize plants by mycorrhizosphere bacteria. *Sci Rep* 7:4686. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04959-0>
- Bianciotto V, Andreotti S, Balestrini R, et al (2001) Extracellular polysaccharides are involved in the attachment of *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium leguminosarum* to arbuscular mycorrhizal structures. *Eur J Histochem* 45:39–49 <https://doi.org/10.4081/1612>
- Bianciotto V, Bandi C, Minerdi D, et al (1996a) An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Appl Environ Microbiol* 62:3005–10
- Bianciotto V, Minerdi D, Perotto S, Bonfante P (1996b) Cellular interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizosphere bacteria. *Protoplasma* 193:123–131. <https://doi.org/10.1007/BF01276640>



## CHAPITRE 4

- Bidondo LF, Silvani V, Colombo R, et al (2011) Pre-symbiotic and symbiotic interactions between *Glomus intraradices* and two *Paenibacillus* species isolated from AM propagules. In vitro and in vivo assays with soybean (AG043RG) as plant host. *Soil Biol Biochem* 43:1866–1872. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.05.004>
- Bonfante P, Anca I (2009) Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions. *Annu Rev Microbiol* 63:363–83. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073504>
- Borkott H, Insam H (1990) Symbiosis with bacteria enhances the use of chitin by the springtail, *Folsomia candida* (Collembola). *Biol Fertil Soils* 9:126–129. <https://doi.org/10.1007/BF00335794>
- Brady KU, Kruckeberg AR, Bradshaw Jr. HD (2005) Evolutionary Ecology of Plant Adaptation to Serpentine Soils. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 36:243–266. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.35.021103.105730>
- Brooks RR (1987) *Serpentine and its vegetation: a multidisciplinary approach*, Dioscoride. Portland, OR
- Brundrett M, Tedersoo L (2019) Misdiagnosis of mycorrhizas and inappropriate recycling of data can lead to false conclusions. *New Phytol* 221:18–24. <https://doi.org/10.1111/nph.15440>
- Crossay T (2018) Caractérisation taxonomique des champignons mycorrhiziens à arbuscules natifs des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie; analyse de leur synergie permettant l'adaptation des plantes à ces milieux extrêmes. PhD thesis, New Caledonia University
- Crossay T, Cilia A, Cavaloc Y, et al (2018) Four new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) associated with endemic plants from ultramafic soils of New Caledonia. *Mycol Prog* 17:729–744. <https://doi.org/10.1007/s11557-018-1386-5>
- Daniels B, Skipper H (1982) Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. In: The American Phytopathological Society, N. C. Sche. pp 29–36
- Doubková P, Sudová R (2014) Nickel tolerance of serpentine and non-serpentine *Knautia arvensis* plants as affected by arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 24:209–217. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0532-9>
- Dubus G, Becquer I (2001) Phosphorus sorption and desorption in oxide rich Ferralsols of New Caledonia. *Soil Res* 39:403–414 <https://doi.org/10.1071/SR00003>
- Etesami H (2018) Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues: Mechanisms and future prospects. *Ecotoxicol Environ Saf* 147:175–191. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.032>
- Fernández Bidondo L, Colombo R, Bompadre J, et al (2016) Cultivable bacteria associated with infective propagules of arbuscular mycorrhizal fungi. Implications for mycorrhizal activity. *Appl Soil Ecol* 105:86–90. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.04.013>
- Frey-Klett P, Garbaye J, Tarkka M (2007) The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol* 176:22–36. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02191.x>

- Galal TM, Shehata HS (2015) Bioaccumulation and translocation of heavy metals by *Plantago major* L. grown in contaminated soils under the effect of traffic pollution. *Ecol Indic* 48:244–251. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.08.013>
- Gamalero E, Lingua G, Berta G, Glick BR (2009) Beneficial role of plant growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant responses to heavy metal stress. *Can J Microbiol* 55:501–514. <https://doi.org/10.1139/w09-010>
- Garbaye J (1994) Tansley Review No. 76 Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol* 128:197–210. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb04003.x>
- Gonin M, Gensous S, Lagrange A, et al (2013) Rhizosphere bacteria of *Costularia* spp. from ultramafic soils in New Caledonia: diversity, tolerance to extreme edaphic conditions, and role in plant growth and mineral nutrition. *Can J Microbiol* 59:164–174. <https://doi.org/10.1139/cjm-2012-0570>
- Guentas L, Gensous S, Cavaloc Y, et al (2016) *Burkholderia novacaledonica* sp. nov. and *B. ultramafica* sp. nov. isolated from roots of *Costularia* spp. pioneer plants of ultramafic soils in New Caledonia. *Syst Appl Microbiol* 39:151–159. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.03.008>
- Huang P, de-Bashan L, Crocker T, et al (2017) Evidence that fresh weight measurement is imprecise for reporting the effect of plant growth-promoting (rhizo)bacteria on growth promotion of crop plants. *Biol Fertil Soils* 53:199–208. <https://doi.org/10.1007/s00374-016-1160-2>
- Iffis B, St-Arnaud M, Hijri M (2014) Bacteria associated with arbuscular mycorrhizal fungi within roots of plants growing in a soil highly contaminated with aliphatic and aromatic petroleum hydrocarbons. *FEMS Microbiol Lett* 358:44–54. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12533>
- Isnard S, L’Huillier L, Rigault F, Jaffré T (2016) How did the ultramafic soils shape the flora of the New Caledonian hotspot ? *Plant Soil* 403:53–76. 5. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2910-5>
- Jaffré T, L’Huillier L (2010a) La végétation des roches ultramafiques ou terrains miniers. In: L’Huillier L, Jaffré T, Wulff A (eds) *Mines et environnement en Nouvelle-Calédonie : les milieux sur substrats ultramafiques et leur restauration*, IAC Ed. Noumea, pp 45–103
- Jaffré T, L’huillier L (2010b) Conditions de milieu des terrains miniers. In: L’Huillier L, Jaffré T, Wulff A (eds) *Mines et environnement en Nouvelle-Calédonie : les milieux sur substrats ultramafiques et leur restauration*, IAC Ed. Noumea, pp 33–44
- Kazakou E, Dimitrakopoulos PG, Baker AJM, et al (2008) Hypotheses, mechanisms and trade-offs of tolerance and adaptation to serpentine soils: from species to ecosystem level. *Biol Rev* 495–508. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00051.x>
- Koele N, Turpault MP, Hildebrand EE, et al (2009) Interactions between mycorrhizal fungi and mycorrhizosphere bacteria during mineral weathering: Budget analysis and bacterial quantification. *Soil Biol Biochem* 41:1935–1942. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.06.017>
- Koske RE, Gemma JN (1989) A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol Res* 92:486–488. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(89\)80195-9](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(89)80195-9)

- Koske RE, Gemma JN (1997) Mycorrhizae and succession in plantings of beachgrass in sand dunes. *Am J Bot* 84:118–130. <https://doi.org/10.2307/2445889>
- Lagrange A, Ducouso M, Jourand P, et al (2011) New insights into the mycorrhizal status of Cyperaceae from ultramafic soils in New Caledonia. *Can J Microbiol* 57:21–28. <https://doi.org/10.1139/W10-096>
- Lagrange A, L’Huillier L, Amir H (2013) Mycorrhizal status of Cyperaceae from New Caledonian ultramafic soils: Effects of phosphorus availability on arbuscular mycorrhizal colonization of *Costularia comosa* under field conditions. *Mycorrhiza* 23:655–661. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0503-1>
- Lambers H, Shane MW, Cramer MD, et al (2006) Root Structure and Functioning for Efficient Acquisition of Phosphorus: Matching Morphological and Physiological Traits. *Ann Bot* 98:693–713. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl114>
- Larcher M, Muller B, Mantelin S, et al (2003) Early modifications of *Brassica napus* root system architecture induced by a plant growth-promoting *Phyllobacterium* strain. *New Phytol* 160:119–125. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00862.x>
- Larridon I, Bauters K, Semmouri I, et al (2018) Molecular phylogenetics of the genus *Costularia* (Schoeneae, Cyperaceae) reveals multiple distinct evolutionary lineages. *Mol Phylogenet Evol* 126:196–209. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.04.016>
- Long L, Lin Q, Yao Q, Zhu H (2017) Population and function analysis of cultivable bacteria associated with spores of arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *3 Biotech* 7:4–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0612-1>
- Mengoni A, Schat H, Vangronsveld J (2010) Plants as extreme environments? Ni-resistant bacteria and Ni-hyperaccumulators of serpentine flora. *Plant Soil* 331:5–16. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0242-4>
- Miransari M (2011) Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:917–930. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3004-6>
- Myers N (2003) Biodiversity Hotspots Revisited. *Bioscience* 53:916–917. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2003\)053\[0916:BHR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2003)053[0916:BHR]2.0.CO;2)
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, et al (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853–858. <https://doi.org/10.1038/35002501>
- Orłowska E, Przybyłowicz W, Orłowski D, et al (2011) The effect of mycorrhiza on the growth and elemental composition of Ni-hyperaccumulating plant *Berkheya coddii* Roessler. *Environ Pollut* 159:3730–3738. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.07.008>
- Pascal M, De Forges BR, Le Guyader H, Simberloff D (2008) Mining and Other Threats to the New Caledonia Biodiversity Hotspot. *Conserv Biol* 22:498–499. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2008.00889.x>
- Pasquet C, Monna F, van Oort F, et al (2018) Mobility of Ni, Co, and Mn in ultramafic mining soils of New Caledonia, assessed by kinetic EDTA extractions. *Environ Monit Assess* 190:638. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-7029-0>

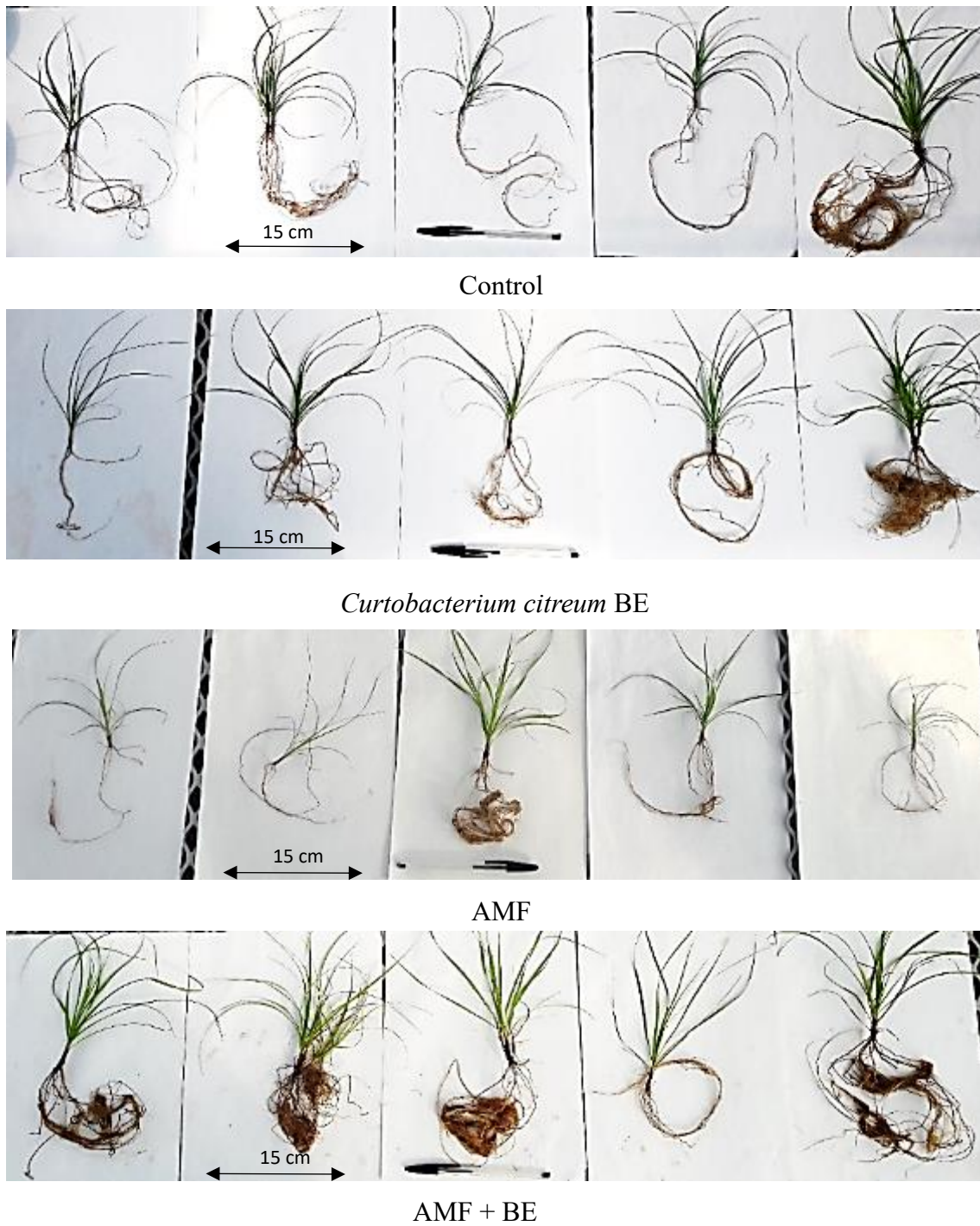
- Perrier N, Amir H, Colin F (2006) Occurrence of mycorrhizal symbioses in the metal-rich lateritic soils of the Koniambo Massif, New Caledonia. *Mycorrhiza* 16:449–458. <https://doi.org/10.1007/s00572-006-0057-6>
- Pillon Y, Lucas E, Johansen JB, et al (2015) An Expanded *Metrosideros* (Myrtaceae) to Include *Carpolepis* and *Tepualia* Based on Nuclear Genes. *Syst Bot* 40:782–790. <https://doi.org/10.1600/036364415X689249>
- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Selvakumar G, Krishnamoorthy R, Kim K, Sa T-M (2016) Genetic Diversity and Association Characters of Bacteria Isolated from Arbuscular Mycorrhizal Fungal Spore Walls. *PLoS One* 11:e0160356. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160356>
- Selvakumar G, Shagol CC, Kim K, et al (2018) Spore associated bacteria regulates maize root K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ion homeostasis to promote salinity tolerance during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BMC Plant Biol* 18:109. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1317-2>
- Smith SE, Read D (2008) *Mycorrhizal Symbiosis* Academic Press, Amsterdam (ed. Boston). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370526-6.X5001-6>
- Smith SE, Smith FA (2011) Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annu Rev Plant Biol* 62:227–250. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103846>
- Taktek S, Trépanier M, Servin PM, et al (2015) Trapping of phosphate solubilizing bacteria on hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198. *Soil Biol Biochem* 90:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.07.016>
- Tarkka MT, Frey-Klett P (2008) Mycorrhiza Helper Bacteria. In: *Mycorrhiza*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 113–132
- Trouvelot A, Kough J, Gianinazi-Pearson V (1986) Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (eds) *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*, INRA Press. Paris, pp 217–221
- Turrini A, Avio L, Giovannetti M, Agnolucci M (2018) Functional Complementarity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Associated Microbiota: The Challenge of Translational Research. *Front Plant Sci* 9:10–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01407>
- Vivas A., Barea JM, Biro B, Azcon R (2006a) Effectiveness of autochthonous bacterium and mycorrhizal fungus on *Trifolium* growth, symbiotic development and soil enzymatic activities in Zn contaminated soil. *J Appl Microbiol* 100:587–598. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02804.x>
- Vivas A, Biró B, Ruíz-Lozano JM, et al (2006b) Two bacterial strains isolated from a Zn-polluted soil enhance plant growth and mycorrhizal efficiency under Zn-toxicity. *Chemosphere* 62:1523–1533. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.06.053>

## CHAPITRE 4

- Wang F (2017) Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in mining-impacted sites and their contribution to ecological restoration: Mechanisms and applications. *Crit Rev Environ Sci Technol* 47:1901–1957. <https://doi.org/10.1080/10643389.2017.1400853>
- Wulff A, L’Huillier L, Vêa C, Jaffré T (2010) Espèces indigènes utilisables en revégétalisation. In: L’Huillier L, Jaffré T, Wulff A (eds) *Mines et environnement en Nouvelle-Calédonie : les milieux sur substrats ultramafiques et leur restauration*, IAC Ed. Noumea, pp 231–344
- Xie L, Lehvävirta S, Timonen S, et al (2018) Species-specific synergistic effects of two plant growth—promoting microbes on green roof plant biomass and photosynthetic efficiency. *PLoS One* 13:e0209432. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209432>
- Yousefi AA, Khavazi K, Moezi AA, et al (2011) Phosphate solubilizing bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi impacts on inorganic phosphorus fractions and wheat growth. *World Appl Sci J* 15:1310–1318



Appendix A Supplementary Materials



**FigS4.1** Photographic report of *Tetraria comosa* removed from pots after 8 months as function of the different treatments.



Control



*Curtobacterium citreum* BE

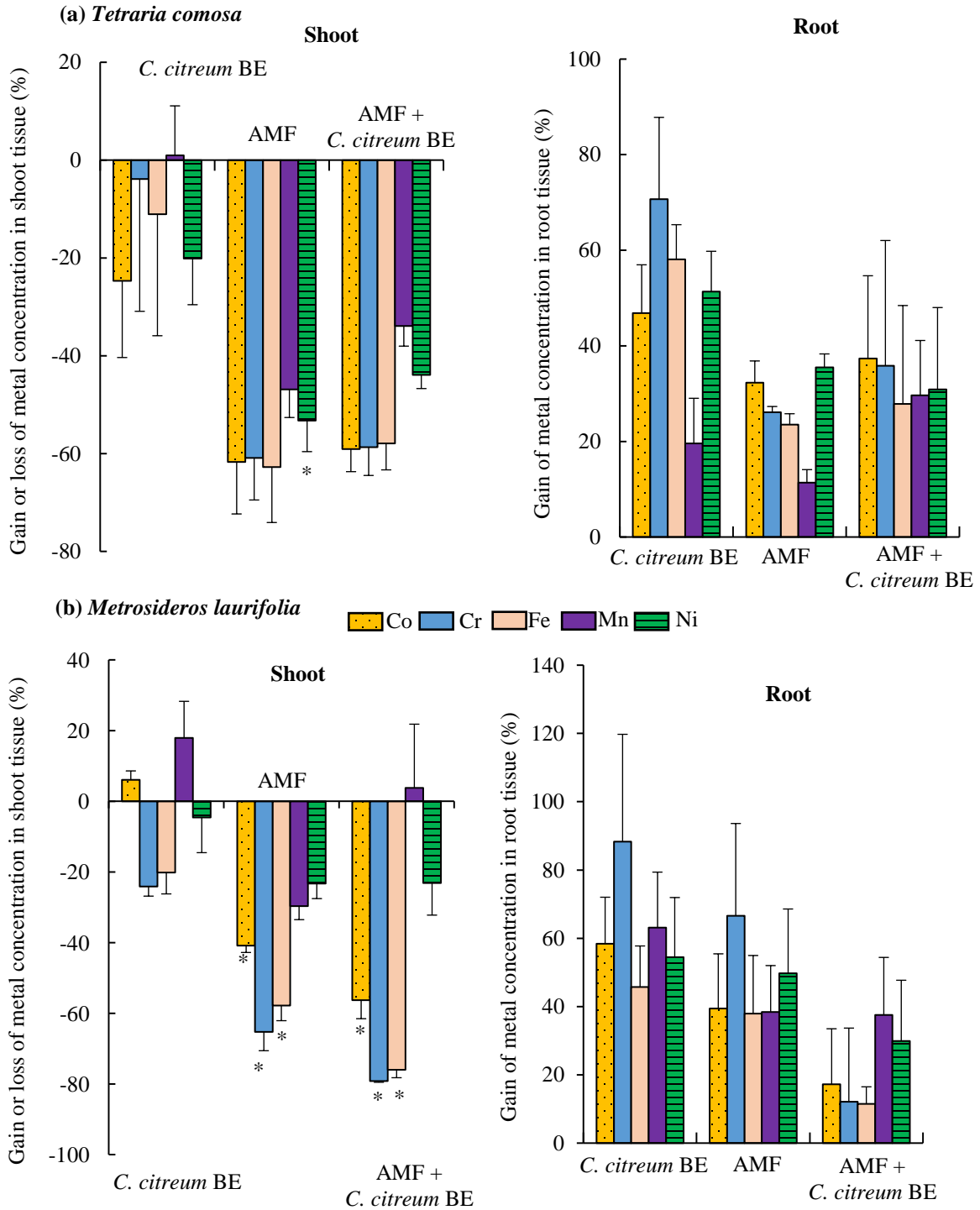


AMF



AMF + *C. citreum* BE

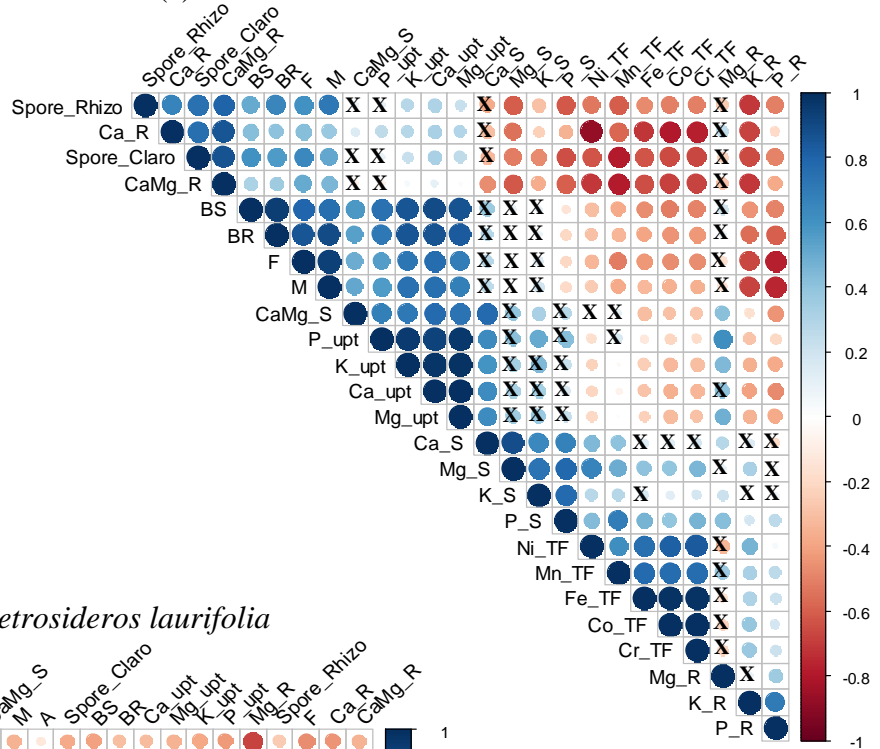
**FigS4.2** Photographic report of *Metrosideros laurifolia* removed from pots after 7 months as function of the different treatments.



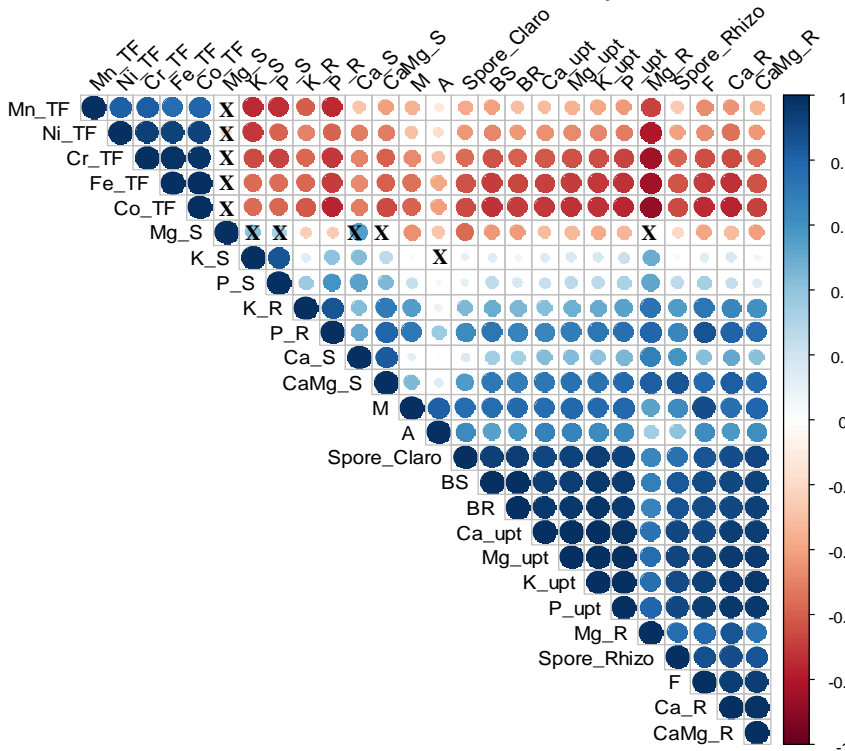
**FigS4.3** Effect of inoculation on metal concentration in (a) *Tetraria comosa* and (b) *Metrosideros laurifolia* grown on ultramafic substrate. Relative variations of metal concentration in shoots and roots are expressed as % of metal concentration in dry mass of tissues of inoculated plants compared with controls. Bars represent means, and error bars represent standard errors (n = 3). “\*” indicates significant differences compared to the control at P < 0.05 according to Tukey’s HSD or Fisher LSD test.



CHAPITRE 4  
(a) *Tetraria comosa*



(b) *Metrosideros laurifolia*



**FigS4.4** Correlogramm for the 25 variables: dry weight tissue of shoot (BS) and roots (BR), density (M) and frequency (F) of mycorrhization, sporulation of *Rhizophagus neocaledonicus* (Spore\_Rhizo) and *Claroideoglomus etunicatum nc* (Spore\_Claro), major element concentration in shoot (ie. Ca\_S) and roots (ie. Ca\_R) (Ca, Mg, K, P), major element content (ie. Ca\_upt) (Ca, Mg, K, P), Ca/Mg ratio in shoot (CaMg\_S) and roots (CaMg\_R) and metal translocation factor (ie. Co\_TF) (Co, Cr, Fe, Mn, Ni) for *Tetraria comosa* and the 26 variables (same variables + the abundance of arbuscules (A)) for *Metrosideros laurifolia*. “X”: Correlation not significant at  $P < 0.05$ .

**Table S4.1** Major characteristics of *Curtobacterium citreum* BE. Abbreviations: +: growth; -: no growth; var: variable (Gonin et al., 2013; Bourles et al., submitted).

<i>C. citreum</i> . BE	
<b>Sampling characteristics</b>	
Plant Host species	<i>Tetraria pubescens</i>
	Mont-Dore, Plum road
Site	22°15'54"S; 166°35'57" E 22.26 S 166.59 E
<b>Microbiological characteristics</b>	
Range temperature (°C)	15-40
% NaCl	0-1
pH optimum	7-8
<b>Molecular characteristics</b>	
16S RNA seq EMBL	FR872423
<b>Metal tolerance</b>	
<b>IC<sub>50</sub> (mM)</b>	
Ni	2.5 ± 0.15
Co	2.6 ± 0.25
Cr	2.5 ± 0.31
Mn	13.5 ± 0.68
<b>Plant Growth Promoting Traits</b>	
Phosphate solubilization	-
Indole-3-acetic acid	+
NH <sub>3</sub>	+
Siderophore	-
1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase	-

CHAPITRE 4

**Table S4.2** Density (M), frequency (F) of mycorrhization and abundance of arbuscule (A) of *Tetraria comosa* and *Metrosideros laurifolia* (mean  $\pm$  SE n = 15).

Plant	Treatment	M (%)	F (%)	A (%)
<i>T. comosa</i>	AMF	0.0 $\pm$ 0.1b <sub>1</sub>	2.4 $\pm$ 1.6b <sub>2</sub>	-
	AMF + <i>C. citreum</i> BE	7.1 $\pm$ 1.9a <sub>1</sub>	33.5 $\pm$ 5.4a <sub>2</sub>	-
<i>M. laurifolia</i>	AMF	10.5 $\pm$ 3.0a <sub>3</sub>	51.1 $\pm$ 5.0b <sub>4</sub>	0.4 $\pm$ 0.3a <sub>5</sub>
	AMF + <i>C. citreum</i> BE	18.3 $\pm$ 3.3a <sub>3</sub>	70.9 $\pm$ 4.6a <sub>4</sub>	4.3 $\pm$ 2.1a <sub>5</sub>

Mycorrhizal structures were not observed in control and in plants inoculated only with *C. citreum* BE. Value with the same lower case letters are not significantly different at  $P < 0.05$  according to Wilcoxon sign's test. Same coefficient to letters refers to analysis of one mycorrhizal parameter for one plant species. Arbuscules could not be observed in *T. comosa* root.

CHAPITRE 4

**Table S4.3** Growth of *Tetraria comosa* during time as a function of various treatments (mean  $\pm$  SE n = 15).

Treatment	Gain of height (cm) of <i>Tetraria comosa</i>										Repeated Anova
	57 days		111 days		167 days		205 days		231 days		
Control	1.3	$\pm$ 0.4	5	$\pm$ 0.8	10	$\pm$ 1.6	13.8	$\pm$ 1.8	15.6	$\pm$ 1.5	b
<i>C. citreum</i> BE	2.1	$\pm$ 0.5	6.1	$\pm$ 0.9	9.8	$\pm$ 1.2	13.4	$\pm$ 1.4	15	$\pm$ 1.3	b
AMF	-0.2	$\pm$ 0.7	2.5	$\pm$ 1.2	6.1	$\pm$ 1.7	8.5	$\pm$ 1.9	10.6	$\pm$ 1.7	c
AMF + <i>C. citreum</i> BE	5.4	$\pm$ 0.9	10.3	$\pm$ 1.3	14.9	$\pm$ 1.5	18	$\pm$ 1.5	19.2	$\pm$ 1.4	a

Treatments with the same lower case letters are not significantly different at  $P < 0.05$  according to Anova repeated test.

**Table S4.4** Growth of *Metrosideros laurifolia* during time as a function of various treatments (mean  $\pm$  SE n = 15).

Treatment	Gain of height (cm) of <i>Metrosideros laurifolia</i>						Repeated Anova						
	65 days		96 days		126 days			156 days		187 days		212 days	
Control	0.1	$\pm$ 0.1	1	$\pm$ 0.3	1.8	$\pm$ 0.4	2.8	$\pm$ 0.7	3.9	$\pm$ 0.8	4.7	$\pm$ 0.9	c
<i>C. citreum</i> BE	0.3	$\pm$ 0.1	1	$\pm$ 0.3	2	$\pm$ 0.5	3.7	$\pm$ 0.6	5.2	$\pm$ 0.7	5.7	$\pm$ 0.7	c
AMF	0	$\pm$ 0	1.4	$\pm$ 0.3	3.8	$\pm$ 0.3	6.7	$\pm$ 0.4	8.7	$\pm$ 0.5	9.8	$\pm$ 0.4	b
AMF + <i>C. citreum</i> BE	1.1	$\pm$ 0.2	3.4	$\pm$ 0.3	5.8	$\pm$ 0.5	8.8	$\pm$ 0.6	10.8	$\pm$ 0.6	12.1	$\pm$ 0.5	a

Treatments with the same lower case letters are not significantly different at  $P < 0.05$  according to Anova repeated test.

CHAPITRE 4

**Table S4.5** Growth characteristics of *Tetraria comosa* (after 8 months) and *Metrosideros laurifolia* (after 7 months) as a function of various treatments (mean  $\pm$  SE n=15).

Plant	Treatment	Shoot biomass (mg)	Root biomass (mg)
<i>T. comosa</i>	Control	243 $\pm$ 71b <sub>1</sub>	117 $\pm$ 46b <sub>2</sub>
	<i>C. citreum</i> BE	454 $\pm$ 118ab <sub>1</sub>	260 $\pm$ 96ab <sub>2</sub>
	AMF	247 $\pm$ 91b <sub>1</sub>	114 $\pm$ 50b <sub>2</sub>
	AMF + <i>C. citreum</i> BE	646 $\pm$ 108a <sub>1</sub>	339 $\pm$ 76a <sub>2</sub>
<i>M. laurifolia</i>	Control	89 $\pm$ 30c <sub>3</sub>	48 $\pm$ 14c <sub>4</sub>
	<i>C. citreum</i> BE	143 $\pm$ 42c <sub>3</sub>	49 $\pm$ 17c <sub>4</sub>
	AMF	714 $\pm$ 83b <sub>3</sub>	203 $\pm$ 22b <sub>4</sub>
	AMF + <i>C. citreum</i> BE	1329 $\pm$ 148a <sub>3</sub>	433 $\pm$ 44a <sub>4</sub>

Value with the same lower case letters are not significantly different at  $P < 0.05$  according to Fisher's LSD test. Same coefficient to letters refers to analysis of one plant part analysis for one plant species.

CHAPITRE 4

**Table S4.6** Ca, K, P, Mg and Na concentration in shoot and root of *Tetraria comosa* (after 8 months) and *Metrosideros laurifolia* (after 7 months) as a function of various treatments (mean  $\pm$  SE n = 3).

		Shoot				
Treatment	Ca (g kg <sup>-1</sup> )	K (g kg <sup>-1</sup> )	P (mg kg <sup>-1</sup> )	Mg (g kg <sup>-1</sup> )	Na (g kg <sup>-1</sup> )	
<i>T. comosa</i>	Control	4.3 $\pm$ 0.3a <sub>1</sub>	9.2 $\pm$ 0.2a <sub>2</sub>	385.3 $\pm$ 26.6a <sub>3</sub>	1.6 $\pm$ 0.1a <sub>4</sub>	0.5 $\pm$ 0.2a <sub>5</sub>
	<i>C. citreum</i> BE	4.6 $\pm$ 0.1a <sub>1</sub>	9.6 $\pm$ 0.6a <sub>2</sub>	433.3 $\pm$ 45.9a <sub>3</sub>	1.6 $\pm$ 0.1a <sub>4</sub>	0.7 $\pm$ 0.0a <sub>5</sub>
	AMF	3.2 $\pm$ 0.6a <sub>1</sub>	8.0 $\pm$ 1.1a <sub>2</sub>	305 $\pm$ 55.6a <sub>3</sub>	1.2 $\pm$ 0.2a <sub>4</sub>	0.3 $\pm$ 0.1a <sub>5</sub>
	AMF + <i>C. citreum</i> BE	4.6 $\pm$ 0.1a <sub>1</sub>	9.2 $\pm$ 0.5a <sub>2</sub>	338.3 $\pm$ 2.9a <sub>3</sub>	1.5 $\pm$ 0.1a <sub>4</sub>	0.4 $\pm$ 0.1a <sub>5</sub>
		Root				
	Control	1.6 $\pm$ 0.1b <sub>6</sub>	6.0 $\pm$ 0.0a <sub>7</sub>	260 $\pm$ 6ab <sub>8</sub>	1.5 $\pm$ 0.0b <sub>9</sub>	0.9 $\pm$ 0.0ab <sub>10</sub>
	<i>C. citreum</i> BE	2.0 $\pm$ 0.1a <sub>6</sub>	6.1 $\pm$ 0.7a <sub>7</sub>	301 $\pm$ 27a <sub>8</sub>	1.8 $\pm$ 0.1a <sub>9</sub>	1.1 $\pm$ 0.2a <sub>10</sub>
	AMF	2.3 $\pm$ 0.0a <sub>6</sub>	5.4 $\pm$ 0.1a <sub>7</sub>	281 $\pm$ 4a <sub>8</sub>	1.6 $\pm$ 0.0b <sub>9</sub>	0.6 $\pm$ 0.0ab <sub>10</sub>
	AMF + <i>C. citreum</i> BE	2.3 $\pm$ 0.1a <sub>6</sub>	4.7 $\pm$ 0.1a <sub>7</sub>	211 $\pm$ 8b <sub>8</sub>	1.6 $\pm$ 0.0b <sub>9</sub>	0.5 $\pm$ 0.0b <sub>10</sub>
		Shoot				
Treatment	Ca (g kg <sup>-1</sup> )	K (g kg <sup>-1</sup> )	P (mg kg <sup>-1</sup> )	Mg (g kg <sup>-1</sup> )	Na (g kg <sup>-1</sup> )	
<i>M. laurifolia</i>	Control	7.0 $\pm$ 0.2b <sub>1</sub>	7.6 $\pm$ 0.0b <sub>2</sub>	251.7 $\pm$ 10.5b <sub>3</sub>	3.5 $\pm$ 0.0a <sub>4</sub>	2.5 $\pm$ 0.0ab <sub>5</sub>
	<i>C. citreum</i> BE	8.1 $\pm$ 0.5ab <sub>1</sub>	9.3 $\pm$ 0.2a <sub>2</sub>	420.7 $\pm$ 39.2a <sub>3</sub>	3.9 $\pm$ 0.2a <sub>4</sub>	2.7 $\pm$ 0.1a <sub>5</sub>
	AMF	9.0 $\pm$ 0.9a <sub>1</sub>	9.0 $\pm$ 0.5a <sub>2</sub>	432.3 $\pm$ 28.2a <sub>3</sub>	3.6 $\pm$ 0.2a <sub>4</sub>	2.5 $\pm$ 0.1ab <sub>5</sub>
	AMF + <i>C. citreum</i> BE	8.6 $\pm$ 0.9a <sub>1</sub>	8.5 $\pm$ 0.2ab <sub>2</sub>	370.3 $\pm$ 15.6a <sub>3</sub>	3.5 $\pm$ 0.2a <sub>4</sub>	2.4 $\pm$ 0.1b <sub>5</sub>
		Root				
	Control	3.0 $\pm$ 0.1c <sub>6</sub>	8.1 $\pm$ 0.1b <sub>7</sub>	235 $\pm$ 8.1b <sub>8</sub>	2.8 $\pm$ 0.1b <sub>9</sub>	2.3 $\pm$ 0.2b <sub>10</sub>
	<i>C. citreum</i> BE	2.9 $\pm$ 0.3c <sub>6</sub>	8.3 $\pm$ 0.3b <sub>7</sub>	268.3 $\pm$ 8.3b <sub>8</sub>	3.2 $\pm$ 0.1ab <sub>9</sub>	1.8 $\pm$ 0.2b <sub>10</sub>
	AMF	5.5 $\pm$ 0.3b <sub>6</sub>	11.2 $\pm$ 0.6a <sub>7</sub>	445 $\pm$ 11.2a <sub>8</sub>	3.6 $\pm$ 0.1a <sub>9</sub>	3.1 $\pm$ 0.2a <sub>10</sub>
	AMF + <i>C. citreum</i> BE	6.8 $\pm$ 0.2a <sub>6</sub>	9.6 $\pm$ 0.3a <sub>7</sub>	384.3 $\pm$ 9.6a <sub>8</sub>	3.6 $\pm$ 0.1a <sub>9</sub>	3.7 $\pm$ 0.1a <sub>10</sub>

Value with the same lower case letters are not significantly different at P < 0.05 according to Tukey's HSD or Fisher's LSD test. Same coefficient to letters refers to analysis of one element plant for one plant part.

CHAPITRE 4

**Table S4.7** Ca, K, P, Mg and Na content of *Tetraria comosa* (8 months) and *Metrosideros laurifolia* (7 months) as a function of various treatment (mean  $\pm$  SE n = 3).

Plant	Treatment	Ca (mg plant <sup>-1</sup> )	K (mg plant <sup>-1</sup> )	P ( $\mu$ g plant <sup>-1</sup> )	Mg (mg plant <sup>-1</sup> )	Na (mg plant <sup>-1</sup> )
<i>T. comosa</i>	Control	1.23 $\pm$ 0.05c <sub>1</sub>	2.94 $\pm$ 0.03c <sub>2</sub>	124 $\pm$ 4b <sub>3</sub>	0.56 $\pm$ 0.01c <sub>4</sub>	0.24 $\pm$ 0.03b <sub>5</sub>
	<i>C. citreum</i> BE	2.61 $\pm$ 0.03b <sub>1</sub>	5.95 $\pm$ 0.22b <sub>2</sub>	275 $\pm$ 18a <sub>3</sub>	1.20 $\pm$ 0.02b <sub>4</sub>	0.58 $\pm$ 0.05a <sub>5</sub>
	AMF	1.05 $\pm$ 0.11c <sub>1</sub>	2.60 $\pm$ 0.20c <sub>2</sub>	107 $\pm$ 10b <sub>3</sub>	0.47 $\pm$ 0.03c <sub>4</sub>	0.13 $\pm$ 0.01c <sub>5</sub>
	AMF + <i>C. citreum</i> BE	3.75 $\pm$ 0.06a <sub>1</sub>	7.54 $\pm$ 0.20a <sub>2</sub>	290 $\pm$ 1a <sub>3</sub>	1.50 $\pm$ 0.03a <sub>4</sub>	0.43 $\pm$ 0.03a <sub>5</sub>
<i>M. laurifolia</i>	Control	0.52 $\pm$ 0.02d <sub>6</sub>	1.36 $\pm$ 0.01d <sub>7</sub>	58 $\pm$ 1d <sub>8</sub>	0.27 $\pm$ 0.00d <sub>9</sub>	0.13 $\pm$ 0.01d <sub>10</sub>
	<i>C. citreum</i> BE	0.94 $\pm$ 0.00c <sub>6</sub>	2.25 $\pm$ 0.09c <sub>7</sub>	105 $\pm$ 6c <sub>8</sub>	0.49 $\pm$ 0.01c <sub>9</sub>	0.25 $\pm$ 0.03c <sub>10</sub>
	AMF	3.92 $\pm$ 0.32b <sub>6</sub>	9.62 $\pm$ 0.57b <sub>7</sub>	418 $\pm$ 28b <sub>8</sub>	1.97 $\pm$ 0.09b <sub>9</sub>	0.59 $\pm$ 0.03b <sub>10</sub>
	AMF + <i>C. citreum</i> BE	9.14 $\pm$ 0.14a <sub>6</sub>	18.46 $\pm$ 0.39a <sub>7</sub>	730 $\pm$ 5a <sub>8</sub>	4.09 $\pm$ 0.07a <sub>9</sub>	1.22 $\pm$ 0.06a <sub>10</sub>

Value with the same lower case letters are not significantly different at  $P < 0.05$  according to Tukey's HSD or Fisher's LSD test. Same coefficient to letters refers to analysis of one element for one plant species.

CHAPITRE 4

**Table S4.8** Metal concentration in shoot and root of *T. comosa* (8 months) and *M. laurifolia* (7 months) as a function of various treatments (mean  $\pm$  SE n = 3).

Treatment		Shoot				
		Co (mg kg <sup>-1</sup> )	Cr (mg kg <sup>-1</sup> )	Fe (g kg <sup>-1</sup> )	Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	Ni (mg kg <sup>-1</sup> )
<i>T. comosa</i>	Control	22.7 $\pm$ 4.9a <sub>1</sub>	126 $\pm$ 22a <sub>2</sub>	6.3 $\pm$ 1.3a <sub>3</sub>	591 $\pm$ 125ab <sub>4</sub>	315 $\pm$ 57a <sub>5</sub>
	<i>C. citreum</i> BE	17.1 $\pm$ 3.6a <sub>1</sub>	121 $\pm$ 34a <sub>2</sub>	5.6 $\pm$ 1.6a <sub>3</sub>	597 $\pm$ 60a <sub>4</sub>	251 $\pm$ 30a <sub>5</sub>
	AMF	8.7 $\pm$ 2.4a <sub>1</sub>	49 $\pm$ 11a <sub>2</sub>	2.3 $\pm$ 0.7a <sub>3</sub>	314 $\pm$ 34b <sub>4</sub>	147 $\pm$ 20b <sub>5</sub>
	AMF + <i>C. citreum</i> BE	9.3 $\pm$ 1.1a <sub>1</sub>	52 $\pm$ 7a <sub>2</sub>	2.6 $\pm$ 0.3a <sub>3</sub>	391 $\pm$ 25b <sub>4</sub>	177 $\pm$ 9ab <sub>5</sub>
Treatment		Root				
		Co (mg kg <sup>-1</sup> )	Cr (mg kg <sup>-1</sup> )	Fe (g kg <sup>-1</sup> )	Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	Ni (mg kg <sup>-1</sup> )
<i>T. comosa</i>	Control	48.5 $\pm$ 6.0a <sub>6</sub>	212 $\pm$ 31a <sub>7</sub>	15.3 $\pm$ 2.0b <sub>8</sub>	882 $\pm$ 86a <sub>9</sub>	246 $\pm$ 32a <sub>10</sub>
	<i>C. citreum</i> BE	71.2 $\pm$ 4.9a <sub>6</sub>	362 $\pm$ 36a <sub>7</sub>	24.2 $\pm$ 1.1a <sub>8</sub>	1054 $\pm$ 83a <sub>9</sub>	372 $\pm$ 21a <sub>10</sub>
	AMF	64.2 $\pm$ 2.2a <sub>6</sub>	268 $\pm$ 3a <sub>7</sub>	18.9 $\pm$ 0.3ab <sub>8</sub>	982 $\pm$ 24a <sub>9</sub>	333 $\pm$ 7a <sub>10</sub>
	AMF + <i>C. citreum</i> BE	66.6 $\pm$ 8.4a <sub>6</sub>	289 $\pm$ 56a <sub>7</sub>	19.6 $\pm$ 3.2ab <sub>8</sub>	1143 $\pm$ 101a <sub>9</sub>	322 $\pm$ 42a <sub>10</sub>
Treatment		Shoot				
		Co (mg kg <sup>-1</sup> )	Cr (mg kg <sup>-1</sup> )	Fe (g kg <sup>-1</sup> )	Mn (g kg <sup>-1</sup> )	Ni (mg kg <sup>-1</sup> )
<i>M. laurifolia</i>	Control	3.8 $\pm$ 0.4a <sub>1</sub>	20.0 $\pm$ 2.7a <sub>2</sub>	0.75 $\pm$ 0.12a <sub>3</sub>	1.4 $\pm$ 0.0a <sub>4</sub>	27.0 $\pm$ 1.8a <sub>5</sub>
	<i>C. citreum</i> BE	4.0 $\pm$ 0.1a <sub>1</sub>	15.2 $\pm$ 0.5a <sub>2</sub>	0.60 $\pm$ 0.05a <sub>3</sub>	1.7 $\pm$ 0.2a <sub>4</sub>	25.8 $\pm$ 2.7a <sub>5</sub>
	AMF	2.2 $\pm$ 0.1b <sub>1</sub>	6.9 $\pm$ 1.1b <sub>2</sub>	0.32 $\pm$ 0.03b <sub>3</sub>	1.0 $\pm$ 0.1a <sub>4</sub>	20.7 $\pm$ 1.2a <sub>5</sub>
	AMF + <i>C. citreum</i> BE	1.7 $\pm$ 0.2b <sub>1</sub>	4.2 $\pm$ 0.1b <sub>2</sub>	0.18 $\pm$ 0.02b <sub>3</sub>	1.5 $\pm$ 0.3a <sub>4</sub>	20.8 $\pm$ 2.5a <sub>5</sub>
Treatment		Root				
		Co (mg kg <sup>-1</sup> )	Cr (mg kg <sup>-1</sup> )	Fe (g kg <sup>-1</sup> )	Mn (g kg <sup>-1</sup> )	Ni (mg kg <sup>-1</sup> )
<i>M. laurifolia</i>	Control	79 $\pm$ 9a <sub>6</sub>	455 $\pm$ 53a <sub>7</sub>	25.6 $\pm$ 2.9a <sub>8</sub>	1.2 $\pm$ 0.1a <sub>9</sub>	430 $\pm$ 47a <sub>10</sub>
	<i>C. citreum</i> BE	125 $\pm$ 11a <sub>6</sub>	857 $\pm$ 143a <sub>7</sub>	37.3 $\pm$ 3.1a <sub>8</sub>	1.9 $\pm$ 0.2a <sub>9</sub>	664 $\pm$ 75.a <sub>10</sub>
	AMF	110 $\pm$ 13a <sub>6</sub>	758 $\pm$ 123a <sub>7</sub>	35.3 $\pm$ 4.2a <sub>8</sub>	1.6 $\pm$ 0.2a <sub>9</sub>	644 $\pm$ 81a <sub>10</sub>
	AMF + <i>C. citreum</i> BE	92 $\pm$ 13a <sub>6</sub>	511 $\pm$ 98a <sub>7</sub>	36.2 $\pm$ 4.0a <sub>8</sub>	1.6 $\pm$ 0.2a <sub>9</sub>	559 $\pm$ 77a <sub>10</sub>

Value with the same lower case letters are not significantly different at P < 0.05 according to Tukey's HSD. Same coefficient to letters refers to analysis of one element plant for one plant part.



CHAPITRE 4

**Table S4.9** Variables which defined each cluster ( $P < 0.05$ ) using a Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Classification on Principal Component (HCPC). PCA and HCPC were performed with 25 variables (Biomass (dry weight tissue of shoot (BS) and roots (BR), density (M) and density (F) of mycorrhization, sporulation of *Rhizophagus neocaledonicus* (Spore\_Rhizo) and *Claroideoglossum etunicatum* (Spore\_Claro), major element concentration in shoot (ie. Ca\_S) and roots (ie. Ca\_R) (Ca, Mg, K, P), major element content (ie. Ca\_upt) (Ca, Mg, K, P), Ca/Mg ratio in shoot (CaMg\_S) and roots (CaMg\_R) and metal translocation factor (ie. Co\_FT) (Co, Cr, Fe, Mn, Ni) for *Tetraria comosa* and 26 variables (same variables + the abundance of arbuscules (A)) for *Metrosideros laurifolia*. Analyses were carried out using R software with the ‘FactoMineR’ package. HCPC used Euclidean distances for calculating dissimilarities between observations and average method to define cluster

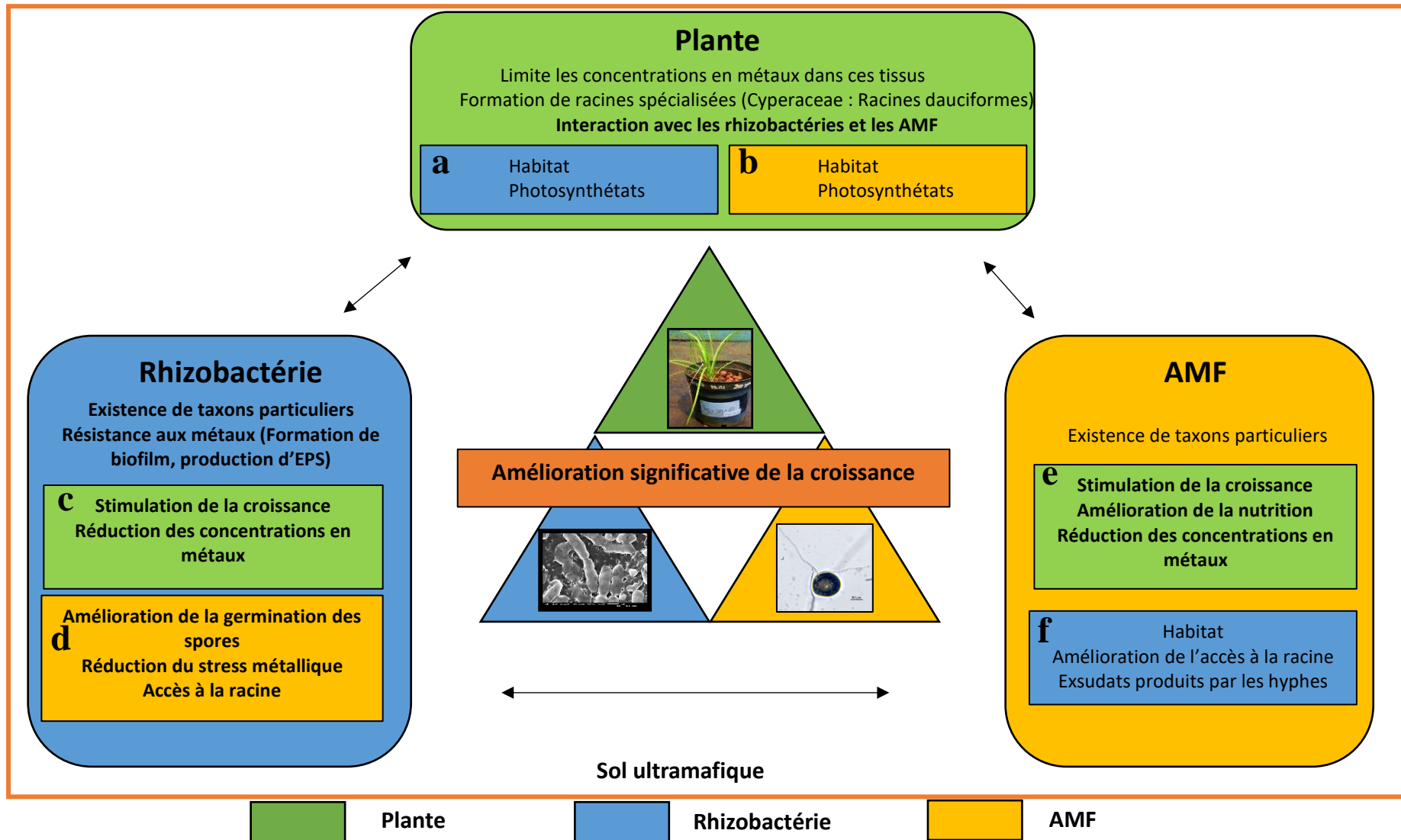
Treatment			Variables for <i>T. comosa</i>	Variables for <i>M. laurifolia</i>
1	Control	+	Co_FT, Ni_FT, Cr_FT, Fe_FT	Cr_FT, Fe_FT, Co_FT, Ni_FT, Mn_FT
		-	Ca_R	P_R, Mg_R, K_S, P_S
2	AMF	+	CaMg_R	K_R, P_R
		-	K_upt, P_upt, Mg_S, Mg_upt	Mn_FT
3	<i>C. citreum</i> BE	+	Mg_R	Mg_S,
		-	CaMg_R	CaMg_R
4	AMF + <i>C. citreum</i> BE	+	M, F, BR, BS, Ca_upt, K_upt, Mg_upt, P_upt, Spore_Rhizo, Spore_Claro	BR, Mg_upt, Ca_upt, K_upt, Spore_Claro, BS, P_upt, Spore_Rhizo, CaMg_R, Ca_R, F, A, M
		-	K_R, P_R	

## Conclusion générale et perspectives

Les milieux ultramafiques de Nouvelle-Calédonie de par leurs caractéristiques édaphiques abritent des organismes originaux adaptés à ces conditions particulières (Crossay et al., 2018 ; Guentas et al., 2016 ; Isnard et al., 2016). Dans ce contexte, ce travail de thèse s'est intéressé à la caractérisation des rhizobactéries des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie et à leur rôle dans l'adaptation des plantes à la contrainte édaphique. Ce travail a ainsi permis de mettre en évidence (i) l'existence de taxons originaux inféodés aux sols ultramafiques, (ii) des mécanismes particuliers impliqués dans la t aux métaux et (iii) le rôle de ces rhizobactéries dans l'adaptation des plantes à la contrainte édaphique. De plus, les résultats obtenus permettent de dégager des conclusions intéressantes sur les mécanismes d'adaptation des espèces végétales des sols ultramafiques, préalable primordiale à l'amélioration des programmes de restauration écologique des sites miniers dégradés. Un schéma récapitulatif reprenant l'ensemble des éléments mis en évidence dans le cadre de ce travail est présenté en figure 2.

### Existence de taxons particuliers

La diversité des bactéries des milieux ultramafiques de Nouvelle-Calédonie a été étudiée et rapporte l'existence de taxons particuliers (Guentas et al., 2016 ; Klonowska et al., 2012). Ce travail de thèse a permis de mettre en avant que ces particularités pouvaient être expliquées par une adaptation des bactéries aux fortes teneurs en métaux retrouvées dans ces sols. En effet, le chapitre 2 met en évidence ces mécanismes chez deux espèces appartenant au genre *Burkholderia* et propose de reclasser ces espèces notamment au vue de leurs mécanismes d'adaptation vis-à-vis du nickel. Le chapitre 3 montre au sein d'une même espèce bactérienne (*Curtobacterium citreum*) des différences phénotypiques reliées à une adaptation des souches ultramafiques aux fortes concentrations en nickel. Ces résultats renforcent donc le postulat que les sols ultramafiques abritent une microflore originale reliée à une adaptation aux fortes concentrations en métaux. Des différences de profil ont été mis en évidence entre les genres bactériens avec dans l'ordre *Paraburkholderia ultramafica* STM10279<sup>T</sup> qui présentait les valeurs de tolérance aux métaux les plus importantes, puis *Caballeronia novacaledonica* STM1072<sup>T</sup> et enfin *Curtobacterium citreum* BE. Il serait intéressant de réaliser les expérimentations présentées dans le chapitre 2 pour l'ensemble des souches de *P. ultramafica* et *C. novacaledonica* afin de vérifier si ces profils de tolérance aux métaux varient selon les souches et donc les sites d'échantillonnage.



**Fig. 2** Schéma récapitulatif de l'ensemble du travail de thèse. Les éléments en gras ont été mis en évidence dans le cadre de ce travail. Les autres éléments sont repris de la bibliographie pour aider à la compréhension (Revilenni et al., 2016, Amir et Ducouso, 2010, Jaffré et L'Huillier, 2010) (a) action de la plante pour la rhizobactérie, (b) action de la plante pour l'AMF ; (c) action de la rhizobactérie pour la plante, (d) action de la rhizobactérie pour l'AMF, (e) action de l'AMF pour la plante et (f) action de l'AMF pour la rhizobactérie.

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Pour essayer d'apporter des premiers éléments de réponse, une analyse multivariée (Annexe 4) a été réalisée sur les résultats de Gonin et al. (2013). Ces résultats préliminaires indiquent qu'il n'y a pas de corrélation positive entre les quantités de métaux retrouvées dans le sol et profil d'adaptation des différentes souches. De plus ces résultats indiquent des profils de tolérance identiques selon les espèces appuyant l'existence de mécanismes particuliers propres à chaque espèce.

Le travail de caractérisation des souches bactériennes natives constitue également une avancée non négligeable dans une perspective de mise en place d'inoculum bactériens dans le cadre de la restauration écologique des sites miniers dégradés. Cependant, dans cette thèse, seuls les genres majoritaires (*Burkholderia* et *Curtobacterium*) des rhizosphères échantillonnées ont été étudiés. Il conviendrait également de porter une attention aux autres genres bactériens des rhizosphères échantillonnées et notamment les genres *Bradyrhizobium* (9%) et *Sphingomonas* (8%) pour continuer à comprendre les interactions qui ont lieu. Comme pour les deux genres majoritaires, il est probable que de nouvelles espèces et/ou écotypes soient trouvés comme le suggèrent les phylogénies (Annexe 5 et 6). Des recherches sur les rhizobactéries d'autres espèces végétales inféodées aux sols ultramafiques peuvent aussi être envisagées afin d'élargir notre compréhension de leur diversité et approfondir nos connaissances sur leurs rôles dans l'adaptation des plantes à la contrainte édaphique.

### **Mise en évidence de mécanismes de résistance impliqués dans la tolérance aux métaux**

Dans ce travail, un intérêt particulier a été porté sur les mécanismes de résistance aux métaux et plus particulièrement sur la capacité des bactéries à produire des exopolysaccharides. En effet, ces macromolécules sont décrites comme étant capables de chélater les métaux et de les rendre indisponibles pour les organismes (Etesami, 2018 ; Gupta and Diwan, 2017). Ce travail a montré que *P. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> et *Curtobacterium citreum* BE étaient capables de produire des exopolysaccharides et qu'il s'agissait d'un mécanisme mis en place par la bactérie pour tolérer le nickel. Il conviendrait de tester d'autres métaux individuellement comme cela a été fait pour le nickel, mais également de tester ces éléments ensemble pour se rapprocher au maximum des conditions naturelles dans les sols ultramafiques. Pour *C. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup>, des recherches supplémentaires sont nécessaires car d'autres mécanismes sont supposés. En effet, la production de biofilm s'arrête quand la quantité de Ni est supérieure à 1mM et sa valeur d'IC<sub>50</sub> est égale à 4.8 mM. Des transporteurs pourraient être impliqués comme suggéré par Gonin et al. (2013). Concernant *P. ultramafica* STM10279<sup>T</sup>, il

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

est prévu de mettre en évidence la chélation de Ni par l'EPS comme cela été réalisé dans le chapitre 3 pour l'EPS de *Curtobacterium citreum* BE. La caractérisation de l'EPS de *P. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> en collaboration avec l'Université Clermont Auvergne est en cours et devrait aboutir à l'écriture d'une publication.

Le génome entier de *C. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> est disponible sur NCBI (NZ\_OGTP01000009) et ceux de *P. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> et *Curtobacterium citreum* BE ont été séquencés dans le cadre de cette thèse. L'analyse de ces génomes permettrait d'identifier les bases moléculaires et leur degré d'implication dans les phénotypes de tolérance.

Concernant *Curtobacterium citreum* BE, c'est la première fois, à notre connaissance, qu'une production d'EPS est mise en évidence pour des bactéries appartenant au même genre. La caractérisation de l'EPS devrait également être réalisée.

Ces exopolysaccharides jouent un rôle fondamental également dans l'interaction avec les plantes. L'expérimentation présentée dans le chapitre 4 suggère que l'EPS est responsable d'une réduction du transfert des métaux dans la plante. Ce résultat ouvre la voie vers l'exploitation des EPS pour améliorer la croissance des plantes sur les sols ultramafiques. Ces EPS peuvent également être valorisés dans d'autres secteurs. En effet, en raison de leurs structures chimiques uniques et complexes qui offrent des fonctions bioactives bénéfiques, les EPS microbiens ont trouvé une large gamme d'applications dans les industries chimiques, alimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques, d'emballage, agricoles et médicales dans lesquelles ils peuvent être utilisés comme adhésifs, absorbants, lubrifiants, amendements de sol, cosmétiques (Donot et al., 2012 ; Freitas et al., 2011). En Nouvelle-Calédonie, une startup locale (Biotecal, <http://www.technopole.nc/fr/pole-innovation/biotecal>) travaille sur la valorisation des EPS issus des bactéries marines dans les domaines de la cosmétique notamment pour les soins de la peau en tant qu'agent hydratant et antiride.

### **Rôle dans l'adaptation des plantes**

Les plantes endémiques des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie ont développé des mécanismes adaptatifs spécifiques pour se protéger contre les effets toxiques des fortes concentrations en métaux, mais aussi pour se développer sur des sols où les concentrations en nutriments essentiels sont faibles et déséquilibrées (Jaffré et L'Huillier, 2010). Parmi ces adaptations les interactions avec les rhizobactéries ont été peu étudiées en Nouvelle-Calédonie (Amir et Ducouso, 2010). Les différents isolats identifiés et cultivés en laboratoire ont été testés en conditions expérimentales afin d'évaluer leurs fonctions.

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Il apparaît que les mécanismes d'adaptation des bactéries face aux fortes teneurs en métaux entraînent également une diminution de ces teneurs dans les plantes. Cependant, dans le cas des plantes utilisées (*Tetradlea comosa* et *Metrosideros laurifolia*), ces seules diminutions n'apparaissent pas suffisantes pour entraîner une amélioration de la croissance. Il semble que la carence du sol en éléments nutritifs (P, K, Ca) ainsi que son rapport Ca/Mg déséquilibré sont limitants, car ils sont les causes principales d'une croissance plus lente (Gensous, 2014 ; Lagrange, 2009). Il aurait été intéressant de réaliser une expérimentation en serre supplémentaire avec sur un milieu avec différentes concentrations en nickel afin d'observer si ces diminutions de contenus métalliques pouvaient entraîner une amélioration de la croissance des plantes sur un milieu particulièrement enrichi en nickel. Une startup locale (Rhizo'Cal : <http://www.technopole.nc/fr/start-ups/rhizocal>) commence à travailler sur ces rhizobactéries pour l'agriculture et la restauration des sites miniers dégradés en Nouvelle-Calédonie.

Ces expériences en serre montrent des différences de réponse en fonction de la plante. En effet l'inoculation seule des bactéries améliore la croissance de *T. comosa*, mais pas celle de *M. laurifolia*. Gensous (2014) avait fait le même constat suite à l'inoculation avec *P. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> du Sorgho (amélioration) et de *M. laurifolia* (pas d'amélioration). Ces résultats appuient l'hypothèse que les stratégies d'adaptation à la contrainte édaphique varient selon les plantes. Pour *T. comosa*, nos résultats appuient ceux de Lagrange (2009) qui montrait que chez cette espèce, l'interaction avec les rhizobactéries jouait un rôle fondamental. Il serait intéressant de tester *P. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> et *Curtobacterium citreum* BE sur d'autres espèces végétales utilisées en restauration écologique pour continuer à investiguer ces relations plantes/rhizobactéries.

Il reste plusieurs interrogations concernant le mode d'action et les effets des rhizobactéries des sols ultramafiques néocalédoniens sur les plantes natives. Pour exemple, les résultats de cette thèse ne permettent pas de déterminer clairement à quel période du développement de la plante agissent les bactéries. S'agit-il d'une stimulation dans les premiers stades de croissance, avant que la bactérie régresse ou disparaisse, ou s'agit-il d'un effet tout au long de la croissance ? Dans le chapitre 2, *P. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> avait été retrouvée à la fin de l'expérimentation sur les racines de *T. comosa*, mais uniquement pour certaines modalités, rendant inexploitable ce résultat. Une expérimentation en serre avec un suivi des bactéries inoculées, jusqu'à la fin de l'expérimentation, en plus des analyses déjà faites, pourrait répondre à cette question.

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La co-inoculation des rhizobactéries étudiées avec des AMF, chez *T. comosa* a montré que la symbiose endomycorhizienne était fonctionnelle chez cette espèce, malgré un faible niveau de colonisation des racines, ce qui confirme les travaux précédemment réalisés sur cette cypéracée (Lagrange et al., 2013, 2011). Ces auteurs avaient suggéré que, chez cette espèce, la mise en place de racines dauciformes impliquées dans l'absorption du phosphore, l'interaction avec les rhizobactéries et l'interaction avec les AMF étaient des mécanismes impliqués dans son adaptation au milieu ultramafique. Pour *M. laurifolia*, les résultats de ce travail corroborent les travaux de thèse de Gensous (2014) et Crossay (2018) qui ont souligné l'importance du rôle des AMF dans l'adaptation de cette espèce au même milieu. Pour les deux espèces, la co-inoculation des AMF avec une souche de *Curtobacterium* a montré des effets bénéfiques de ces bactéries sur la mise en place de la symbiose mycorhizienne, entraînant une amélioration significative de la croissance des plantes en comparaison des plants témoins, des plants inoculés avec les rhizobactéries seules et des plants inoculés avec les AMF seuls. Ces résultats suggèrent qu'une telle co-inoculation serait une voie prometteuse pour la restauration des sites miniers dégradés en Nouvelle-Calédonie. En perspective il serait intéressant d'isoler des souches bactériennes à partir des AMF sur des plantes choisies afin de maximiser les chances d'avoir des interactions compatibles.

### **Applications à la restauration des sites miniers : perspectives d'utilisation de microorganismes adaptés aux sols ultramafiques**

Ce travail de thèse conforte les propositions de Lagrange (2009) et Gensous (2014) sur l'inoculation des espèces végétales en vue d'une restauration écologique des sites miniers. Ces auteurs suggéraient, à terme, une utilisation d'inoculum fongiques et bactériens complémentaires. Cette thèse n'a pas permis de réaliser des essais sur le terrain dans cette optique. Cependant, les résultats obtenus en serre constituent une première étape et seraient susceptibles d'intéresser, à terme, les pépinières dans une perspective de production de plants inoculés avec des microorganismes capables de décupler la croissance et l'adaptation des plantes. Des informations sur la culture de *T. comosa* et *M. laurifolia* pour la restauration écologique, ont été récoltées auprès de pépiniéristes de Nouvelle-Calédonie (SIRAS Pacifique, Société minière Georges Montagnat, Vale, Eriaxis, SOREVAS sarl). Pour *T. comosa*, en moyenne les plants sont cultivés entre 6 et 18 mois et atteignent une taille comprise entre 10 et 15 cm. Pour *M. laurifolia*, les plants sont cultivés entre 12 et 18 mois et atteignent une taille comprise entre 15 et 20 cm. Même s'il est difficile de faire une comparaison rigoureuse, les

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

résultats suite à la co-inoculation bactérie/AMF apparaissent comme étant prometteurs (*T. comosa* : 20 cm en 8 mois ; *M. laurifolia* : 12 cm en 7 mois) pour la production de plants en pépinière. Cependant, il faut également tenir compte de la préparation des inoculums fongiques et bactériens qui présente des coûts non négligeables en termes de temps, de budget et de compétences. Nos résultats indiquent que la co-inoculation bactérie/AMF améliore la croissance des plantes notamment dans les premiers stades de croissance. Il s'agit d'un avantage non négligeable sur le terrain. Il serait donc intéressant de conduire une expérimentation sur le terrain, à la suite de celle réalisée par Amir et al. (2019) avec uniquement des AMF, afin d'estimer l'effet bénéfique de cette co-inoculation rhizobactérie/AMF dans des conditions plus naturelles.

Dans une perspective d'utilisation par des opérateurs, les futurs travaux devraient se tourner vers la recherche d'une simplification de la production des inocula. Dans cette thèse, l'inoculum fongique se présente sous forme d'une quantité de sol (contenant les spores des champignons) pouvant se conserver plusieurs mois. Alors que l'inoculum bactérien est sous forme de solution liquide préparé en laboratoire en condition stérile quelques jours avant le repiquage. Pour cet inoculum, le conditionnement des bactéries sous forme lyophilisée représenterait un avantage non négligeable mais des travaux sont nécessaires pour savoir si les mêmes effets seraient observés. L'utilisation directement des EPS bactériens représente une alternative intéressante. En effet, une expérimentation d'inoculation directement de l'EPS de *P. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> a été réalisée au sein du laboratoire (traitement en cours) et montre de meilleurs résultats sur *T. comosa* que l'inoculation de la bactérie. D'un point de vue pratique cela représenterait un avantage non négligeable car l'EPS se présente sous forme solide (aspect cotonneux) et la préparation de l'inoculum par des opérateurs ne nécessiterait qu'une mise en solution dans de l'eau. De plus l'EPS peut être stocké plusieurs mois sans nécessiter de conditionnement stérile.



## References

- Abou-Shanab, R.A., Ghanem, K., Ghanem, N., Al-Kolaibe, A., 2007a. The role of bacteria on heavy-metal extraction and uptake by plants growing on multi-metal-contaminated soils. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 253–262. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9464-x>
- Abou-Shanab, R.A.I., van Berkum, P., Angle, J.S., 2007b. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere* 68, 360–367. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.051>
- Abou-Shanab, R.I., Delorme, T. a, Angle, J.S., Chaney, R.L., Ghanem, K., Moawad, H., Ghazlan, H. a, 2003. Phenotypic Characterization of Microbes in the Rhizosphere of *Alyssum murale*. *Int. J. Phytoremediation* 5, 367–379. <https://doi.org/10.1080/16226510390268766>
- Achouak, W., Christen, R., Barakat, M., Martel, M.-H., Heulin, T., 1999. *Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 787–794. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-787>
- Adriano, D.C., 2001. Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals. Springer New York. <https://www.springer.com/gb/book/9780387986784>
- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M.S., 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.* 163, 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.04.001>
- Aizawa, T., Bao Ve, N., Vijarnsorn, P., Nakajima, M., Sunairi, M., 2010a. *Burkholderia acidipaludis* sp. nov., aluminium-tolerant bacteria isolated from Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis*) growing in highly acidic swamps in South-East Asia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 2036–2041. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.018283-0>
- Aizawa, T., Ve, N.B., Kimoto, K. -i., Iwabuchi, N., Sumida, H., Hasegawa, I., Sasaki, S., Tamura, T., Kudo, T., Suzuki, K. -i., Nakajima, M., Sunairi, M., 2007. *Curtobacterium ammoniigenes* sp. nov., an ammonia-producing bacterium isolated from plants inhabiting acidic swamps in actual acid sulfate soil areas of Vietnam. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1447–1452. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64731-0>
- Aizawa, T., Ve, N.B., Nakajima, M., Sunairi, M., 2010b. *Burkholderia heleia* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from an aquatic plant, *Eleocharis dulcis*, that grows in highly acidic swamps in actual acid sulfate soil areas of Vietnam. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1152–1157. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.015198-0>
- Aizawa, T., Vijarnsorn, P., Nakajima, M., Sunairi, M., 2011. *Burkholderia bannensis* sp. nov., an acidneutralizing bacterium isolated from torpedo grass (*Panicum repens*) growing in highly acidic swamps. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 1645–1650. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.026278-0>
- Alami, Y., Achouak, W., Marol, C., Heulin, T., 2000. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. Strain isolated from sunflower roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3393–3398. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC92161>

## REFERENCES

- Alexander, M., 1991. Introduction to soil microbiology, 2nd ed. Ne. ed. R.E. Krieger Pub. Co., Malabar, Fla. <https://book.onepdf.us/introduction-to-soil-microbiology-martin-alexander.pdf>
- Allison, D.G., 2003. The Biofilm Matrix. *Biofouling* 19, 139–150. <https://doi.org/10.1080/0892701031000072190>
- Ames, R.N., 1989. Mycorrhiza development in onion in response to inoculation with chitin decomposing actinomycetes. *New Phytol.* 112, 423–427. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1989.tb00333.x>
- Ames, R.N., Mihara, K.L., Bayne, H.G., 1989. Chitin-decomposing actinomycetes associated with a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus from a calcareous soil. *New Phytol.* 111, 67–71. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1989.tb04219.x>
- Amir, H., Cavaloc, Y., Laurent, A., Pagand, P., Gunkel, P., Lemestre, M., Médevielle, V., Pain, A., McCoy, S., 2019. Arbuscular mycorrhizal fungi and sewage sludge enhance growth and adaptation of *Metrosideros laurifolia* on ultramafic soil in New Caledonia: A field experiment. *Sci. Total Environ.* 651, 334–343. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.153>
- Amir, H., Ducouso, M., 2010. Les bactéries et les champignons du sol su roches ultramafiques, in: L’Huillier, L., Jaffré, T., Wulff, A. (Eds.), *Mines et Environnement En Nouvelle-Calédonie : Les Milieux Sur Substrats Ultramafiques et Leur Restauration*. Noumea, pp. 129–145. <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010057561>
- Amir, H., Jasper, D.A., Abbott, L.K., 2008. Tolerance and induction of tolerance to Ni of arbuscular mycorrhizal fungi from New Caledonian ultramafic soils. *Mycorrhiza* 19, 1–6. <https://doi.org/10.1007/s00572-008-0197-y>
- Amir, H., Lagrange, A., Hassaine, N., Cavaloc, Y., 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi from New Caledonian ultramafic soils improve tolerance to nickel of endemic plant species. *Mycorrhiza* 23, 585–595. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0499-6>
- Amir, H., Perrier, N., Rigault, F., Jaffré, T., 2007. Relationships between Ni-hyperaccumulation and mycorrhizal status of different endemic plant species from New Caledonian ultramafic soils. *Plant Soil* 293, 23–35. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9238-0>
- Amir, H., Pineau, R., 2003. Relationships between extractable Ni, Co, and other metals and some microbiological characteristics of different ultramafic soils from New Caledonia. *Aust. J. Soil Res.* 41, 215. <https://doi.org/10.1071/SR02040>
- Angus, A. a, Hirsch, A.M., 2013. Biofilm Formation in the Rhizosphere: Multispecies Interactions and Implications for Plant Growth, in: J, F. (Ed.), *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 701–712. <https://doi.org/10.1002/9781118297674.ch66>
- Angus, A.A., Agapakis, C.M., Fong, S., Yerrapragada, S., Estrada-de los Santos, P., Yang, P., Song, N., Kano, S., Caballero-Mellado, J., de Faria, S.M., Dakora, F.D., Weinstock, G., Hirsch, A.M., 2014. Plant-Associated Symbiotic *Burkholderia* Species Lack Hallmark Strategies Required in Mammalian Pathogenesis. *PLoS One* 9, e83779. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083779>
- Antoun, H., Kloepper, J., 2001. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR), in: *Encyclopedia of Genetics*. p. 49. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073504>
- Araújo, W.L., Maccheroni Jr., W., Aguilar-Vildoso, C.I., Barroso, P.A., Saridakis, H.O.,

## REFERENCES

- Azevedo, J.L., 2001. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Can. J. Microbiol.* 47, 229–236. <https://doi.org/10.1139/w00-146>
- Artursson, V., Finlay, R.D., Jansson, J.K., 2006. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environ. Microbiol.* 8, 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00942.x>
- Asmelash, F., Bekele, T., Birhane, E., 2016. The Potential Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Restoration of Degraded Lands. *Front. Microbiol.* 7, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01095>
- Ates, O., 2015. Systems Biology of Microbial Exopolysaccharides Production. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00200>
- Augé, R.M., 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11, 3–42. <https://doi.org/10.1007/s005720100097>
- Ayangbenro, A., Babalola, O., 2017. A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14, 94. <https://doi.org/10.3390/ijerph14010094>
- Azcón, R., 1989. Selective Interaction between free-living rhizosphere bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* 21, 639–644. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(89\)90057-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(89)90057-6)
- Azcon, R., Barea, J.M., Hayman, D.S., 1976. Utilization of rock phosphate in alkaline soils by plants inoculated with mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing bacteria. *Soil Biol. Biochem.* 8, 135–138. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(76\)90078-X](https://doi.org/10.1016/0038-0717(76)90078-X)
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M., 2006. the Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions With Plants and Other Organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 233–266. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>
- Baker, A.J.M., 1981. Accumulators and excluders strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutr.* 3, 643–654. <https://doi.org/10.1080/01904168109362867>
- Baker, A.J.M., Brooks, R.R., 1989. Terrestrial Higher Plants which Hyperaccumulate Metallic Elements. A Review of Their Distribution, Ecology and Phytochemistry. *Biorecovery* 1, 81–126. <https://doi.org/10.1080/01904168109362867>
- Bal, H.B., Das, S., Dangar, T.K., Adhya, T.K., 2013. ACC deaminase and IAA producing growth promoting bacteria from the rhizosphere soil of tropical rice plants. *J. Basic Microbiol.* 53, 972–984. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200445>
- Barea J-M., Azcón R., Azcón-Aguilar C., 2002. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 81, 343–51 <https://doi.org/10.1023/A:1020588701325>
- Barriuso, J., Pereyra, M.T., García, J.A.L., Megías, M., Mañero, F.J.G., Ramos, B., 2005. Screening for Putative PGPR to Improve Establishment of the Symbiosis *Lactarius deliciosus*-*Pinus sp.* *Microb. Ecol.* 50, 82–89. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0112-9>
- Barzanti, R., Ozino, F., Bazzicalupo, M., Gabbrielli, R., Galardi, F., Gonnelli, C., Mengoni, A., 2007. Isolation and Characterization of Endophytic Bacteria from the Nickel Hyperaccumulator Plant *Alyssum bertolonii*. *Microb. Ecol.* 53, 306–316. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9164-3>

## REFERENCES

- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., Lopez, B.R, Moreno, M., Galaviz, C. and Gonzalez, J. 2018. Environmental restoration with plant growth-promoting bacteria. In: 11th International Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Workshop. June 17-21, 2018, Victoria, Canada
- Bashan, Y., De-Bashan, L.E., Prabhu, S.R., Hernandez, J.-P., 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant Soil* 378, 1–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>
- Bashan, Y., Holguin, G., 2002. Plant growth-promoting bacteria: a potential tool for arid mangrove reforestation. *Trees* 16, 159–166. <https://doi.org/10.1007/s00468-001-0152-4>
- Bashan, Y., Holguin, G., 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol. Biochem.* 30, 1225–1228. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00187-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00187-9)
- Bashan, Y., Rojas, A., Puente, M.E., 1999. Improved establishment and development of three cactus species inoculated with *Azospirillum brasilense* transplanted into disturbed urban desert soil. *Can. J. Microbiol.* 45, 441–451. <https://doi.org/10.1139/cjm-45-6-441>
- Basu, S., Rabara, R.C., Negi, S., 2018. AMF: The future prospect for sustainable agriculture. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 102, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.11.007>
- Battini, F., Cristani, C., Giovannetti, M., Agnolucci, M., 2016. Multifunctionality and diversity of culturable bacterial communities strictly associated with spores of the plant beneficial symbiont *Rhizophagus intraradices*. *Microbiol. Res.* 183, 68–79. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.012>
- Battini, F., Grønlund, M., Agnolucci, M., Giovannetti, M., Jakobsen, I., 2017. Facilitation of phosphorus uptake in maize plants by mycorrhizosphere bacteria article. *Sci. Rep.* 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04959-0>
- Becerra-Castro, C., Kidd, P., Kuffner, M., Prieto-Fernández, Á., Hann, S., Monterroso, C., Sessitsch, A., Wenzel, W., Puschenreiter, M., 2013. Bacterially Induced Weathering of Ultramafic Rock and Its Implications for Phytoextraction. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5094–5103. <https://doi.org/10.1128/AEM.00402-13>
- Becerra-Castro, C., Kidd, P.S., Prieto-Fernández, Á., Weyens, N., Acea, M.-J., Vangronsveld, J., 2011a. Endophytic and rhizoplane bacteria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: isolation and characterisation. *Plant Soil* 340, 413–433. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0613-x>
- Becerra-Castro, C., Prieto-Fernández, A., Álvarez-Lopez, V., Monterroso, C., Cabello-Conejo, M.I., Acea, M.J., Kidd, P.S., 2011b. Nickel Solubilizing Capacity and Characterization of Rhizobacteria Isolated from Hyperaccumulating and Non-Hyperaccumulating Subspecies of *Alyssum serpyllifolium*. *Int. J. Phytoremediation* 13, 229–244. <https://doi.org/10.1080/15226514.2011.568545>
- Bedini, S., Turrini, A., Rigo, C., Argese, E., Giovannetti, M., 2010. Molecular characterization and glomalin production of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing a heavy metal polluted ash disposal island, downtown Venice. *Soil Biol. Biochem.* 42, 758–765. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.01.010>

## REFERENCES

- Behrendt, U., Ulrich, A., Schumann, P., Naumann, D., Suzuki, K., 2002. Diversity of grass-associated *Microbacteriaceae* isolated from the phyllosphere and litter layer after mulching the sward; polyphasic characterization of *Subtercola pratensis* sp. nov., *Curtobacterium herbarum* sp. nov. and *Plantibacter flavus* gen. nov., sp. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 1441–1454. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02138-0>
- Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J., Bakker, P.A.H.M., 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. Trends Plant Sci. 17, 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>
- Beukes, C.W., Palmer, M., Manyaka, P., Chan, W.Y., Avontuur, J.R., van Zyl, E., Huntemann, M., Clum, A., Pillay, M., Palaniappan, K., Varghese, N., Mikhailova, N., Stamatis, D., Reddy, T.B.K., Daum, C., Shapiro, N., Markowitz, V., Ivanova, N., Kyrpides, N., Woyke, T., Blom, J., Whitman, W.B., Venter, S.N., Steenkamp, E.T., 2017. Genome Data Provides High Support for Generic Boundaries in *Burkholderia* Sensu Lato. Front. Microbiol. 8, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01154>
- Bi, Y., Zhang, Y., Zou, H., 2018. Plant growth and their root development after inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi in coal mine subsided areas. Int. J. Coal Sci. Technol. 5, 47–53. <https://doi.org/10.1007/s40789-018-0201-x>
- Bianciotto, V., Andreotti, S., Balestrini, R., Bonfante, P., Perotto, S., 2001. Extracellular polysaccharides are involved in the attachment of *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium leguminosarum* to arbuscular mycorrhizal structures. Eur. J. Histochem. 45, 39–49. <https://doi.org/10.4081/1612>
- Bianciotto, V., Bandi, C., Minerdi, D., Sironi, M., Tichy, H. V, Bonfante, P., 1996a. An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 62, 3005–10. <https://aem.asm.org/content/62/8/3005>
- Bianciotto, V., Bonfante, P., 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi: a specialised niche for rhizospheric and endocellular bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 81, 365–371. <https://doi.org/10.1023/A:1020544919072>
- Bianciotto, V., Minerdi, D., Perotto, S., Bonfante, P., 1996b. Cellular interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizosphere bacteria. Protoplasma 193, 123–131. <https://doi.org/10.1007/BF01276640>
- Bianciotto, V., Lumini, E., Lanfranco, L., Minerdi, D., Bonfante, P., Perotto, S., 2000. Detection and identification of bacterial endosymbionts in arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the family Gigasporaceae. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4503–9. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4503-4509.2000.Updated>
- Bleeker, A.B., Kende, H., 2000. Ethylene: A Gaseous Signal Molecule in Plants. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 16, 1–18. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.1>
- Boddey, R., Urquiaga, S., Reis, V., Döbereiner, J., 1991. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. Plant Soil 137, 111–117. <https://doi.org/10.1007/BF02187441>
- Bonfante, P., Anca, I., 2009. Plants , Mycorrhizal Fungi , and Bacteria : A Network of Interactions. Annu. Rev. Microbiol. 63, 363–83. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073504>



## REFERENCES

- Bordez, L., Jourand, P., Ducouso, M., Carriconde, F., Cavaloc, Y., Santini, S., Claverie, J.M., Wantiez, L., Leveau, A., Amir, H., 2016. Distribution patterns of microbial communities in ultramafic landscape: a metagenetic approach highlights the strong relationships between diversity and environmental traits. *Mol. Ecol.* 25, 2258–2272. <https://doi.org/10.1111/mec.13621>
- Bradshaw, A., 1997. Restoration of mined lands—using natural processes. *Ecol. Eng.* 8, 255–269. [https://doi.org/10.1016/S0925-8574\(97\)00022-0](https://doi.org/10.1016/S0925-8574(97)00022-0)
- Brady, K.U., Kruckeberg, A.R., Bradshaw Jr., H.D., 2005. Evolutionary Ecology of Plant Adaptation to Serpentine Soils. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36, 243–266. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.35.021103.105730>
- Bramer, C.O., Vandamme, P., da Silva, L.F., Gomez, J., Steinbuchel, A., 2001. *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1709–1713. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-5-1709>
- Brink, S.C., 2016. Unlocking the Secrets of the Rhizosphere. *Trends Plant Sci.* 21, 169–170. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.020>
- Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme, F.W., 2000. Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 198–207. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1860>
- Brundrett, M.C., 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant Soil* 320, 37–77. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9877-9>
- Bucher, M., 2007. Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytol.* 173, 11–26. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01935.x>
- Bulgari, D., Minio, A., Casati, P., Quaglino, F., Delledonne, M., Bianco, P.A., 2014. *Curtobacterium* sp. Genome Sequencing Underlines Plant Growth Promotion-Related Traits. *Genome Announc.* 2, 10–11. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00592-14>
- Burd, Dixon, Glick, 1998. A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3663–8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC106500>
- Carvalho, F.P., 2006. Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environ. Sci. Policy* 9, 685–692. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2006.08.002>
- Chaintreuil, C., Rigault, F., Moulin, L., Jaffré, T., Fardoux, J., Giraud, E., Dreyfus, B., Bailly, X., 2007. Nickel Resistance Determinants in *Bradyrhizobium* Strains from Nodules of the Endemic New Caledonia Legume *Serianthes calycina*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 8018–8022. <https://doi.org/10.1128/AEM.01431-07>
- Chase, A.B., Arevalo, P., Polz, M.F., Berlemont, R., Martiny, J.B.H., 2016. Evidence for Ecological Flexibility in the Cosmopolitan Genus *Curtobacterium*. *Front. Microbiol.* 7, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01874>
- Chase, A.B., Gomez-Lunar, Z., Lopez, A.E., Li, J., Allison, S.D., Martiny, A.C., Martiny, J.B.H., 2018. Emergence of soil bacterial ecotypes along a climate gradient. *Environ. Microbiol.* 20, 4112–4126. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14405>

## REFERENCES

- Chase, A.B., Karaoz, U., Brodie, E.L., Gomez-Lunar, Z., Martiny, A.C., Martiny, J.B.H., 2017. Microdiversity of an Abundant Terrestrial Bacterium Encompasses Extensive Variation in Ecologically Relevant Traits. *MBio* 8, 1–11. <https://doi.org/10.1128/mBio.01809-17>
- Chen, W.-M., 2006. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1847–1851. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64325-0>
- Chen, W.-M., de Faria, S.M., Chou, J.-H., James, E.K., Elliott, G.N., Sprent, J.I., Bontemps, C., Young, J.P.W., Vandamme, P., 2008. *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpinifolia*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 2174–2179. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65816-0>
- Chen, W.-M., de Faria, S.M., James, E.K., Elliott, G.N., Lin, K.-Y., Chou, J.-H., Sheu, S.-Y., Cnockaert, M., Sprent, J.I., Vandamme, P., 2007. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1055–1059. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64873-0>
- Chen, Y.-T., Wang, Y., Yeh, K.-C., 2017. Role of root exudates in metal acquisition and tolerance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 39, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.06.004>
- Cherrier, J.F., 1990. Reverdissement des terrains miniers en Nouvelle-Calédonie. *Bois forêt des Trop.* 225, 5–23. <http://revues.cirad.fr/index.php/BFT/article/view/19663>
- Chiarucci, A., Baker, A.J.M., 2007. Advances in the ecology of serpentine soils. *Plant Soil* 293, 1–2. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9268-7>
- Chien, C.C., Lin, B.C., Wu, C.H., 2013. Biofilm formation and heavy metal resistance by an environmental *Pseudomonas* sp. *Biochem. Eng. J.* 78, 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.01.014>
- Chojnacka, K., 2010. Biosorption and bioaccumulation - the prospects for practical applications. *Environ. Int.* 36, 299–307. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.12.001>
- Coenye, T., Laevens, S., Willems, A., Ohlen, M., Hannant, W., Govan, J., Gillis, M., Falsen, E., Vandamme, P., 2001. *Burkholderia fungorum* sp. nov. and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1099–1107. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-1099>
- Coenye, T., Vandamme, P., 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ. Microbiol.* 5, 719–729. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00471.x>
- Cohan, F.M., 2006. Towards a conceptual and operational union of bacterial systematics, ecology, and evolution. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 361, 1985–1996. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1918>
- Collins, M.D., Farrow, J. a E., Goodfellow, M., Minnikin, D.E., 1983. *Brevibacterium casei* sp. nov. and *Brevibacterium epidermidis* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 4, 388–395. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(83\)80023-X](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(83)80023-X)
- Compant, S., Clément, C., Sessitsch, A., 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol. Biochem.* 42, 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>

## REFERENCES

- Compant, S., Nowak, J., Coenye, T., Clément, C., Ait Barka, E., 2008. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 607–626. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00113.x>
- Costa, O.Y.A., Raaijmakers, J.M., Kuramae, E.E., 2018. Microbial Extracellular Polymeric Substances: Ecological Function and Impact on Soil Aggregation. *Front. Microbiol.* 9, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01636>
- Costerton, J.W., 1999. Introduction to biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents* 11, 217–221. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(99\)00018-7](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(99)00018-7)
- Crossay, T., 2018. Liens entre diversité et fonctions chez les champignons mycorhiziens à arbuscules des sols ultramafiques de Nouvelle - Calédonie . Applications à la « restauration écologique ». Thèse Université de la Nouvelle-Calédonie.
- Crossay, T., Cilia, A., Cavaloc, Y., Amir, H., Redecker, D., 2018. Four new species of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*) associated with endemic plants from ultramafic soils of New Caledonia. *Mycol. Prog.* 17, 729–744. <https://doi.org/10.1007/s11557-018-1386-5>
- Danhorn, T., Fuqua, C., 2007. Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 401–422. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093316>
- De-Bashan, L.E., Hernandez, J.P., Bashan, Y., 2012. The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation - A comprehensive evaluation. *Appl. Soil Ecol.* 61, 171–189. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.09.003>
- Del Val, C., Barea, J.M., Azcón-Aguilar, C., 1999. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 718–23. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91085>
- Dell’Amico, E., Cavalca, L., Andreoni, V., 2005. Analysis of rhizobacterial communities in perennial Gramineae from polluted water meadow soil, and screening of metal-resistant, potentially plant growth-promoting bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52, 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.11.005>
- Demenois, J., Carriconde, F., Rey, F., Stokes, A., 2017b. Tropical plant communities modify soil aggregate stability along a successional vegetation gradient on a Ferralsol. *Ecol. Eng.* 109, 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.07.027>
- Demenois, J., Rey, F., Stokes, A., Carriconde, F., 2017a. Does arbuscular and ectomycorrhizal fungal inoculation improve soil aggregate stability? A case study on three tropical species growing in ultramafic Ferralsols. *Pedobiologia (Jena)*. 64, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2017.08.003>
- Dessaux, Y., Grandclément, C., Faure, D., 2016. Engineering the Rhizosphere. *Trends Plant Sci.* 21, 266–278. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.002>
- Dobritsa, A.P., Samadpour, M., 2016. Transfer of eleven species of the genus *Burkholderia* to the genus *Paraburkholderia* and proposal of *Caballeronia* gen. nov. to accommodate twelve species of the genera *Burkholderia* and *Paraburkholderia*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 2836–2846. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001065>
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J.C., Schorr-Galindo, S., 2012. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydr. Polym.* 87, 951–962. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.083>



## REFERENCES

- Dourado, M.N., Franco, M.R., Peters, L.P., Martins, P.F., Souza, L.A., Piotto, F.A., Azevedo, R.A., 2015. Antioxidant enzymes activities of *Burkholderia* spp. strains—oxidative responses to Ni toxicity. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 19922–19932. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5204-1>
- Dunleavy, J.M., 1989. *Curtobacterium plantarum* sp. nov. is ubiquitous in plant leaves and is seed transmitted in soybean and corn. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 240–249. <https://doi.org/10.1099/00207713-39-3-240>
- Duponnois, R., Garbaye, J., 1991. Mycorrhization helper bacteria associated with the Douglas fir-*Laccaria laccata* symbiosis: effects in aseptic and in glasshouse conditions. *Ann. des Sci. For.* 48, 239–251. <https://doi.org/10.1051/forest:19910301>
- Echevarria, G., Massoura, S.T., Sterckeman, T., Becquer, T., Schwartz, C., Morel, J.L., 2006. Assessment and control of the bioavailability of Nickel in soils. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 643. <https://doi.org/10.1897/05-051R.1>
- Echevarria, G., Morel, J.-L., Fardeau, J.C., Leclerc-Cessac, E., 1998. Assessment of phytoavailability of nickel in soils. *J. Environ. Qual.* 27, 1064–1070. <https://doi.org/10.2134/jeq1998.00472425002700050011x>
- Emam, T., 2016. Local soil, but not commercial AMF inoculum, increases native and non-native grass growth at a mine restoration site. *Restor. Ecol.* 24, 35–44. <https://doi.org/10.1111/rec.12287>
- Estrada-de los Santos, P., Palmer, M., Chávez-Ramírez, B., Beukes, C., Steenkamp, E., Briscoe, L., Khan, N., Maluk, M., Lafos, M., Humm, E., Arrabit, M., Crook, M., Gross, E., Simon, M., dos Reis Junior, F., Whitman, W., Shapiro, N., Poole, P., Hirsch, A., Venter, S., James, E., 2018. Whole Genome Analyses Suggests that *Burkholderia* sensu lato Contains Two Additional Novel Genera (*Mycetohabitans* gen. nov., and *Trinickia* gen. nov.): Implications for the Evolution of Diazotrophy and Nodulation in the *Burkholderiaceae*. *Genes (Basel)*. 9, 389. <https://doi.org/10.3390/genes9080389>
- Etesami, H., 2018. Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues: Mechanisms and future prospects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 147, 175–191. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.032>
- Evtushenko, L.I., Takeuchi, M., 2006. The Family *Microbacteriaceae*, in: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H.S. & E.S. (Ed.), *The Prokaryotes*. Springer New York, New York, NY, pp. 1020–1098. [https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5\\_43](https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_43)
- Fan, X., Hu, H., Huang, G., Huang, F., Li, Y., Palta, J., 2015. Soil inoculation with *Burkholderia* sp. LD-11 has positive effect on water-use efficiency in inbred lines of maize. *Plant Soil* 390, 337–349. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2410-z>
- Ferreira, A.S., 2011. Insights into the role of extracellular polysaccharides in *Burkholderia* adaptation to different environments. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 1, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2011.00016>
- Fitzsimons, M.S., Miller, R.M., 2010. Serpentine soil has little influence on the root-associated microbial community composition of the serpentine tolerant grass species *Avenula sulcata*. *Plant Soil* 330, 393–405. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0213-9>
- Fogliani, B., 2002. De la connaissance physiologique des Cunoniaceae endémiques de la Nouvelle-Calédonie, à la recherche des caractéristiques physico-chimiques et biologiques de leurs substances bioactives d' intérêt 403. <https://doi.org/10.6098/2005NCAL0007>

## REFERENCES

- Fortin, J., Plenchette, C., Piché, Y., 2008. Les mycorhizes : La nouvelle révolution verte, Multimonde. ed. <https://www.quae.com/produit/1344/9782759224357/les-mycorhizes>
- Frayse, N., Couderc, F., Poinot, V., 2003. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* 270, 1365–1380. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03492.x>
- Freitas, F., Alves, V.D., Reis, M.A.M., 2011. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends Biotechnol.* 29, 388–398. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.03.008>
- Frey-Klett, P., Garbaye, J., Tarkka, M., 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol.* 176, 22–36. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02191.x>
- Galaviz, C., Lopez, B.R., De-Bashan, L.E., Hirsch, A.M., Maymon, M., Bashan, Y., 2018. Root growth improvement of mesquite seedlings and bacterial rhizosphere and soil community changes are induced by inoculation with plant growth-promoting bacteria and promote restoration of eroded desert soil. *L. Degrad. Dev.* 29, 1453–1466. <https://doi.org/10.1002/ldr.2904>
- Gamalero, E., Lingua, G., Berta, G., Glick, B.R., 2009. Beneficial role of plant growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant responses to heavy metal stress. *Can. J. Microbiol.* 55, 501–514. <https://doi.org/10.1139/w09-010>
- Garbaye, J., 1994a. Les bactéries auxiliaires de la mycorhization: une nouvelle dimension de la symbiose mycorhizienne. *Acta Bot. Gall.* 141, 517–521. <https://doi.org/10.1080/12538078.1994.10515192>
- Garbaye, J., 1994b. Tansley Review No. 76 Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 128, 197–210. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb04003.x>
- Gaur, A., Adholeya, A., 2004. Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Curr. Sci.* 86, 528–534. <https://doi.org/10.2307/24107905>
- Gavini, F., Mergaert, J., Beji, A., C., M., Izard, D., Kersters, K., De Ley, J., 1989. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and Description of *Pantoea dispersa* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 337–345. <https://doi.org/10.1099/00207713-39-3-337>
- Gensous, S., 2014. Les champignons mycorhiziens à arbuscules des sols ultramafiqes de Nouvelle-Calédonie. Thèse, Université de la Nouvelle-Calédonie. <https://doi.org/10.6098/2014NCAL0062>
- Giovanella, P., Cabral, L., Costa, A.P., de Oliveira Camargo, F.A., Gianello, C., Bento, F.M., 2017. Metal resistance mechanisms in Gram-negative bacteria and their potential to remove Hg in the presence of other metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 140, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.010>
- Glick, B.R., 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.* 169, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>
- Glick, B.R., 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica* (Cairo). 2012, 1–15. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>

## REFERENCES

- Glick, B.R., 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol. Adv.* 21, 383–393. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(03\)00055-7](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(03)00055-7)
- Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J., Duan, J., 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119, 329–339. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9162-4>
- Gonçalves, S.C., Martins-Loução, M.A., Freitas, H., 2009. Evidence of adaptive tolerance to nickel in isolates of *Cenococcum geophilum* from serpentine soils. *Mycorrhiza* 19, 221–230. <https://doi.org/10.1007/s00572-008-0211-4>
- Gonin, M., Gensous, S., Lagrange, A., Ducouso, M., Amir, H., Jourand, P., 2013. Rhizosphere bacteria of *Costularia* spp. from ultramafic soils in New Caledonia: diversity, tolerance to extreme edaphic conditions, and role in plant growth and mineral nutrition. *Can. J. Microbiol.* 59, 164–174. <https://doi.org/10.1139/cjm-2012-0570>
- Gonzalez, H., Jensen, T.E., 1998. Nickel sequestering by polyphosphate bodies in *Staphylococcus aureus*. *Microbios* 93, 179–85. <https://europepmc.org/abstract/med/9721673>
- Goris, J., 2004. Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1677–1681. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63101-0>
- Goris, J., Dejonghe, W., Falsen, E., De Clerck, E., Geeraerts, B., Willems, A., Top, E.M., Vandamme, P., De Vos, P., 2002. Diversity of Transconjugants that Acquired Plasmid pJP4 or pEMT1 after Inoculation of a Donor Strain in the A- and B-horizon of an Agricultural Soil and Description of *Burkholderia hospita* sp. nov. and *Burkholderia terricola* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 340–352. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00134>
- Gouda, S., Kerry, R.G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H.S., Patra, J.K., 2018. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiol. Res.* 206, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>
- Gourmelon, V., Maggia, L., Powell, J.R., Gigante, S., Hortal, S., Gueunier, C., Letellier, K., Carriconde, F., 2016. Environmental and Geographical Factors Structure Soil Microbial Diversity in New Caledonian Ultramafic Substrates: A Metagenomic Approach. *PLoS One* 11, e0167405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167405>
- Grandlic, C.J., Mendez, M.O., Chorover, J., Machado, B., Maier, R.M., 2008. Plant Growth-Promoting Bacteria for Phytostabilization of Mine Tailings. *Environ. Sci. Technol.* 42, 2079–2084. <https://doi.org/10.1021/es072013j>
- Gray, E.J., Smith, D.L., 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biol. Biochem.* 37, 395–412. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.08.030>
- Guentas, L., Gensous, S., Cavaloc, Y., Ducouso, M., Amir, H., De Georges de Ledenon, B., Moulin, L., Jourand, P., 2016. *Burkholderia novacaledonica* sp. nov. and *B. ultramafica* sp. nov. isolated from roots of *Costularia* spp. pioneer plants of ultramafic soils in New Caledonia. *Syst. Appl. Microbiol.* 39, 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.03.008>

## REFERENCES

- Guo, J.K., Ding, Y.Z., Feng, R.W., Wang, R.G., Xu, Y.M., Chen, C., Wei, X.L., Chen, W.M., 2015. *Burkholderia metalliresistens* sp. nov., a multiple metal-resistant and phosphate-solubilising species isolated from heavy metal-polluted soil in Southeast China. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 107, 1591–1598. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0453-z>
- Gupta, P., Diwan, B., 2017. Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnol. Reports* 13, 58–71. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.12.006>
- Hartmann, A., Rothballer, M., Schmid, M., 2008. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil* 312, 7–14. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9514-z>
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., Ahmed, I., 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann. Microbiol.* 60, 579–598. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1>
- Hedges, F., 1922. A bacterial wilt of the bean cause by *bacterium flaccumfaciens* nov. sp. *Science* (80-. ). 55, 433–434. <https://doi.org/10.1126/science.55.1425.433>
- Herrera, A., Héry, M., Stach, J.E.M., Jaffré, T., Normand, P., Navarro, E., 2007. Species richness and phylogenetic diversity comparisons of soil microbial communities affected by nickel-mining and revegetation efforts in New Caledonia. *Eur. J. Soil Biol.* 43, 130–139. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2006.12.001>
- Hery, M., Nazaret, S., Jaffré, T., Normand, P., Navarro, E., 2003. Adaptation to nickel spiking of bacterial communities in neocaledonian soils. *Environ. Microbiol.* 5, 3–12. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00380.x>
- Hopkins, N.A., 1987. Mycorrhizae in a California serpentine grassland community. *Can. J. Bot.* 65, 484–487. <https://doi.org/10.1139/b87-059>
- Huang, G.H., Tian, H.H., Liu, H.Y., Fan, X.W., Liang, Y., Li, Y.Z., 2013. Characterization of plant-growth-promoting effects and concurrent promotion of heavy metal accumulation in the tissues of the plants grown in the polluted soil by *Burkholderia* strain LD-11. *Int. J. Phytoremediation* 15, 991–1009. <https://doi.org/10.1080/15226514.2012.751354>
- Idris, R., Trifonova, R., Puschenreiter, M., Wenzel, W.W., Sessitsch, A., 2004. Bacterial Communities Associated with Flowering Plants of the Ni Hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2667–2677. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.2667-2677.2004>
- Isnard, S., L’Huillier, L., Rigault, F., Jaffré, T., 2016. How did the ultramafic soils shape the flora of the New Caledonian hotspot ? *Plant Soil* 403, 53–76. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2910-5>
- Izumi, H., Cairney, J.W.G., Killham, K., Moore, E., Alexander, I.J., Anderson, I.C., 2008. Bacteria associated with ectomycorrhizas of slash pine (*Pinus elliottii*) in south-eastern Queensland, Australia. *FEMS Microbiol. Lett.* 282, 196–204. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01122.x>
- Jaffré, T., 1980. Etude écologique du peuplement végétal des sols dérivés de roches ultrabasiqes en Nouvelle- Calédonie. <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:00393>

## REFERENCES

- Jaffré, T., Brooks, R.R., Lee, J., Reeves, R.D., 1976a. *Sebertia acuminata*: A Hyperaccumulator of Nickel from New Caledonia. *Science* (80- ). 193, 579–580. <https://doi.org/10.1126/science.193.4253.579>
- Jaffré, T., L’huillier, L., 2010. Conditions de milieu des terrains miniers, in: L’Huillier, L., Jaffré, T., Wulff, A. (Eds.), *Mines et Environnement En Nouvelle-Calédonie : Les Milieux Sur Substrats Ultramafiques et Leur Restauration*. Noumea, pp. 33–44. <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010057558>
- Jaffré, T., L’Huillier, L., 2010. La végétation des roches ultramafiques ou terrains miniers, in: L’Huillier, L., Jaffré, T., Wulff, A. (Eds.), *Mines et Environnement En Nouvelle-Calédonie : Les Milieux Sur Substrats Ultramafiques et Leur Restauration*. Noumea, pp. 45–103. <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010057559>
- Jaffré, T., Latham, M., 1976. Recherches sur les possibilités d’implantation végétale sur déblais miniers - Rapport final. Nouméa : ORSTOM, 18 p. multigr. <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:08408>
- Jaffré, T., Latham, M., 1974. Contribution à l’étude des relations sol-végétation sur un massif de roches ultrabasiqes de la côte Ouest de la Nouvelle Calédonie : le Boulinda. *Adansonia*. Série 2 14, 311–336. <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:07283>
- Jaffré, T., Pelletier, B., 1992. Plantes de Nouvelle Calédonie permettant de revegetaliser des sites miniers, : SLN (NCL), 114 p. <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010006765>
- Jaffré, T., Rigault, F., Dagostini, G., Tinel-fambart, J., Wulff, A., Munzinger, J., 2004. Input of the Different Vegetation Units To the Richness and Endemicity of the New Caledonian Flora. In: Mery P. (ed.) *Proceedings of the 11th Pacific Science Inter-Congress, Tahiti, French Polynesia, 2-6 March, 2009*. Honolulu HI: Pacific Science Association, 1-4. Pacific Science Inter-Congress, 11., Papeete (PYF), 2009/03/02-06. <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010060983>
- Jaffré, T., Rigault, F., Sarrailh, J., 1997. Quelle méthode de végétalisation pour la réhabilitation des anciens sites miniers de Nouvelle-Calédonie. In : JAFFRÉ TANGUY (ED.), Reeves R.D. (ed.), BECQUER THIERRY (ED.). *Ecologie des milieux sur roches ultramafiques et sur sols métallifères : actes de la deuxième conférence internationale sur l’écologie des milieux serpentiniques*. Nouméa : ORSTOM, (2), 285-288. (Documents Scientifiques et Techniques - ORSTOM : III ; 2). Conférence Internationale sur l’Ecologie des Milieux Serpentiniques = International Conference on Serpentine Ecology, 2., Nouméa (NCL), 1995/07/31. ISSN 1245-222X. <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010011257>
- Jaffré, T., Veillon, J.M., 1994. Les principales formations végétales autochtones en Nouvelle-Calédonie : caractéristiques, vulnérabilité, mesures de sauvegarde. Nouméa : ORSTOM, (2), 12 p. multigr. (Sciences de la Vie. Biodiversité. Rapports de Synthèse ; 2). <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010028266>
- Janse, J.M., 1896. Les endophytes radicaux de quelques plantes javanaises. *Ann. du Jard. Bot. Buitenzorg* 14, 53–212. <http://mhp.myspecies.info/node/3129>
- Javaid, A., 2011. *Biomanagement of Metal-Contaminated Soils, Environmental Pollution*. Springer Netherlands, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1914-9>



## REFERENCES

- Jiang, C. yu, Sheng, X. fang, Qian, M., Wang, Q. ya, 2008. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia sp.* from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere* 72, 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.02.006>
- Johnson, J.L., 1973. Use of Nucleic-Acid Homologies in the Taxonomy of Anaerobic Bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23, 308–315. <https://doi.org/10.1099/00207713-23-4-308>
- Jourand, P., Ducouso, M., Loulergue-Majorel, C., Hannibal, L., Santoni, S., Prin, Y., Lebrun, M., 2010. Ultramafic soils from New Caledonia structure *Pisolithus albus* in ecotype. *FEMS Microbiol. Ecol.* 72, 238–249. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00843.x>
- Kamilova, F., Kravchenko, L. V., Shaposhnikov, A.I., Azarova, T., Makarova, N., Lugtenberg, B., 2006. Organic Acids, Sugars, and L-Tryptophane in Exudates of Vegetables Growing on Stonewool and Their Effects on Activities of Rhizosphere Bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19, 250–256. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0250>
- Kandel, S., Joubert, P., Doty, S., 2017a. Bacterial Endophyte Colonization and Distribution within Plants. *Microorganisms* 5, 77. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040077>
- Kandel, S.L., Firrincieli, A., Joubert, P.M., Okubara, P.A., Leston, N.D., McGeorge, K.M., Mugnozza, G.S., Harfouche, A., Kim, S.-H., Doty, S.L., 2017b. An In vitro Study of Bio-Control and Plant Growth Promotion Potential of Salicaceae Endophytes. *Front. Microbiol.* 8, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00386>
- Karandashov, V., Bucher, M., 2005. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends Plant Sci.* 10, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.12.003>
- Kaushal, M., Wani, S.P., 2016. Rhizobacterial-plant interactions: Strategies ensuring plant growth promotion under drought and salinity stress. *Agric. Ecosyst. Environ.* 231, 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.06.031>
- Kazakou, E., Dimitrakopoulos, P.G., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Troumbis, A.Y., 2008. Hypotheses, mechanisms and trade-offs of tolerance and adaptation to serpentine soils: from species to ecosystem level. *Biol. Rev.* 495–508. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00051.x>
- Keys, C.J., Dare, D.J., Sutton, H., Wells, G., Lunt, M., McKenna, T., McDowall, M., Shah, H.N., 2004. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect. Genet. Evol.* 4, 221–242. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2004.02.004>
- Khan, A.G., 2008. Microbial Dynamics in the Mycorrhizosphere with Special Reference to Arbuscular Mycorrhizae, in: *Plant-Bacteria Interactions*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp. 245–256. <https://doi.org/10.1002/9783527621989.ch13>
- Khan, A.G., 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18, 355–64. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.006>
- Kim, H.-B., Park, M.-J., Yang, H.-C., An, D.-S., Jin, H.-Z., Yang, D.-C., 2006. *Burkholderia ginsengisoli* sp. nov., a beta-glucosidase-producing bacterium isolated from soil of a ginseng field. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2529–2533. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64387-0>

## REFERENCES

- Kim, H., Park, D.-S., Oh, H.-W., Lee, K.H., Chung, D.-H., Park, H.-Y., Park, H.-M., Bae, K.S., 2012. *Gryllotalpicola* gen. nov., with descriptions of *Gryllotalpicola koreensis* sp. nov., *Gryllotalpicola daejeonensis* sp. nov. and *Gryllotalpicola kribbensis* sp. nov. from the gut of the African mole cricket, *Gryllotalpa africana*, and reclassification of *Curtobacterium ginsengisoli* as *Gryllotalpicola ginsengisoli* com. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 2363–2370. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.034678-0>
- Kim, M.K., Kim, Y.-J., Kim, H.-B., Kim, S.-Y., Yi, T.-H., Yang, D.-C., 2008. *Curtobacterium ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 2393–2397. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65591-0>
- Kjelleberg, S., Molin, S., 2002. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Curr. Opin. Microbiol.* 254–258. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12057678>
- Kloepper, J. W. 2018. Origins and progress of PGPR research. In: 11th International Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Workshop. June 17-21, 2018, Victoria, Canada
- Kloepper, J.W., Schrotch, M.N., 1981. Development of a Powder Formulation of Rhizobacteria for Inoculation of Potato Seed Pieces. *Phytopathology* 71, 590. <https://doi.org/10.1094/Phyto-71-590>
- Kloepper, J.W., Schroth, M.N., 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes, in: IVth International Conference Plant Pathogenic Bacteria. Angers, France, pp. 879–882. <http://www.bashanfoundation.org/contributions/Kloepper-J/kloeperradish.pdf>
- Klonowska, A., Chaintreuil, C., Tisseyre, P., Miché, L., Melkonian, R., Ducouso, M., Laguerre, G., Brunel, B., Moulin, L., 2012. Biodiversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts (*Cupriavidus taiwanensis*, *Rhizobium mesoamericanum*) in New Caledonia and their adaptation to heavy metal-rich soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 81, 618–635. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)10017-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)10017-X)
- Koehler, S., Farasin, J., Cleiss-Arnold, J., Arsène-Ploetze, F., 2015. Toxic metal resistance in biofilms: diversity of microbial responses and their evolution. *Res. Microbiol.* 166, 764–773. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.03.008>
- Komagata, K., Izuka, H., 1964. New species of *Brevibacterium* Isolated from Rice. *J. Agric. Chem. Soc. Japan* 38, 496–502. <https://doi.org/10.1271/nogeikagaku1924.38.496>
- Kruckeberg, A.R., 1986. An Essay: The Stimulus of Unusual Geologies for Plant Speciation. *Syst. Bot.* 11, 455–463. <https://doi.org/10.2307/2419082>
- Kucey, R.M., 1987. Increased Phosphorus Uptake by Wheat and Field Beans Inoculated with a Phosphorus-Solubilizing *Penicillium bilaji* Strain and with Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2699–703 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16347487>
- Kuffner, M., De Maria, S., Puschenreiter, M., Fallmann, K., Wieshammer, G., Gorfer, M., Strauss, J., Rivelli, A.R., Sessitsch, A., 2010. Culturable bacteria from Zn- and Cd-accumulating *Salix caprea* with differential effects on plant growth and heavy metal availability. *J. Appl. Microbiol.* 108, 1471–1484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04670.x>
- L’Huillier, L., Edighoffer, S., 1996. Extractability of nickel and its concentration in cultivated plants in Ni rich ultramafic soils of New Caledonia. *Plant Soil* 186, 255–264. <https://doi.org/10.1007/BF02415521>

## REFERENCES

- L'Huillier, L., Jaffré, T., 2010. L'exploitation des minerais de Nickel en Nouvelle-Calédonie, in: L'Huillier, L., Jaffré, T., Wulff, A. (Eds.), Mines et Environnement En Nouvelle-Calédonie : Les Milieux Sur Substrats Ultramafiques et Leur Restauration. Noumea, pp. 129–145. <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010057557>
- L'huillier, L., Wulff, A., Gâteblé, G., Fogliani, B., Zongo, C., Jaffré, T., 2010. La restauration des sites miniers, in: L'Huillier, L., Jaffré, T., Wulff, A. (Eds.), Mines et Environnement En Nouvelle-Calédonie : Les Milieux Sur Substrats Ultramafiques et Leur Restauration. Noumea, pp. 147–230. <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010057562>
- Lagrange, A., 2009. Etudes écologique et microbiologique des espèces du genre *Costularia* (Cyperaceae), pionnières des sols ultramafiques en nouvelle-calédonie : perspectives d'application à la restauration écologique. Thèse, Université de la Nouvelle Calédonie. <https://doi.org/10.6098/2009NCAL0023>
- Lagrange, A., Ducouso, M., Jourand, P., Majorel, C., Amir, H., 2011. New insights into the mycorrhizal status of Cyperaceae from ultramafic soils in New Caledonia. *Can. J. Microbiol.* 57, 21–28. <https://doi.org/10.1139/W10-096>
- Lagrange, A., L'Huillier, L., Amir, H., 2013. Mycorrhizal status of Cyperaceae from New Caledonian ultramafic soils: Effects of phosphorus availability on arbuscular mycorrhizal colonization of *Costularia comosa* under field conditions. *Mycorrhiza* 23, 655–661. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0503-1>
- Lambers, H., Shane, M.W., Cramer, M.D., Pearse, S.J., Veneklaas, E.J., 2006. Root Structure and Functioning for Efficient Acquisition of Phosphorus: Matching Morphological and Physiological Traits. *Ann. Bot.* 98, 693–713. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl114>
- Lamont, B.B., 2003. Structure, ecology and physiology of root clusters – a review. *Plant Soil* 248, 1–19. <https://doi.org/10.1023/A:1022314613217>
- Lamont, B.B., 1974. The biology of Dauciform roots in the sedge *Cyathochaete avenacea*. *New Phytol.* 73, 985–996. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1974.tb01327.x>
- Lamont, B.B., Pérez-Fernández, M., Rodríguez-Sánchez, J., 2015. Soil bacteria hold the key to root cluster formation. *New Phytol.* 206, 1156–1162. <https://doi.org/10.1111/nph.13228>
- Larridon, I., Bauters, K., Semmouri, I., Viljoen, J.-A., Prychid, C.J., Muasya, A.M., Bruhl, J.J., Wilson, K.L., Senterre, B., Goetghebeur, P., 2018a. Molecular phylogenetics of the genus *Costularia* (Schoeneae, Cyperaceae) reveals multiple distinct evolutionary lineages. *Mol. Phylogenet. Evol.* 126, 196–209. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.04.016>
- Larridon, I., Verboom, G.A., Muasya, A.M., 2018b. Revised delimitation of the genus *Tetraria*, nom. cons. prop. (Cyperaceae, tribe Schoeneae, Tricostularia clade). *South African J. Bot.* 118, 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.06.007>
- Ledin, M., 2000. Accumulation of metals by microorganisms — processes and importance for soil systems. *Earth-Science Rev.* 51, 1–31. [https://doi.org/10.1016/S0012-8252\(00\)00008-8](https://doi.org/10.1016/S0012-8252(00)00008-8)
- Lerat, S., Lapointe, L., Gutjahr, S., Piche, Y., Vierheilig, H., 2003. Carbon partitioning in a split-root system of arbuscular mycorrhizal plants is fungal and plant species dependent. *New Phytol.* 157, 589–595. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00691.x>
- Leyval, C., Turnau, K., Haselwandter, K., 1997. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* 7, 139–153. <https://doi.org/10.1007/s005720050174>



## REFERENCES

- Lim, J.H., Baek, S.-H., Lee, S.-T., 2008. *Burkholderia sediminicola* sp. nov., isolated from freshwater sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 565–569. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65502-0>
- Linderman, R.G., 1991. Mycorrhizal interactions in the rhizosphere, in: *The Rhizosphere and Plant Growth*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 343–348. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-3336-4\\_73](https://doi.org/10.1007/978-94-011-3336-4_73)
- Liu, Y.-H., Guo, J.-W., Salam, N., Li, L., Zhang, Y.-G., Han, J., Mohamad, O.A., Li, W.-J., 2016. Culturable endophytic bacteria associated with medicinal plant *Ferula songorica*: molecular phylogeny, distribution and screening for industrially important traits. *3 Biotech* 6, 209. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0522-7>
- Long, L., Lin, Q., Yao, Q., Zhu, H., 2017. Population and function analysis of cultivable bacteria associated with spores of arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *3 Biotech* 7, 4–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0612-1>
- Lopes-Santos, L., Castro, D.B.A., Ferreira-Tonin, M., Corrêa, D.B.A., Weir, B.S., Park, D., Ottoboni, L.M.M., Neto, J.R., Destéfano, S.A.L., 2017. Reassessment of the taxonomic position of *Burkholderia andropogonis* and description of *Robbsia andropogonis* gen. nov., comb. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* 110, 727–736. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0842-6>
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., Herrera-Estrella, L., 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 280–287. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00035-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00035-9)
- Losfeld, G., Escande, V., Jaffré, T., L’Huillier, L., Grison, C., 2012. The chemical exploitation of nickel phytoextraction: An environmental, ecologic and economic opportunity for New Caledonia. *Chemosphere* 89, 907–910. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.05.004>
- Losfeld, G., L’Huillier, L., Fogliani, B., Jaffré, T., Grison, C., 2015a. Mining in New Caledonia: environmental stakes and restoration opportunities. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 5592–5607. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3358-x>
- Losfeld, G., Mathieu, R., L’Huillier, L., Fogliani, B., Jaffré, T., Grison, C., 2015b. Phytoextraction from mine spoils: insights from New Caledonia. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 5608–5619. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3866-8>
- Lu, P., Zheng, L.-Q., Sun, J.-J., Liu, H.-M., Li, S.-P., Hong, Q., Li, W.-J., 2012. *Burkholderia zhejiangensis* sp. nov., a methyl-parathion-degrading bacterium isolated from a wastewater-treatment system. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 1337–1341. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.035428-0>
- Luçon, S., Marion, F., Niel, J., Pelletier, B., 1994. Réhabilitation des sites miniers sur roches ultramafiques en Nouvelle-Calédonie. *Ecol. des milieux sur roches ultramafiques sur sols métallifères* 297–303. [http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins\\_textes/pleins\\_textes\\_7/carton01/010011243.pdf](http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_7/carton01/010011243.pdf)
- Lucy, M., Reed, E., R. Glick, B., 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 86, 1–25. <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000024903.10757.6e>
- Lugtenberg, B., Kamilova, F., 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 541–556. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>

## REFERENCES

- Ma, Y., Oliveira, R.S., Freitas, H., Zhang, C., 2016. Biochemical and Molecular Mechanisms of Plant-Microbe-Metal Interactions: Relevance for Phytoremediation. *Front. Plant Sci.* 7, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00918>
- Ma, Y., Rajkumar, M., Freitas, H., 2009. Isolation and characterization of Ni mobilizing PGPB from serpentine soils and their potential in promoting plant growth and Ni accumulation by *Brassica* spp. *Chemosphere* 75, 719–725. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.056>
- Ma, Y., Rajkumar, M., Rocha, I., Oliveira, R.S., Freitas, H., 2015. Serpentine bacteria influence metal translocation and bioconcentration of *Brassica juncea* and *Ricinus communis* grown in multi-metal polluted soils. *Front. Plant Sci.* 5, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00757>
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Sa, T., 2007. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Chemosphere* 69, 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.017>
- Masoumi, F., Khadivinia, E., Alidoust, L., Mansourinejad, Z., Shahryari, S., Safaei, M., Mousavi, A., Salmanian, A.-H., Zahiri, H.S., Vali, H., Noghabi, K.A., 2016. Nickel and lead biosorption by *Curtobacterium* sp. FM01, an indigenous bacterium isolated from farmland soils of northeast Iran. *J. Environ. Chem. Eng.* 4, 950–957. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2015.12.025>
- Mattos, K. a., Jones, C., Heise, N., Previato, J.O., Mendonça-Previato, L., 2001. Structure of an acidic exopolysaccharide produced by the diazotrophic endophytic bacterium *Burkholderia brasiliensis*. *Eur. J. Biochem.* 268, 3174–3179. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02196.x>
- McCully, M., 2005. The rhizosphere: the key functional unit in plant/soil/microbial interactions in the field. Implications for the understanding of allelopathic effects., in: *Proceedings of the 4th World Congress on Allelopathy.* pp. 1–8. [http://www.regional.org.au/au/allelopathy/2005/1/1/2726\\_mccullyme.htm](http://www.regional.org.au/au/allelopathy/2005/1/1/2726_mccullyme.htm)
- Mengoni, A., Barzanti, R., Gonnelli, C., Gabbrielli, R., Bazzicalupo, M., 2001. Characterization of nickel-resistant bacteria isolated from serpentine soil. *Environ. Microbiol.* 3, 691–698. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00243.x>
- Mengoni, A., Grassi, E., Barzanti, R., Biondi, E.G., Gonnelli, C., Kim, C.K., Bazzicalupo, M., 2004. Genetic Diversity of Bacterial Communities of Serpentine Soil and of Rhizosphere of the Nickel-Hyperaccumulator Plant *Alyssum bertolonii*. *Microb. Ecol.* 48, 209–217. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-0149-1>
- Mengoni, A., Schat, H., Vangronsveld, J., 2010. Plants as extreme environments? Ni-resistant bacteria and Ni-hyperaccumulators of serpentine flora. *Plant Soil* 331, 5–16. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0242-4>
- Mercky, S., 1999. Rhizobactéries natives de Nouvelle-Calédonie: Réhabilitation des sites miniers dégradés. *Bois Forêts Des Trop.* 262, 80–83. <http://revues.cirad.fr/index.php/BFT/article/view/19981>
- Mercky, S., 1998. Rhizobactéries natives de Nouvelle-Calédonie, promotrices de la croissance des plantes. Thèse, Université Française du Pacifique. <http://www.sudoc.fr/049564870>

## REFERENCES

- Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H.G., Gerits, J., Charles, P., Van Gijsegem, F., 1985. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J. Bacteriol.* 162, 328–34. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC218993>
- Meyer, J.R., Linderman, R.G., 1986. Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*. *Soil Biol. Biochem.* 18, 185–190. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(86\)90025-8](https://doi.org/10.1016/0038-0717(86)90025-8)
- Miller, S.H., Browne, P., Prigent-Combaret, C., Combes-Meynet, E., Morrissey, J.P., O’Gara, F., 2009. Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol. Rep.* 2, 403–411. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00105.x>
- Minerdi, D., Bianciotto, V., Bonfante, P., 2002. Endosymbiotic bacteria in mycorrhizal fungi: from their morphology to genomic sequences. *Plant Soil* 244, 211–219. <https://doi.org/10.1023/A:1020211821753>
- Miransari, M., 2011. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 917–930. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3004-6>
- Mishra, J., Singh, R., Arora, N.K., 2017. Alleviation of Heavy Metal Stress in Plants and Remediation of Soil by Rhizosphere Microorganisms. *Front. Microbiol.* 8, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01706>
- Morat, P., Jaffré, T., Tronchet, F., Munzinger, J., Pillon, Y., Veillon, J., Chalopin, M., Birnbaum, P., Rigault, F., Dagostini, G., Tinel, J., Lowry, P.P., 2012. Le référentiel taxonomique Florical et les caractéristiques de la flore vasculaire indigène de la Nouvelle-Calédonie. *Adansonia* 34, 179–221. <https://doi.org/10.5252/a2012n2a1>
- Mosa, K.A., Saadoun, I., Kumar, K., Helmy, M., Dhankher, O.P., 2016. Potential Biotechnological Strategies for the Cleanup of Heavy Metals and Metalloids. *Front. Plant Sci.* 7, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00303>
- Moser, A.M., Petersen, C.A., D’Allura, J.A., Southworth, D., 2005. Comparison of ectomycorrhizas of *Quercus garryana* (*Fagaceae*) on serpentine and non-serpentine soils in southwestern Oregon. *Am. J. Bot.* 92, 224–230. <https://doi.org/10.3732/ajb.92.2.224>
- Mosse, B., 1959. The regular germination of resting spores and some observations on the growth requirements of an Endogone sp. causing vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 42, 273-IN4. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(56\)80033-8](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(56)80033-8)
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., Boivin-Masson, C., 2001. Erratum: Nodulation of legumes by members of the  $\beta$ -subclass of Proteobacteria. *Nature* 412, 926–926. <https://doi.org/10.1038/35091106>
- Muler, A.L., Oliveira, R.S., Lambers, H., Veneklaas, E.J., 2014. Does cluster-root activity benefit nutrient uptake and growth of co-existing species ? *Oecologia* 174, 23–31. <https://doi.org/10.1007/s00442-013-2747-z>
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51, 263–273. <https://doi.org/10.1101/SQB.1986.051.01.032>
- Myers, N., 2003. Biodiversity Hotspots Revisited. *Bioscience* 53, 916–917. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2003\)053\[0916:BHR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2003)053[0916:BHR]2.0.CO;2)

## REFERENCES

- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B., Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853–858. <https://doi.org/10.1038/35002501>
- Nacef, M., Chevalier, M., Chollet, S., Drider, D., Flahaut, C., 2017. MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: The Maroilles. *Int. J. Food Microbiol.* 247, 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.005>
- Naseem, H., Ahsan, M., Shahid, M.A., Khan, N., 2018. Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance. *J. Basic Microbiol.* 58, 1009–1022. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800309>
- Navarro, E., Jaffré, T., Gauthier, D., Gourbiere, F., Rinaudo, G., Simonet, P., Normand, P., 1999. Distribution of *Gymnostoma* spp. microsymbiotic *Frankia* strains in New Caledonia is related to soil type and to host-plant species. *Mol. Ecol.* 8, 1781–1788. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1999.00742.x>
- Nielsen, L., Li, X., Halverson, L.J., 2011. Cell-cell and cell-surface interactions mediated by cellulose and a novel exopolysaccharide contribute to *Pseudomonas putida* biofilm formation and fitness under water-limiting conditions. *Environ. Microbiol.* 13, 1342–1356. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02432.x>
- Nies, D.H., 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 313–339. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00048-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00048-2)
- Nies, D.H., 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 730–750. <https://doi.org/10.1007/s002530051457>
- Nies, D.H., 1992. Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes. *Plasmid* 27, 17–28. [https://doi.org/10.1016/0147-619X\(92\)90003-S](https://doi.org/10.1016/0147-619X(92)90003-S)
- Nkrumah, P.N., Baker, A.J.M., Chaney, R.L., Erskine, P.D., Echevarria, G., Morel, J.L., van der Ent, A., 2016. Current status and challenges in developing nickel phytomining: an agronomic perspective. *Plant Soil* 406, 55–69. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2859-4>
- Nocelli, N., Bogino, P., Banchio, E., Giordano, W., 2016. Roles of Extracellular Polysaccharides and Biofilm Formation in Heavy Metal Resistance of *Rhizobia*. *Materials (Basel)*. 9, 418. <https://doi.org/10.3390/ma9060418>
- O'Dell, R., Rajakaruna, N., 2011. Intraspecific Variation, Adaptation, and Evolution, Serpentine: Evolution and Ecology in a Model System. <https://doi.org/10.1525/california/9780520268357.003.0005>
- O'Dell, R.E., Claassen, V.P., 2009. Serpentine Revegetation: A Review. *Northeast. Nat.* 16, 253–271. <https://doi.org/10.1656/045.016.0519>
- Pal, A., Choudhuri, P., Dutta, S., Mukherjee, P.K., Paul, a. K., 2004. Isolation and characterization of nickel-resistant microflora from serpentine soils of Andaman. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 881–886. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-2776-1>
- Pal, A., Paul, A.K., 2004. Aerobic chromate reduction by chromium-resistant bacteria isolated from serpentine soil. *Microbiol. Res.* 159, 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.08.001>

## REFERENCES

- Pal, A., Wauters, G., Paul, a. K., 2007. Nickel tolerance and accumulation by bacteria from rhizosphere of nickel hyperaccumulators in serpentine soil ecosystem of Andaman, India. *Plant Soil* 293, 37–48. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9195-7>
- Panaccione, D.G., Sheets, N.L., Miller, S.P., Cumming, J.R., 2001. Diversity of *Cenococcum geophilum* Isolates from Serpentine and Non-Serpentine Soils. *Mycologia* 93, 645. <https://doi.org/10.2307/3761819>
- Park, Y., Suzuki, K., Yim, D., Lee, K., Kim, E., Yoon, J., Kim, S., Kho, Y., Goodfellow, M., Komagata, K., 1993. Suprageneric classification of peptidoglycan group B actinomycetes by nucleotide sequencing of 5S ribosomal RNA. *Antonie van Leeuwenhoek V. Leeuwenhoek* 64, 307–313. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8085792>
- Parra-Cota, F.I., Peña-Cabriales, J.J., de los Santos-Villalobos, S., Martínez-Gallardo, N.A., Délano-Frier, J.P., 2014. *Burkholderia ambifaria* and *B. caribensis* Promote Growth and Increase Yield in Grain Amaranth (*Amaranthus cruentus* and *A. hypochondriacus*) by Improving Plant Nitrogen Uptake. *PLoS One* 9, e88094. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088094>
- Partida-Martínez, L.P., Heil, M., 2011. The Microbe-Free Plant: Fact or Artifact? *Front. Plant Sci.* 2, 100. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00100>
- Pasquet, C., Monna, F., van Oort, F., Gunkel-Grillon, P., Laporte-Magoni, C., Losno, R., Chateau, C., 2018. Mobility of Ni, Co, and Mn in ultramafic mining soils of New Caledonia, assessed by kinetic EDTA extractions. *Environ. Monit. Assess.* 190, 638. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-7029-0>
- Paungfoo-Lonhienne, C., Lonhienne, T.G.A., Yeoh, Y.K., Webb, R.I., Lakshmanan, P., Chan, C.X., Lim, P.-E., Ragan, M.A., Schmidt, S., Hugenholtz, P., 2014. A new species of *Burkholderia* isolated from sugarcane roots promotes plant growth. *Microb. Biotechnol.* 7, 142–154. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12105>
- Pelletier, B., 2006. Geology of the New Caledonia region and its implications for the study of the New Caledonian biodiversity, In : PAYRI CLAUDE (ED.), RICHER DE FORGES BERTRAND (ED.), COLIN FABRICE (PRÉF.). *Compendium of marine species from New Caledonia*. Nouméa : IRD, (2.7), 17-30. (Documents Scientifiques et Techniques; 2.7). ISSN 1297-9635. <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010038861>
- Pereira, S.I. a, Castro, P.M.L., 2014. Diversity and characterization of culturable bacterial endophytes from *Zea mays* and their potential as plant growth-promoting agents in metal-degraded soils. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 14110–14123. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3309-6>
- Pérez-Montaña, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R.A., del Cerro, P., Espuny, M.R., Jiménez-Guerrero, I., López-Baena, F.J., Ollero, F.J., Cubo, T., 2014. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiol. Res.* 169, 325–336. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.011>
- Perin, L., 2006. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1931–1937. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64362-0>
- Perkins, L.B., Hatfield, G., 2016. Can commercial soil microbial treatments remediate plant-soil feedbacks to improve restoration seedling performance? *Restor. Ecol.* 24, 194–201. <https://doi.org/10.1111/rec.12302>



## REFERENCES

- Perrier, N., Amir, H., Colin, F., 2006. Occurrence of mycorrhizal symbioses in the metal-rich lateritic soils of the Koniambo Massif, New Caledonia. *Mycorrhiza* 16, 449–458. <https://doi.org/10.1007/s00572-006-0057-6>
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M., 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* 5, 308–316. <https://doi.org/10.1038/nchembio.164>
- Pillon, Y., Lucas, E., Johansen, J.B., Sakishima, T., Hall, B., Geib, S.M., Stacy, E.A., 2015. An Expanded *Metrosideros* (Myrtaceae) to Include *Carpolepis* and *Tepualia* Based on Nuclear Genes. *Syst. Bot.* 40, 782–790. <https://doi.org/10.1600/036364415X689249>
- Pinedo, I., Ledger, T., Greve, M., Poupin, M.J., 2015. *Burkholderia phytofirmans* PsJN induces long-term metabolic and transcriptional changes involved in *Arabidopsis thaliana* salt tolerance. *Front. Plant Sci.* 6, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00466>
- Pitoiset, A., 2015. Le Nickel Une Passion Calédonienne, Le rayon v. ed. Nouméa, Nouvelle-Calédonie. <http://www.sudoc.fr/191749788>
- Playsted, C.W.S., Johnston, M.E., Ramage, C.M., Edwards, D.G., Cawthray, G.R., Lambers, H., 2006. Functional significance of dauciform roots: exudation of carboxylates and acid phosphatase under phosphorus deficiency in *Caustis blakei* (Cyperaceae). *New Phytol.* 170, 491–500. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01697.x>
- Pol-fachin, L., Serrato, R. V., Verli, H., 2010. Solution conformation and dynamics of exopolysaccharides from *Burkholderia* species. *Carbohydr. Res.* 345, 1922–1931. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.06.010>
- Proctor, J., 2003. Vegetation and soil and plant chemistry on ultramafic rocks in the tropical Far East. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 6, 105–124. <https://doi.org/10.1078/1433-8319-00045>
- Puente, M.E., Li, C.Y., Bashan, Y., 2009. Endophytic bacteria in cacti seeds can improve the development of cactus seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 66, 402–408. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.04.007>
- Ragsdale, S.W., 1998. Nickel biochemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 208–215. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(98\)80062-8](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(98)80062-8)
- Rajkumar, M., Ae, N., Freitas, H., 2009a. Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. *Chemosphere* 77, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.06.047>
- Rajkumar, M., Freitas, H., 2008a. Effects of inoculation of plant-growth promoting bacteria on Ni uptake by Indian mustard. *Bioresour. Technol.* 99, 3491–8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.046>
- Rajkumar, M., Freitas, H., 2008b. Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere* 71, 834–42. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.11.038>
- Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M.N. V, Freitas, H., 2012. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* 30, 1562–74. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.04.011>

## REFERENCES

- Rajkumar, M., Vara Prasad, M.N., Freitas, H., Ae, N., 2009b. Biotechnological applications of serpentine soil bacteria for phytoremediation of trace metals. *Crit. Rev. Biotechnol.* 29, 120–130. <https://doi.org/10.1080/07388550902913772>
- Ramey, B.E., Koutsoudis, M., Bodman, S.B. Von, Fuqua, C., 2004. Biofilm formation in plant–microbe associations. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 602–609. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.10.014>
- Raupach, G.S., Kloepper, J.W., 2000. Biocontrol of Cucumber Diseases in the Field by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria With and Without Methyl Bromide Fumigation. *Plant Dis.* 84, 1073–1075. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.10.1073>
- Raweekul, W., Wuttitummaporn, S., 2016. Plant Growth Promotion by Endophytic Bacteria Isolated from Rice (*Oryza sativa*). *Thammasat Int. J. Sci. Technol.* 21, 7–17. <https://doi.org/0.14456/tijsat.2016.2>
- Reeves, R.D., Baker, A.J.M., Borhidi, A., Berazaín, R., 1996. Nickel-accumulating plants from the ancient serpentine soils of Cuba. *New Phytol.* 133, 217–224. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1996.tb01888.x>
- Reis, V.M., 2004. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 2155–2162. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02879-0>
- Revillini, D., Gehring, C.A., Johnson, N.C., 2016. The role of locally adapted mycorrhizas and rhizobacteria in plant-soil feedback systems. *Funct. Ecol.* 30, 1086–1098. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12668>
- Richardson, A.E., Barea, J.-M., McNeill, A.M., Prigent-Combaret, C., 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321, 305–339. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9895-2>
- Riefler, M., 2006. Arabidopsis Cytokinin Receptor Mutants Reveal Functions in Shoot Growth, Leaf Senescence, Seed Size, Germination, Root Development, and Cytokinin Metabolism. *Plant Cell Online* 18, 40–54. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.037796>
- Riley, P.A., 1997. Melanin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 1235–1239. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(97\)00013-7](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(97)00013-7)
- Rodriguez-Diaz, M., Rodelas-Gonzales, B., Pozo-Clemente, C., Martinez-Toledo, M.V., Gonzalez-Lopez, J., 2008. A Review on the Taxonomy and Possible Screening Traits of Plant Growth Promoting Rhizobacteria, in: *Plant-Bacteria Interactions*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp. 55–80. <https://doi.org/10.1002/9783527621989.ch4>
- Roesti, D., Ineichen, K., Braissant, O., Wiemken, A., Aragno, M., Redecker, D., 2005. Bacteria Associated with Spores of the Arbuscular Mycorrhizal Fungi *Glomus geosporum* and *Glomus constrictum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6673–6679. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6673>
- Román-Ponce, B., Reza-Vázquez, D.M., Gutiérrez-Paredes, S., De Haro-Cruz, M. de J., Maldonado-Hernández, J., Bahena-Osorio, Y., Estrada-de los santos, P., Wang, E.T., Vázquez-Murrieta, M.S., 2017. Plant Growth-Promoting Traits in Rhizobacteria of Heavy Metal-Resistant Plants and Their Effects on *Brassica nigra* Seed Germination. *Pedosphere* 27, 511–526. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60347-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60347-3)

## REFERENCES

- Rubin, R.L., van Groenigen, K.J., Hungate, B.A., 2017. Plant growth promoting rhizobacteria are more effective under drought: a meta-analysis. *Plant Soil* 416, 309–323. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3199-8>
- Russo, A., Carrozza, G. Pietro, Vettori, L., Felici, C., Cinelli, F., Toffanin, A., 2012. Innovations in Biotechnology, *Innovations in Biotechnology*. InTech. <https://doi.org/10.5772/2450>
- Saddler, G.S., Guimarães, P.M., 2015. *Curtobacterium*, in: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 1–14. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00096>
- Saharan, B.S., Nehra, V., 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria : A Critical Review. *Life Sci. Med. Res.* 2011, 1–30. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012070623>
- Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S., Bhatti, A.S., 2007. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 635–648. <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0240-6>
- Salles, J.F., Veen, J.A. Van, Elsas, D. Van, Falca, J., Elsas, J.D. Van, 2004. Multivariate Analyses of *Burkholderia* Species in Soil : Effect of Crop and Land Use History. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4012–4020. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4012>
- Sarrailh, J., Ayrault, N., 2000. Revégétalisation des sites des anciennes mines de nickel en Nouvelle-Calédonie. *Unasylva* 52, 16–20. <http://www.fao.org/docrep/004/y2795f/y2795f05.htm>
- Sawana, A., Adeolu, M., Gupta, R.S., 2014. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. *Front. Genet.* 5, 1–22. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00429>
- Sayed, R.Z., Jamadar, D.D., Patel, P.R., 2011. Production of Exo-polysaccharide by *Rhizobium sp.* *Indian J. Microbiol.* 51, 294–300. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0115-4>
- Schechter, S.P., Bruns, T.D., 2008. Serpentine and non-serpentine ecotypes of *Collinsia sparsiflora* associate with distinct arbuscular mycorrhizal fungal assemblages. *Mol. Ecol.* 17, 3198–3210. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03828.x>
- Schlegel, H.G., Cosson, J.-P., Baker, A.J.M., 1991. Nickel-hyperaccumulating Plants Provide a Niche for Nickel-resistant Bacteria. *Bot. Acta* 104, 18–25. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1991.tb00189.x>
- Selvakumar, G., Krishnamoorthy, R., Kim, K., Sa, T.-M., 2016. Genetic Diversity and Association Characters of Bacteria Isolated from Arbuscular Mycorrhizal Fungal Spore Walls. *PLoS One* 11, e0160356. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160356>
- Serrato, R. V, Sasaki, G.L., Cruz, L.M., Pedrosa, F.O., Gorin, P.A., Iacomini, M., 2006. Culture conditions for the production of an acidic exopolysaccharide by the nitrogen-fixing bacterium *Burkholderia tropica*. *Can. J. Microbiol.* 52, 489–493. <https://doi.org/10.1139/w05-155>



## REFERENCES

- Sessitsch, A., 2005. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1187–1192. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63149-0>
- Sessitsch, A., Kuffner, M., Kidd, P., Vangronsveld, J., Wenzel, W.W., Fallmann, K., Puschenreiter, M., 2013. The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biol. Biochem.* 60, 182–194. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.01.012>
- Shane, M.W., Cawthray, G.R., Cramer, M.D., Kuo, J., Lambers, H., 2006. Specialized “dauciform” roots of Cyperaceae are structurally distinct, but functionally analogous with “cluster” roots. *Plant, Cell Environ.* 29, 1989–1999. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01574.x>
- Shane, M.W., Dixon, K.W., Lambers, H., 2005. The occurrence of dauciform roots amongst Western Australian reeds, rushes and sedges, and the impact of phosphorus supply on dauciform-root development in *Schoenus unispiculatus* (Cyperaceae). *New Phytol.* 165, 887–898. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01283.x>
- Silipo, A., Ierano, T., Lanzetta, R., Molinaro, A., Parrilli, M., 2008. The Structure of the O-Chain Polysaccharide from the Gram-Negative Endophytic Bacterium *Burkholderia phytofirmans* Strain PsJN. *European J. Org. Chem.* 2008, 2303–2308. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200800135>
- Singh, R.K., Malik, N., Singh, S., 2013. Improved Nutrient Use Efficiency Increases Plant Growth of Rice with the Use of IAA-Overproducing Strains of Endophytic *Burkholderia cepacia* Strain RRE25. *Microb. Ecol.* 66, 375–384. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0231-2>
- Smith, S.E., Read, D., 2008. *Mycorrhizal Symbiosis* (Third Edition), Academic Press, London, 800p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370526-6.X5001-6>
- Smith, S.E., Smith, F.A., 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 227–250. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103846>
- Solano, B.R., Maicas, J.B., Mañero, F.J.G., 2008. Physiological and Molecular Mechanisms of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). Ahmad I. Pichtel J; Hyat S., eds. *Plant-bacteria Interact. Strateg. Tech. to Promot. plant growth* 41–54. <https://doi.org/10.1002/9783527621989.ch3>
- Spandler, C., Rubatto, D., Hermann, J., 2005. Late Cretaceous-Tertiary tectonics of the southwest Pacific: Insights from U-Pb sensitive, high-resolution ion microprobe (SHRIMP) dating of eclogite facies rocks from New Caledonia. *Tectonics* 24, 1-16. <https://doi.org/10.1029/2004TC001709>
- Stackebrandt, E., Gobel, B.M., 1994. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 44, 846–849. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-846>
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L., 1997. Proposal for a New Hierarchic Classification System, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 479–491. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-479>

## REFERENCES

- Stoppel, R.D., Schlegel, H.G., 1995. Nickel-resistant bacteria from anthropogenically nickel-polluted and naturally nickel-percolated ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2276–2285. <https://aem.asm.org/content/61/6/2276>
- Sturz, A. V., Christie, B.R., Matheson, B.G., Nowak, J., 1997. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biol. Fertil. Soils* 25, 13–19. <https://doi.org/10.1007/s003740050273>
- Sturz, A. V., Matheson, B.G., 1996. Populations of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia*-induced bacterial soft rot in potato tubers. *Plant Soil* 184, 265–271. <https://doi.org/10.1007/BF00010455>
- Su, F., Jacquard, C., Villaume, S., Michel, J., Rabenoelina, F., Clément, C., Barka, E.A., Dhondt-Cordelier, S., Vaillant-Gaveau, N., 2015. *Burkholderia phytofirmans* PsJN reduces impact of freezing temperatures on photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 6, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00810>
- Suárez-Moreno, Z.R., Caballero-Mellado, J., Coutinho, B.G., Mendonça-Previato, L., James, E.K., Venturi, V., 2012. Common Features of Environmental and Potentially Beneficial Plant-Associated *Burkholderia*. *Microb. Ecol.* 63, 249–266. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9929-1>
- Suresh Kumar, A., Mody, K., Jha, B., 2007. Bacterial exopolysaccharides – a perception. *J. Basic Microbiol.* 47, 103–117. <https://doi.org/10.1002/jobm.200610203>
- Suwantarat, N., Weik, C., Romagnoli, M., Ellis, B.C., Kwiatkowski, N., Carroll, K.C., 2016. Practical Utility and Accuracy of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of *Corynebacterium* Species and Other Medically Relevant Coryneform-Like Bacteria. *Am. J. Clin. Pathol.* 145, 22–28. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqv006>
- Tak, H.I., Ahmad, F., Babalola, O.O., 2013. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 223, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Springer New York, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5577-6>
- Takeuchi, M., Hatano, K., 1998. Union of the genera *Microbacterium* Orla-Jensen and *Aureobacterium* Collins et al. in a redefined genus *Microbacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 739–747. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-3-739>
- Taktek, S., Trépanier, M., Servin, P.M., St-Arnaud, M., Piché, Y., Fortin, J.-A., Antoun, H., 2015. Trapping of phosphate solubilizing bacteria on hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198. *Soil Biol. Biochem.* 90, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.07.016>
- Talbi, C., Delgado, M.J., Girard, L., Ramirez-Trujillo, A., Caballero-Mellado, J., Bedmar, E.J., 2010. *Burkholderia phymatum* Strains Capable of Nodulating *Phaseolus vulgaris* Are Present in Moroccan Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4587–4591. <https://doi.org/10.1128/AEM.02886-09>
- Tarkka, M.T., Frey-Klett, P., 2008. Mycorrhiza Helper Bacteria, in: *Mycorrhiza*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 113–132. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-78826-3\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-540-78826-3_6)
- Tian, Y., Kong, B.H., Liu, S.L., Li, C.L., Yu, R., Liu, L., Li, Y.H., 2013. *Burkholderia grimmiae* sp. nov., isolated from a xerophilous moss (*Grimmia montana*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 2108–2113. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.045492-0>

## REFERENCES

- Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A., Aronsson, A.-C., 2017. Perspectives and Challenges of Microbial Application for Crop Improvement. *Front. Plant Sci.* 8, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00049>
- Tscharntke, T., Clough, Y., Wanger, T.C., Jackson, L., Motzke, I., Perfecto, I., Vandermeer, J., Whitbread, A., 2012. Global food security, biodiversity conservation and the future of agricultural intensification. *Biol. Conserv.* 151, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.01.068>
- Turnau, K., Mesjasz-Przybylowicz, J., 2003. Arbuscular mycorrhiza of *Berkheya coddii* and other Ni-hyperaccumulating members of Asteraceae from ultramafic soils in South Africa. *Mycorrhiza* 13, 185–90. <https://doi.org/10.1007/s00572-002-0213-6>
- Turrini, A., Avio, L., Giovannetti, M., Agnolucci, M., 2018. Functional Complementarity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Associated Microbiota: The Challenge of Translational Research. *Front. Plant Sci.* 9, 10–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01407>
- Upadhyay, S.K., Singh, J.S., Singh, D.P., 2011. Exopolysaccharide-Producing Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Under Salinity Condition. *Pedosphere. An Int. J.* 21, 214–222. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(11\)60120-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(11)60120-3)
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.-L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F., Prigent-Combaret, C., 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front. Plant Sci.* 4, 356. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>
- Valverde, A., 2006. *Burkholderia ferrariae* sp. nov., isolated from an iron ore in Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2421–2425. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64498-0>
- Van der Ent, A., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Pollard, A.J., Schat, H., 2013b. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. *Plant Soil* 362, 319–334. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1287-3>
- Van der Ent, A., Baker, A.J.M., van Balgooy, M.M.J., Tjoa, A., 2013a. Ultramafic nickel laterites in Indonesia (Sulawesi, Halmahera): Mining, nickel hyperaccumulators and opportunities for phytomining. *J. Geochemical Explor.* 128, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2013.01.009>
- Vandamme, P., Goris, J., Chen, W.-M., de Vos, P., Willems, A., 2002. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., Nodulate the Roots of Tropical Legumes. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 507–512. <https://doi.org/10.1078/07232020260517634>
- Vandamme, P., Opelt, K., Knochel, N., Berg, C., Schonmann, S., De Brandt, E., Eberl, L., Falsen, E., Berg, G., 2007. *Burkholderia bryophila* sp. nov. and *Burkholderia megapolitana* sp. nov., moss-associated species with antifungal and plant-growth-promoting properties. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2228–2235. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65142-0>
- Vandamme, P., Peeters, C., 2014. Time to revisit polyphasic taxonomy. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106, 57–65. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0148-x>

## REFERENCES

- Vandamme, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Mels, L., Hoste, B., Dewettinck, D., Vlaes, L., Van Den Borre, C., Higgins, R., Hommez, J., Kersters, K., Butzler, J.-P., Goossens, H., 1992. Polyphasic Taxonomic Study of the Emended Genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an Aerotolerant Bacterium Isolated from Veterinary Specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 344–356. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-3-344>
- Vanhaverbeke, C., Heyraud, A., Mazeau, K., 2003. Conformational analysis of the exopolysaccharide from *Burkholderia caribensis* strain MWAP71: Impact on the interaction with soils. *Biopolymers* 69, 480–497. <https://doi.org/10.1002/bip.10432>
- Vanlaere, E., van der Meer, J.R., Falsen, E., Salles, J.F., de Brandt, E., Vandamme, P., 2008. *Burkholderia sartisoli* sp. nov., isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 420–423. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65451-0>
- Vega, L.M., Mathieu, J., Yang, Y., Pyle, B.H., McLean, R.J.C., Alvarez, P.J.J., 2014. Nickel and cadmium ions inhibit quorum sensing and biofilm formation without affecting viability in *Burkholderia multivorans*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 91, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.03.013>
- Velásquez, L., Dussan, J., 2009. Biosorption and bioaccumulation of heavy metals on dead and living biomass of *Bacillus sphaericus*. *J. Hazard. Mater.* 167, 713–716. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.01.044>
- Vessey, J., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255, 571–586. <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>
- Viallard, V., Poirier, I., Cournoyer, B., Haurat, J., Wiebkin, S., Ophel-Keller, K., Balandreau, J., 1998. *Burkholderia graminis* sp. nov., a rhizospheric *Burkholderia* species, and reassessment of [*Pseudomonas*] *phenazinium*, [*Pseudomonas*] *pyrrocinia* and [*Pseudomonas*] *glathei* as *Burkholderia*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 549–563. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-2-549>
- Vijayaraghavan, K., Yun, Y.-S., 2008. Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnol. Adv.* 26, 266–291. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.02.002>
- Vithanage, M., Rajapaksha, A.U., Oze, C., Rajakaruna, N., Dissanayake, C.B., 2014. Metal release from serpentine soils in Sri Lanka. *Environ. Monit. Assess.* 186, 3415–3429. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-3626-8>
- Vivas, A., Biró, B., Ruíz-Lozano, J.M., Barea, J.M., Azcón, R., 2006. Two bacterial strains isolated from a Zn-polluted soil enhance plant growth and mycorrhizal efficiency under Zn-toxicity. *Chemosphere* 62, 1523–1533. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.06.053>
- Vurukonda, S.S.K.P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., SkZ, A., 2016. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiol. Res.* 184, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003>
- Wang, F., 2017. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in mining-impacted sites and their contribution to ecological restoration: Mechanisms and applications. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 47, 1901–1957. <https://doi.org/10.1080/10643389.2017.1400853>

## REFERENCES

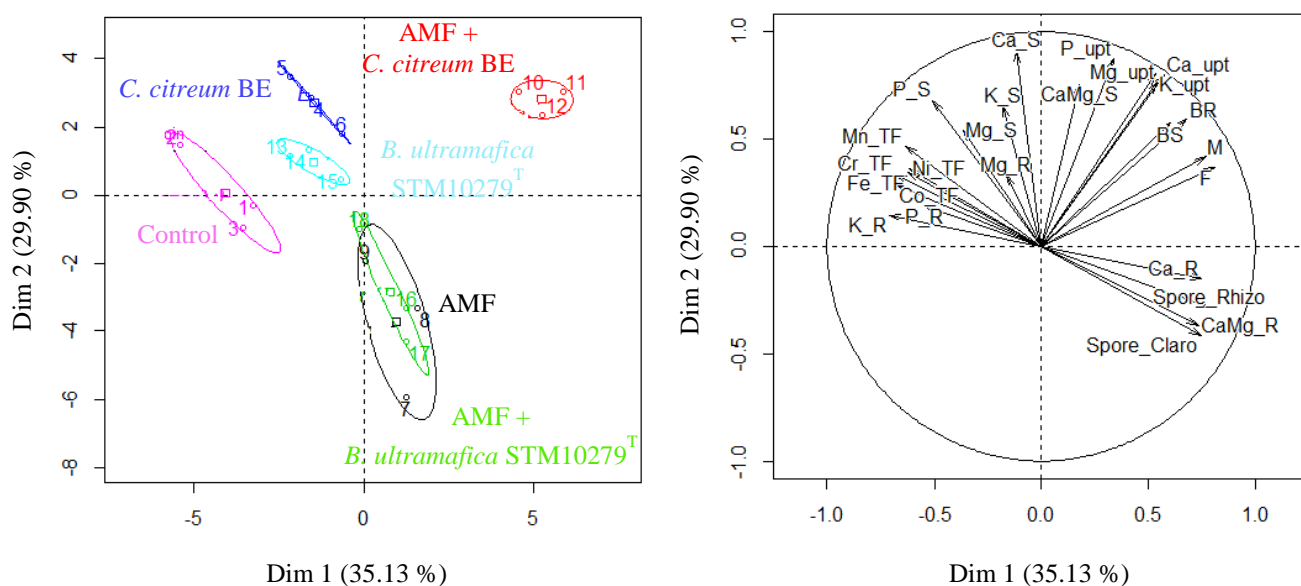
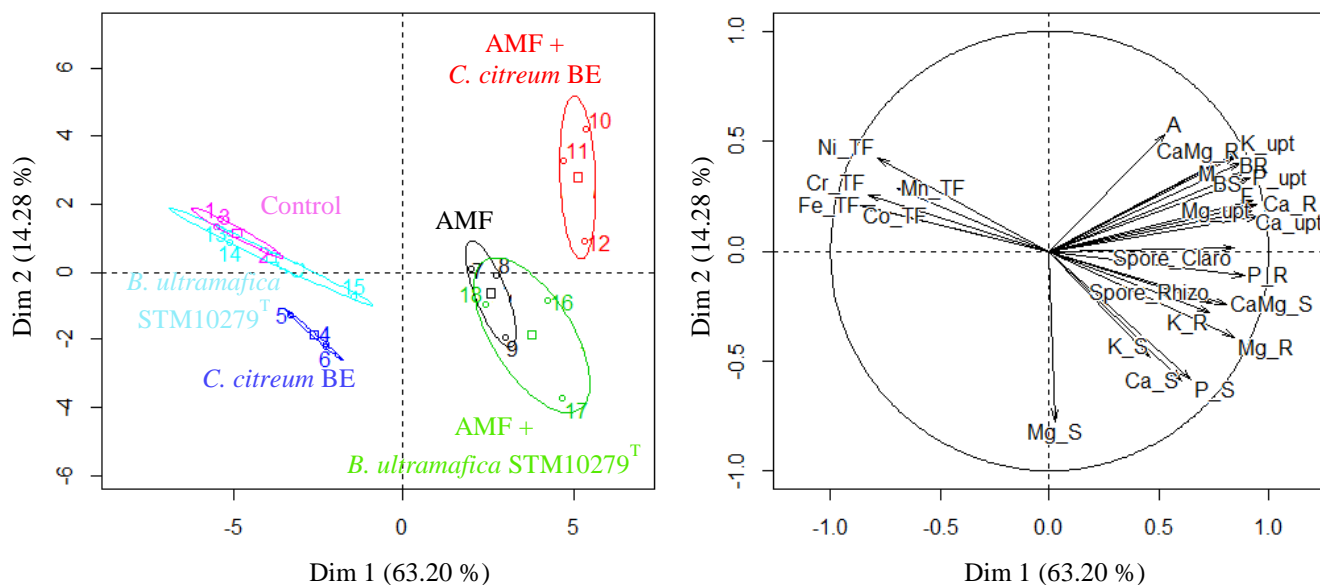
- Wenzel, W., Jockwer, F., 1999. Accumulation of heavy metals in plants grown on mineralised soils of the Austrian Alps. *Environ. Pollut.* 104, 145–155. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(98\)00139-0](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(98)00139-0)
- Whiting, S.N., Reeves, R.D., Richards, D., Johnson, M.S., Cooke, J.A., Malaisse, F., Paton, A., Smith, J.A.C., Angle, J.S., Chaney, R.L., Ginocchio, R., Jaffré, T., Johns, R., McIntyre, T., Purvis, O.W., Salt, D.E., Schat, H., Zhao, F.J., Baker, A.J.M., 2004. Research Priorities for Conservation of Metallophyte Biodiversity and their Potential for Restoration and Site Remediation. *Restor. Ecol.* 12, 106–116. <https://doi.org/10.1111/j.1061-2971.2004.00367.x>
- Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221–71. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC373105>
- Wong-Villarreal, A., Caballero-Mellado, J., 2010. Rapid identification of nitrogen-fixing and legume-nodulating *Burkholderia* species based on PCR 16S rRNA species-specific oligonucleotides. *Syst. Appl. Microbiol.* 33, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.10.004>
- Woodell, S.R.J., 1988. Serpentine and its vegetation: A multidisciplinary approach. *Trends Ecol. Evol.* 3, 26–27. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(88\)90081-X](https://doi.org/10.1016/0169-5347(88)90081-X)
- Wu, S.C.C., Cheung, K.C.C., Luo, Y.M.M., Wong, M.H.H., 2006. Effects of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on metal uptake by *Brassica juncea*. *Environ. Pollut.* 140, 124–135. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.06.023>
- Wulff, A., 2012. Le micro-endémisme dans un hotspot de biodiversité : approche globale sur la flore vasculaire de la Nouvelle- Calédonie et analyse comparative au sein du genre *Scaevola*. Thèse, Université de la Nouvelle-Calédonie. <https://doi.org/10.6098/2012NCAL0039>
- Wulff, A., L’Huillier, L., Vea, C., Jaffré, T., 2010. Espèces indigènes utilisables en revégétalisation, in: L’Huillier, L., Jaffré, T., Wulff, A. (Eds.), *Mines et Environnement En Nouvelle-Calédonie : Les Milieux Sur Substrats Ultramafiques et Leur Restauration*. Noumea, pp. 231–344. <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010057563>
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., Arakawa, M., 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 36, 1251–75. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1283774>
- Yamada, K., Komagata, K., 1972. Taxonomic studies on coryneform bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 18, 417–431. <https://doi.org/10.2323/jgam.18.417>
- Yang, P.X., Ma, L., Chen, M.H., Xi, J.Q., He, F., Duan, C.Q., Mo, M.H., Fang, D.H., Duan, Y.Q., Yang, F.X., 2012. Phosphate Solubilizing Ability and Phylogenetic Diversity of Bacteria from P-Rich Soils Around Dianchi Lake Drainage Area of China. *Pedosphere* 22, 707–716. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(12\)60056-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(12)60056-3)
- Zhang, H., Hanada, S., Shigematsu, T., Shibuya, K., Kamagata, Y., Kanagawa, T., Kurane, R., 2000. *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 743–749. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-2-743>

## REFERENCES

- Zhu, H., Guo, J., Chen, M., Feng, G., Yao, Q., 2012. *Burkholderia dabaoshanensis* sp. nov., a Heavy-Metal-Tolerant Bacteria Isolated from Dabaoshan Mining Area Soil in China. PLoS One 7, e50225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050225>
- Zinniel, D.K., Lambrecht, P., Harris, N.B., Feng, Z., Kuczmariski, D., Higley, P., Ishimaru, C.A., Arunakumari, A., Barletta, R.G., Vidaver, A.K., 2002. Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria from Agronomic Crops and Prairie Plants. Appl. Environ. Microbiol. 68, 2198–2208. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2198-2208.2002>

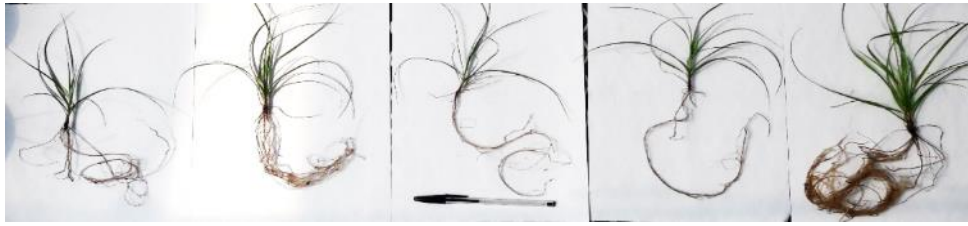


## Annexes

(a) *Tetraria comosa*(b) *Metrosideros laurifolia*

**Annexe 1** Analyse en composantes principales suivi d'une classification hiérarchique pour *T. comosa* et *M. laurifolia*. Les variables utilisées pour *T. comosa* sont les biomasses des parties aériennes (BS) et racinaires (BR), la densité (M) et la fréquence (F) de mycorhization, la sporulation de *Rhizophagus neocaledonicus* (Spore\_Rhizo) et *Claroideoglomus etunicatum* (Spore\_Claro), les concentrations en éléments dans les parties aériennes (ie. Ca<sub>S</sub>) et racinaires (ie. Ca<sub>R</sub>) (Ca, Mg, K, P), les contenus en éléments (ie. Ca<sub>upt</sub>) (Ca, Mg, K, P), le ration Ca/Mg dans les parties aériennes (CaMg<sub>S</sub>) et racinaires (CaMg<sub>R</sub>) et les facteurs de translocation des métaux (ie. Co<sub>TF</sub>) (Co, Cr, Fe, Mn, Ni). Pour *M. laurifolia*, il s'agit des mêmes variables + l'abondance des arbuscules.

ANNEXES



Control



*P. ultramafica* STM10279<sup>T</sup>



*C. citreum* BE



AMF



AMF + *P. ultramafica* STM10279<sup>T</sup>



AMF + *C. citreum* BE

**Annexe 2** Photographies des plants de *Tetraria comosa* après huit mois en serre en fonction des différents traitements.



ANNEXES



Control



*P. ultramafica* STM10279<sup>T</sup>



*C. citreum* BE



AMF



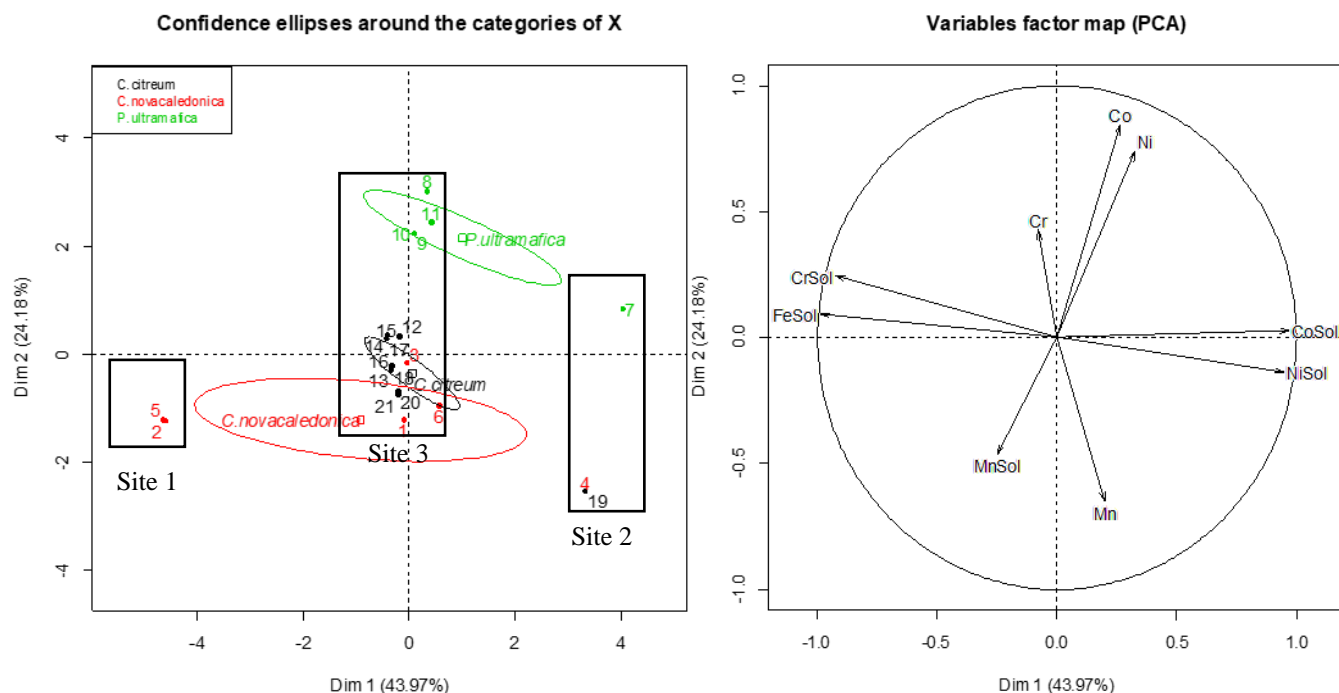
AMF + *P. ultramafica* STM10279<sup>T</sup>



AMF + *C. citreum* BE

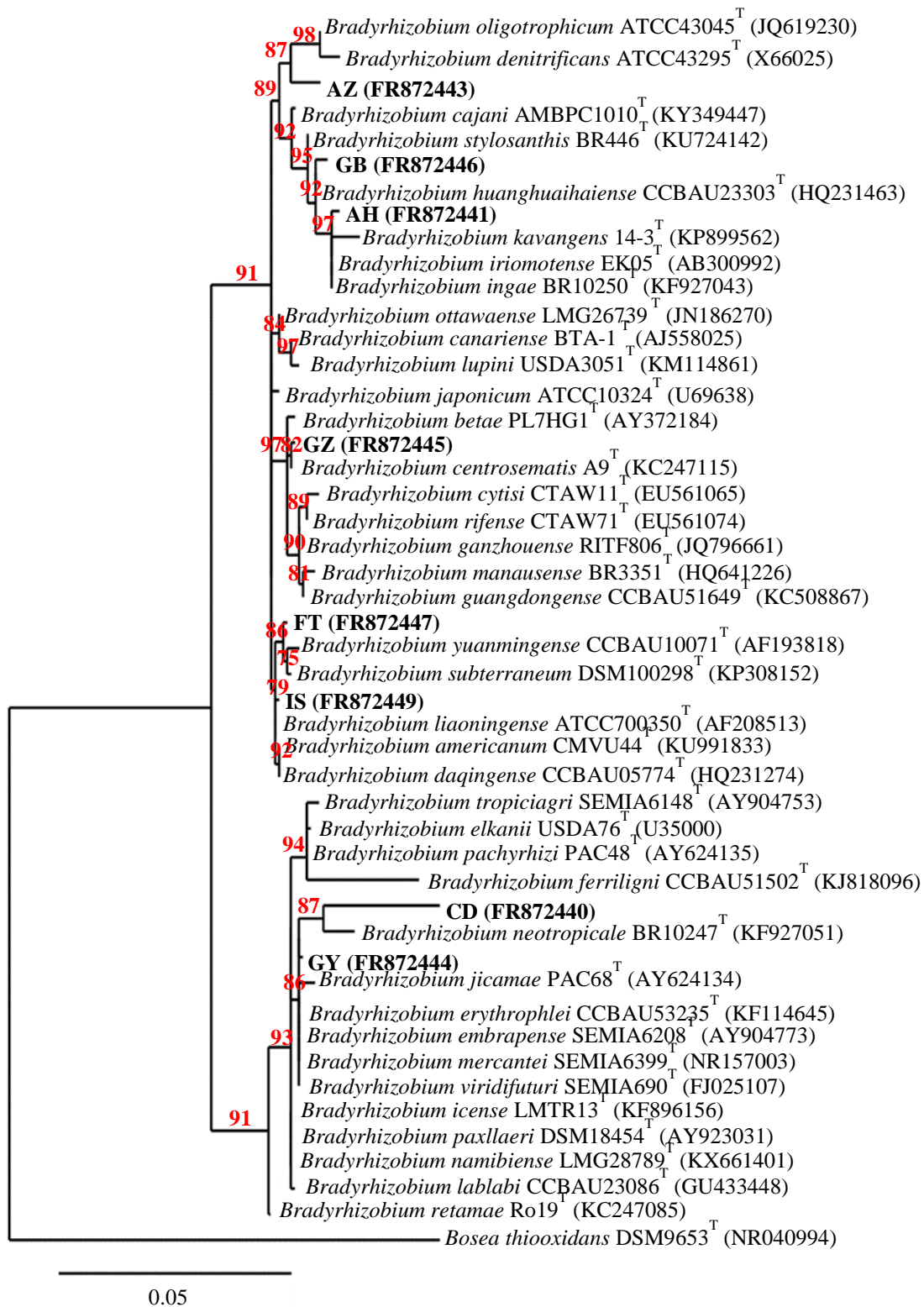
**Annexe 3** Photographies des plants de *Metrosideros laurifolia* après sept mois en serre en fonction des différents traitements.

## ANNEXES



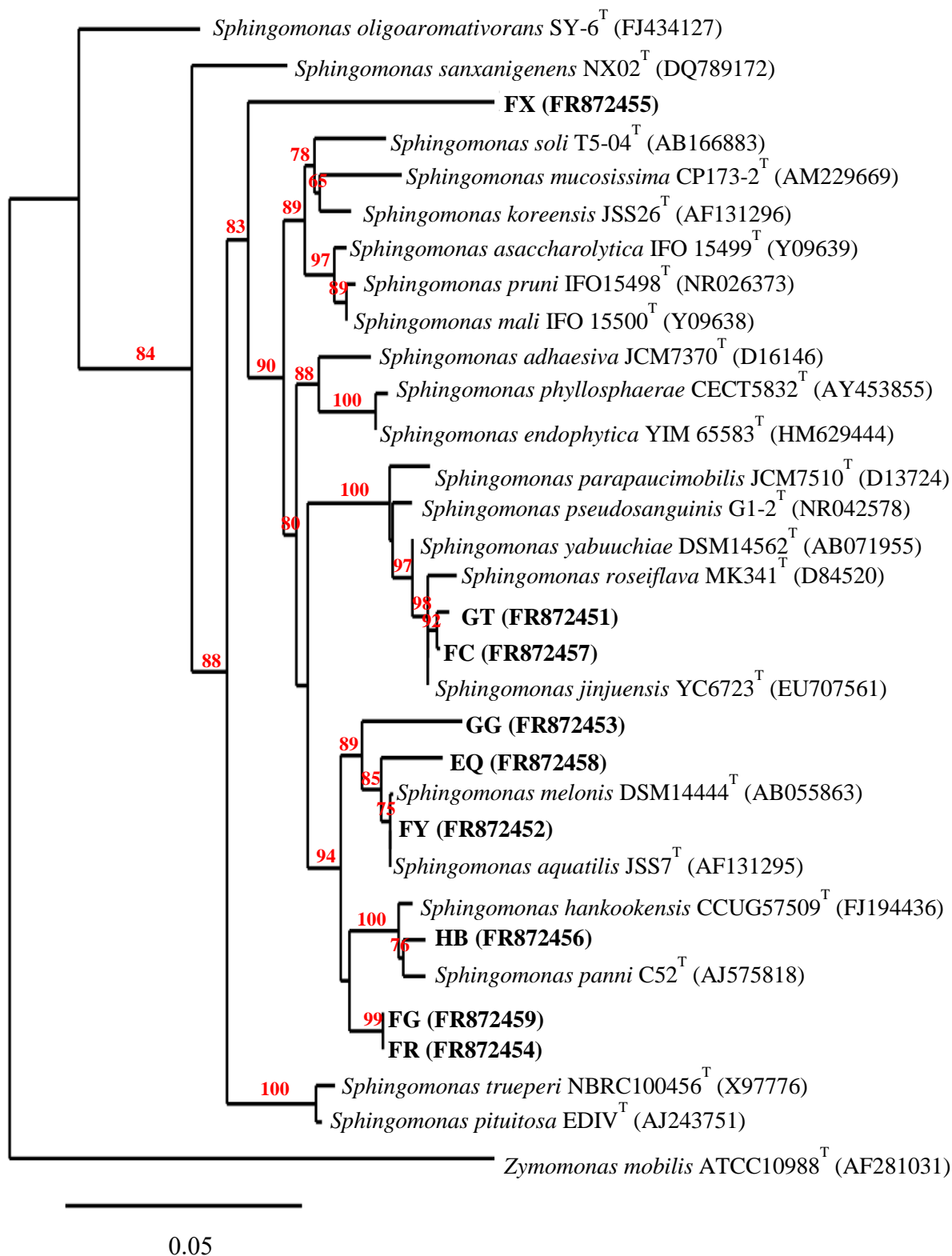
**Annexe 4** Analyse en composantes principales des résultats issus de Gonin et al. (2013). Les variables utilisées sont les concentrations en métaux disponibles sur les sites échantillonnés (i.e. NiSol) (Ni, Co, Cr, Mn, Fe) et les valeurs de tolérance (Ni, Co, Cr Mn). 1. *Caballeronia novacaledonica* STM10272<sup>T</sup>, 2. STM10274, 3. STM10275, 4. STM10276, 5. STM10277, 6. STM10278, 7. *Paraburkholderia ultramafica* STM10279<sup>T</sup>, 8. STM10280, 9. STM102781, 10. STM10282, 11. STM10283, 12. *Curtobacterium citreum* BE, 13. BB, 14. AM, 15. AR, 16. BS, 17. BQ, 18. BR, 19. GU, 20. FN et 21. ES.

ANNEXES



**Annexe 5** Relations phylogénétiques entre les espèces de *Bradyrhizobium*, basées sur l'analyse génomique de l'ARNr 16S. Les valeurs indiquées au niveau des nœuds d'arbres sont des valeurs d'occurrence de 1000 répliques de bootstrap. Les valeurs de bootstrap supérieures à 75% sont affichées. La barre d'échelle indique le nombre de substitutions par site.

ANNEXES



**Annexe 6** Relations phylogénétiques entre les espèces de *Sphingomonas* basées sur l'analyse génomique de l'ARNr 16S. Les valeurs indiquées au niveau des nœuds d'arbres sont des valeurs d'occurrence de 1000 répliques de bootstrap. Les valeurs de bootstrap supérieures à 75% sont affichées. La barre d'échelle indique le nombre de substitutions par site.

# Listes des Figures, Tableaux, Figures et Tableaux supplémentaires

## Introduction générale

**Fig. 1** Illustration de l'interaction tripartite (Bactérie/Plante/Mycorhize). Ce schéma a été repris, traduit et complété à partir de la revue de Revilenni et al. (2016). (a) action de la plante pour la mycorhize, (b) action de la plante pour la bactérie ; (c) action de la mycorhize pour la plante, (d) action de la mycorhize pour la bactérie, (e) action de la bactérie pour la plante et (f) action de la bactérie pour la mycorhize..... 4

## Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

### Figures

**Fig 1.1** Principaux mécanismes de résistance impliqués dans la tolérance des bactéries aux métaux. 1. Bioaccumulation 2. Biosorption par l'intermédiaire de composés de surface 3. Biosorption par l'intermédiaire d'un biofilm 4. Transport à l'extérieur de la cellule 5 Séquestration extracellulaire par l'intermédiaire d'exopolysaccharides 6. Séquestration extracellulaire par l'intermédiaire de mélanine..... 16

**Fig 1.2** Schéma de formation de biofilm (adapté de Angus et Hirsch, 2013)..... 19

**Fig 1.3** Principaux mécanismes mis en place par les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (adapté de Vacheron et al., 2013) ..... 25

**Fig 1.4** Représentation schématique d'une coupe de racine présentant les différentes structures endomycorhiziennes adaptée de Fortin et al. (2008)..... 32

**Fig 1.5** Distribution géographique des isolats de *Curtobacterium*. Les couleurs indiquent les différents écosystèmes. La forme indique la source de donnée d'où provient la séquence (repris de Chase et al., 2016) ..... 41

**Fig 1.6** Carte de la Nouvelle-Calédonie avec en rouge la répartition des substrats ultramafiques ..... 48

**Fig 1.7** Impacts de l'activité minière sur l'environnement, a. Usine de Vale à Goro ; b. Mine orpheline, massif du Koniambo ; c. Ancienne mine sur la Côte Est ; d. Ancienne exploitation minière sur la Côte Ouest (dimenc.nc)..... 50

### Tableaux

**Table 1.1** Phylums auxquels appartiennent les bactéries majoritairement retrouvées sur sols ultramafiques. .... 12

**Table 1.2** Concentrations minimales inhibitrices pour diverses bactéries isolées des sols ultramafiques. .... 14

**Table 1.3** Caractéristiques PGP des *Burkholderia* en association avec les plantes (adapté de Suarez-Moreno et al., 2012 et mis à jour). .... 44

## Chapitre 2 Rôle du biofilm et des exopolysaccharides dans l'adaptation à la toxicité métallique de *Caballeronia novacaledonica* comb. nov. and *Paraburkholderia ultramafica* comb. nov. isolées des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie

### Figures

**Fig 2.1** Intracellular Ni (a) and wall surface Ni (b) of the three bacterial species. Bars represent means, and error bars represent standard errors (three replicates). Value with the same lower case letters are not significantly different at  $P < 0.05$  using Fisher's (LSD) test. .... 72

**Fig 2.2** Formation of biofilm as a function of the exposure time. 24h (a), 48h (b) and 72h (c). Bars represent means, and error bars represent standard errors (six replicates). Biofilm production occurs when the ratio is greater than two (dotted line on the graphic). Value with the same lower case letters are not significantly different at  $P < 0.05$  using Fisher's (LSD) test. .... 74

**Fig 2.3** Biovolume (a), Thickness average (b) and substratum coverage (c) of the three bacterial species. Bars represent means, and error bars represent standard errors (six replicates). Value with the same lower case letters are not significantly different at  $P < 0.05$  using Tukey's (HSD) test or Fisher's (LSD) test when data did not follow the assumptions of a parametric test..... 76

**Fig 2.4** Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectrum of the *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> EPS in the 500-3500  $\text{cm}^{-1}$  range..... 77

**Fig 2.5** The relative variations of metals contents are expressed as % in dry mass of tissues of inoculated plants compared with controls. Bars represent means, and error bars represent standard errors (three replicates). Value with the same lower case letters are not significantly different at  $P < 0.05$ . Same coefficient to lower case letters refers to one metal analysis. Lower case letters and coefficients underlined and in bold indicate significant differences with controls at  $P < 0.05$  using Tukey's (HSD) test or Fisher's (LSD) test when data did not follow the assumptions of a parametric test. .... 80

**Fig 2.6** Rooted phylogenetic tree of *Burkholderia* and most related species. The tree was inferred from concatenated sequences of the genes 16S rRNA, *gyrB* and *recA*. Numbers at node represent bootstraps percentage from 1,000 replicates (shown only when  $> 50\%$ ). Scale bar indicates the number of substitutions per site. .... 87

### Tableaux

**Table 2.1** Metals  $\text{IC}_{50}$  (mM) for *Burkholderia ultramafica* STM10279<sup>T</sup>, *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> and *Paraburkholderia caribensis* MWAP64<sup>T</sup> (Mean  $\pm$  Standard Error,  $n=3$ ). ... 68

**Table 2.2** Intracellular Ni and wall surface Ni ( $\mu\text{M}$ ) for *Burkholderia ultramafica* STM10279<sup>T</sup> and *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> and *Paraburkholderia caribensis* MWAP64<sup>T</sup> (mean  $\pm$  SE  $n = 3$ ). .... 70

**Table 2.3** Gross Characteristics of the crude EPS produced by *Burkholderia ultramafica* STM10279<sup>T</sup>. .... 78

**Table 2.4** Shoot and root biomass of *Tetradia comosa* as function of the different treatment (mean  $\pm$  SE  $n = 15$ ). .... 79

### Figures Supplémentaires

**FigS2.1** Rooted phylogenetic tree of *Burkholderia* (*sensu lato*) and related species. The tree was inferred from sequences of the gene 16S rRNA. Numbers at node represent bootstrap percentages from 1000 replicates (shown only when  $> 50\%$ ). Scale bar indicates numbers of substitutions per site. .... 98

**FigS2.2** Rooted phylogenetic tree of *Burkholderia* (*sensu lato*) and related species. The tree was inferred from sequences of the gene *gyrB*. Numbers at node represent bootstrap percentages from 1000 replicates (shown only when  $> 50\%$ ). Scale bar indicates numbers of substitutions per site ..... 99

**FigS2.3** Rooted phylogenetic tree of *Burkholderia (sensu lato)* and related species. The tree was inferred from sequences of the gene *recA*. Numbers at node represent bootstrap percentages from 1000 replicates (shown only when > 50%). Scale bar indicates numbers of substitutions per site ..... 100

### Tableaux Supplémentaires

**Table S2.1** Major characteristics of *Burkholderia ultramafica* STM10279<sup>T</sup> and *Burkholderia novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> ..... 101

**Table S2.2** Biochemical properties associated with tolerance to metals and Ca/Mg ratio of *Burkholderia novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> and *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> isolated from (Gonin et al., 2013). ..... 102

**Table S2.3** Accession numbers of the references 16SrRNA, *gyrB* and *recA* DNA sequences of *Burkholderia (sensu lato)* references strains used for inferring phylogenetic trees. .... 103

**Table S2.4** Ni content measured in *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup>, *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> and *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup> (mean ± SE, n = 3). ..... 105

**Table S2.5** Ratio of the biomass of biofilm formed by *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup>, *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup> and *P. caribensis* MWAP64<sup>T</sup> in response to nickel stress MWAP64<sup>T</sup> in response to nickel stress and as a function of the exposure time 24h, 48h and 72h. (mean ± SE, n = 6). ..... 106

**Table S2.6** Characteristics of the biofilms produced by *B. novacaledonica* STM10272<sup>T</sup>, *B. ultramafica* STM10279<sup>T</sup> and *B. caribensis* MWAP64<sup>T</sup> with and without NiSO<sub>4</sub> (mean ± SE, n = 6). ..... 107

**Table S2.7** Essential nutrients content in the shoots and roots of *Tetraria comosa* (mean ± SE n = 3). ..... 108

**Table S2.8** Metals concentration in the shoots and roots of *Tetraria comosa* (mean ± SE n = 3). ..... 109

## Chapitre 3 Existence d'un écotype au sein de *Curtobacterium citreum* relié aux sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie

### Figures

**Fig 3.1** General geographical map describing the New Caledonian archipelago with location of ultramafic massifs (in grey) and site sampled positions (stars with sites numbers). Pictures illustrating (A) *Tetraria arundinacea*; (B) *Chamaedendron nervosa* and (C) *Tetraria pubescens* in the ultramafic ecosystem (pictures from Jean-Louis Ruiz and Bernard Suprin, endemia.nc, Noumea, New Caledonia). ..... 118

**Fig 3.2** Phylogenetic relationships among *Curtobacterium* species based on the analysis of the 16S rRNA genomic sequences. Phylogenetic tree shown is a 50 % majority rule consensus of the most parsimonious trees obtained with Phylogeny.fr (see 'Materials and methods' section). Values indicated at tree nodes are percentage values of 1000 bootstrap replicates under MP criterion using fast stepwise addition. Significant bootstrap frequencies higher than 75 % are indicated. Tree is rooted with reference of the 16S rRNA genomic sequences belonging to a closely related bacterial genus, i.e. *Clavibacter michiganensis*. The scale bar indicates the number of substitutions per site. .... 129

**Fig 3.3** Effect of bacterial inoculation on Co, Cr, Mn and Ni concentration in Sorghum. Relative variations of element concentration are expressed as % of element concentration in dry mass of

tissues of inoculated plants compared with controls. Bars represent means, and error bars represent standard errors (n=3). Different letters above bars indicate significant differences between treatments and letters and coefficients underlined in bold indicate significant differences with controls as determined by Tukey's (HSD) test or Fisher's (LSD) test ( $P < 0.05$ ). Same coefficient to letters refers to one metal analysis. .... 131

**Fig 3.4** Ni intracellular content and wall surface content of *Curtobacterium citreum* BE and *C. citreum* DSM 20528<sup>T</sup> after growth in medium with different concentration of Ni. Bars represent means, and error bars represent errors (n=3). Different letters above bars indicate significant differences between treatments s determined by Fisher's (LSD) test ( $P < 0.05$ ). ..... 134

**Fig 3.5** Biofilm formation of *Curtobacterium citreum* DSM20528<sup>T</sup> in black and *C. citreum* BE in grey at 72 h in relation to Ni concentration. Adherent bacteria are stained with a 0.02 % crystal violet solution. The results are expressed as the ratio of the absorbance of the assay to the absorbance of the blank (without bacteria). Biofilm production occurs when the ratio is greater than two (dotted line on the graphic). Bars represent means, and error bars represent standard errors (n=6). Different letters above bars indicate significant differences between treatments s determined by Fisher's (LSD) test ( $P < 0.05$ ). ..... 136

**Fig 3.6** Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectrum of the *Curtobacterium citreum* BE EPS in the 650-3500 cm<sup>-1</sup> range showing common absorbance bands, which are characteristic for polysaccharides. .... 138

**Fig 3.7** Production of exopolysaccharide by *Curtobacterium citreum* BE in relation to Ni concentration. Bars represent means, and error bars represent standard errors (n=3). Different letters above bars indicate significant differences between treatments s determined by Fisher's (LSD) test ( $P < 0.05$ ). ..... 139

**Fig 3.8** Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectrum of the *Curtobacterium citreum* BE EPS in the 650-3500 cm<sup>-1</sup> range purified by ultrafiltration after cultivation of the bacteria cells in medium supplemented or not with NiSO<sub>4</sub> (1mM, 5mM)..... 140

### Tableaux

**Table 3.1** Dry biomass of Sorghum as a function of various treatments (mean ± SE n = 12). ..... 130

**Table 3.2** Metals IC<sub>50</sub> for *Curtobacterium citreum* strains (mean ± SE n = 3)..... 132

**Table 3.3** Intracellular Ni and wall surface Ni (µM) for *Curtobacterium citreum* BE and *C. citreum* DSM20528<sup>T</sup> (mean ± SE n = 3). ..... 133

**Table 3.4** Contents of Ni in the supernatant, adsorbed by the EPS and chelated in EPS of *Curtobacterium citreum* BE, as a function of Ni concentration (mean ± SE n = 3). ..... 140

### Figures Supplémentaires

**FigS3.1** Electrophoresis pattern of RAPD-PCR products. A: Geno 70.9 primer, B: RAPD1 primer, C: Geno 80.7 primer, D: RF1 primer and E: OPH13 primer. M: 1Kb DNA ladder (Promega), 1: BB, 2: GU, 3: AM, 4: BQ, 5: BR, 6: AR, 7: BS, 8: FN, 9: BE and 10: ES. ... 156

**FigS3.2** Phenogramm based on dissimilarity obtained by Xlstat program (Jaccard index) of the ten ultramafic *Curtobacterium* strains..... 157

**FigS3.3** Magnifications of the Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectrum of the *Curtobacterium citreum* BE EPS purified by ultrafiltration after cultivation of the bacteria cells in medium with or without NiSO<sub>4</sub> supplementations (1mM, 5mM). ..... 158



## Tableaux Supplémentaires

<b>Table S3.1</b> Site location, geographical description and geochemical characteristics of the sites of <i>Curtobacterium</i> strain sampling (Gonin et al., 2013). .....	159
<b>Table S3.2</b> List of strains: collection code, sampling site, plant host origin, DNA sequences in EMBL database, adaptation to ultramafic conditions (Gonin et al. 2013). Site 1: Trazy-Guerioum, Koniambo massif, Kone, 21°00'26"S; 164°50'04"E, 21.00 S 164.83 E; Site 2: Mont-Dore, Plum Road, 22°15'54"S 166°35'57"E, 22.26S 166.59 E. (See Table S1 for the description of each site). .....	160
<b>Table S3.3</b> Primers list used in the present study for RAPD experiments. ....	161
<b>Table S3.4</b> Full biochemical characteristics of <i>Curtobacterium</i> strains isolated from New Caledonian ultramafic soils and <i>C. citreum</i> DSM20528 <sup>T</sup> Abbreviations: +: growth; -: no growth; w: weakly. ....	162
<b>Table S3.5</b> Zone of inhibition (cm) of Ampicillin, Penicillin, Gentamycin, Tetracyclin, Streptomycin and Carbenicillin. ....	168
<b>Table S3.6</b> Percentages of polymorphic bands of RAPD experiments of the ten ultramafic <i>Curtobacterium</i> strains. ....	169
<b>Table S3.7</b> Statistics of sequencing depth and coverage. ....	169
<b>Table S3.8</b> Statistics of SNP annotation comparing with reference <i>Curtobacterium citreum</i> NS330. ....	170
<b>Table S3.9</b> P, K, Ca and Mg concentration in shoot and root of Sorghum (mean ± SE n = 3). ....	171
<b>Table S3.10</b> Metals concentration in shoot and root of Sorghum (mean ± SE n = 3). ....	172
<b>Table S3.11</b> Intracellular Ni and wall surface Ni ( $\mu\text{g} (10^7\text{CFU})^{-1}$ ) of <i>Curtobacterium citreum</i> BE and <i>C. citreum</i> DSM20528 <sup>T</sup> (mean ± SE n = 3). ....	173
<b>Table S3.12</b> Biofilm formation of <i>Curtobacterium citreum</i> BE and <i>C. citreum</i> DSM20528 <sup>T</sup> at 72h. Adherent bacteria are stained with a 0.02% crystal violet solution. The results are expressed as the ratio of the absorbance of the assay to the absorbance of the blank (without bacteria). ....	174
<b>Table S3.13</b> The productions of EPS by <i>Curtobacterium citreum</i> BE in relation to Ni (mean ± SE n = 3). ....	174

## Chapitre 4 Co-inoculation de *Curtobacterium citreum* BE et de champignons mycorrhiziens à arbuscules provenant des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie

### Figures

**Fig 4.1** Density (M), Frequency (F) of mycorrhization and Arbuscular abundance (A) of (a) *Tetraria comosa* (after 8 months) and (b) *Metrosideros laurifolia* (after 7 months). Bars represent means, and error bars represent standard errors (n = 15). Mycorrhizal structures were not observed in control and in plants inoculated only with *C. citreum* BE. Arbuscules could not be observed in *T. comosa* root. Value with the same lower case letters are not significantly different at  $P < 0.05$  according to Wilcoxon sign test. Same coefficient to letters refers to analysis of one mycorrhizal parameter for one plant species. ....

**Fig 4.2** Influence of bacterial and/or AMF inoculation on (a) *Tetraria comosa* and (b) *Metrosideros laurifolia* growth (means values of gain of height with standard errors) in

greenhouse experiment. Curve with the same lower case letters are not significantly different at  $P < 0.05$  according to repeated anova test. .... 190

**Fig 4.3** Influence of bacterial and/or AMF inoculation on (a) *Tetraria comosa* (after 8 months) and (b) *Metrosideros laurifolia* (after 7 months) biomasses (dry weight). Bars represent means, and error bars represent standard errors ( $n = 15$ ). Value with the same lower case letters are not significantly different at  $P < 0.05$  according to LSD test. Same coefficient to letters refers to analysis of one plant part analysis for one plant species. .... 191

**Fig 4.4** Effect of inoculation on essential mineral concentration in (a) *Tetraria comosa* (after 8 months) and (b) *Metrosideros laurifolia* (after 7 months) grown on ultramafic substrate. Relative variations of element concentration in shoots and roots are expressed as % of element concentration in dry mass of tissues of inoculated plants compared with controls. Bars represent means, and error bars represent standard errors ( $n = 3$ ). Value with the same lower case letters are not significantly different at  $P < 0.05$  according to Tukey's HSD or Fisher LSD test. Same coefficient to letters refers to analysis of one element plant for one plant part. .... 193

**Fig 4.5** Effect of inoculation on essential mineral content in (a) *Tetraria comosa* (after 7 months) and (b) *Metrosideros laurifolia* (after 8 months) grown on ultramafic substrate. Relative variations of element content in shoots and roots are expressed as % of element content in dry mass of tissues of inoculated plants compared with controls. Bars represent means, and error bars represent errors ( $n = 3$ ). Value with the same lower case letters are not significantly different at  $P < 0.05$  to Tukey's HSD or Fisher LSD test. Same coefficient to letters refers to analysis of one element for one plant species. .... 195

**Fig 4.6** Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Classification on Principal Component (HCPC). PCA and HCPC were perform for (a) *Tetraria comosa* with 25 variables : dry weight tissue of shoot (BS) and roots (BR), density (M) and frequency (F) of mycorrhization, sporulation of *Rhizophagus neocaledonicus* (Spore\_Rhizo) and *Claroideoglopus etunicatum nc* (Spore\_Claro), major element concentration in shoot (ie. Ca\_S) and roots (ie. Ca\_R) (Ca, Mg, K, P), major element content (ie. Ca\_upt) (Ca, Mg, K, P), Ca/Mg ratio in shoot (CaMg\_S) and roots (CaMg\_R) and metal translocation factor (ie. Co\_TF) (Co, Cr, Fe, Mn, Ni) and (b) 26 variables (same variables + the abundance of arbuscules (A)) for *Metrosideros laurifolia*. Analyses were carried out using R software with the 'FactoMineR' package. HCPC used Euclidean distances for calculating dissimilarities between observations and average method to define cluster. .... 199

### Tableaux

**Table 4.1** AMF spore production in pots of *Tetraria comosa* (after 7.5 months) and *Metrosideros laurifolia* (after 6.5 months) inoculated with AMF (mean  $\pm$  SE  $n = 15$ ). .... 187

**Table 4.2** Ca/Mg ratio in (after 8 months) and *Metrosideros laurifolia* (after 7 months) as a function of various treatments (mean  $\pm$  SE  $n = 3$ ). .... 194

**Table 4.3** Translocation factor (TF) in *Tetraria comosa* and *Metrosideros laurifolia* as a function of various treatments (mean  $\pm$  SE  $n = 3$ ). .... 197

**Table 4.4** Correlation coefficient of shoot biomass (BS) and root biomass (BR) with the 23 variables: density (M) and density (F) of mycorrhization, sporulation of *Rhizophagus neocaledonicus* (Spore\_Rhizo) and *Claroideoglopus etunicatum nc* (Spore\_Claro), major element concentration in shoot (ie. Ca\_S) and roots (ie. Ca\_R) (Ca, Mg, K, P), major element content (ie. Ca\_upt) (Ca, Mg, K, P), Ca/Mg ratio in shoot (CaMg\_S) and roots (CaMg\_R) and metal translocation factor (ie. Co\_TF) (Co, Cr, Fe, Mn, Ni) for *Tetraria comosa* and the 24 variables (same variables + the abundance of arbuscules (A)) for *Metrosideros laurifolia*. . 201

## Figures Supplémentaires

<b>FigS4.1</b> Photographic report of <i>Tetraria comosa</i> removed from pots after 8 months as function of the different treatments. ....	213
<b>FigS4.2</b> Photographic report of <i>Metrosideros laurifolia</i> removed from pots after 7 months as function of the different treatments. ....	214
<b>FigS4.3</b> Effect of inoculation on metal concentration in (a) <i>Tetraria comosa</i> and (b) <i>Metrosideros laurifolia</i> grown on ultramafic substrate. Relative variations of metal concentration in shoots and roots are expressed as % of metal concentration in dry mass of tissues of inoculated plants compared with controls. Bars represent means, and error bars represent standard errors (n = 3). Value with the same lower case letters are not significantly different at P < 0.05 according to Fisher's LSD test. Same coefficient to letters refers to one metal analysis. ....	215
<b>FigS4.4</b> Correlogramm for the 25 variables: dry weight tissue of shoot (BS) and roots (BR), density (M) and frequency (F) of mycorrhization, sporulation of <i>Rhizophagus neocaledonicus</i> (Spore_Rhizo) and <i>Claroideoglosum etunicatum nc</i> (Spore_Claro), major element concentration in shoot (ie. Ca_S) and roots (ie. Ca_R) (Ca, Mg, K, P), major element content (ie. Ca_upt) (Ca, Mg, K, P), Ca/Mg ratio in shoot (CaMg_S) and roots (CaMg_R) and metal translocation factor (ie. Co_TF) (Co, Cr, Fe, Mn, Ni) for <i>Tetraria comosa</i> and the 26 variables (same variables + the abundance of arbuscules (A)) for <i>Metrosideros laurifolia</i> . "X": Correlation not significant at P < 0.05. ....	216

## Tableaux Supplémentaires

<b>Table S4.1</b> Major characteristics of <i>Curtobacterium citreum</i> BE. Abbreviations: +: growth; -: no growth; var: variable (Gonin et al., 2013; Bourles et al., submitted). ....	217
<b>Table S4.2</b> Density (M), frequency (F) of mycorrhization and abundance of arbuscule (A) of <i>Tetraria comosa</i> and <i>Metrosideros laurifolia</i> (mean ± SE n = 15). ....	218
<b>Table S4.3</b> Growth of <i>Tetraria comosa</i> during time as a function of various treatments (mean ± SE n = 15). ....	219
<b>Table S4.4</b> Growth of <i>Metrosideros laurifolia</i> during time as a function of various treatments (mean ± SE n = 15). ....	219
<b>Table S4.5</b> Growth characteristics of <i>Tetraria comosa</i> (after 8 months) and <i>Metrosideros laurifolia</i> (after 7 months) as a function of various treatments (mean ± SE n=15). ....	220
<b>Table S4.6</b> Ca, Mg, Na, K and P concentration in shoot and root of <i>Tetraria comosa</i> (after 8 months) and <i>Metrosideros laurifolia</i> (after 7 months) as a function of various treatments (mean ± SE n = 3). ....	221
<b>Table S4.7</b> Major element content of <i>Tetraria comosa</i> (8 months) and <i>Metrosideros laurifolia</i> (7 months) as a function of various treatment (mean ± SE n = 3). ....	222
<b>Table S4.8</b> Metal concentration in shoot and root of <i>T. comosa</i> (8 months) and <i>M. laurifolia</i> (7 months) as a function of various treatments (mean ± SE n = 3). ....	223
<b>Table S4.9</b> Variables which defined each cluster (P < 0.05) using a Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Classification on Principal Component (HCPC). PCA and HCPC were perform with 25 variables (Biomass (dry weight tissue of shoot (BS) and roots (BR), density (M) and density (F) of mycorrhization, sporulation of <i>Rhizophagus neocaledonicus</i> (Spore_Rhizo) and <i>Claroideoglosum etunicatum nc</i> (Spore_Claro), major	

element concentration in shoot (ie. Ca\_S) and roots (ie. Ca\_R) (Ca, Mg, K, P), major element content (ie. Ca\_upt) (Ca, Mg, K, P), Ca/Mg ratio in shoot (CaMg\_S) and roots (CaMg\_R) and metal translocation factor (ie. Co\_FT) (Co, Cr, Fe, Mn, Ni) for *Tetraria comosa* and 26 variables (same variables + the abundance of arbuscules (A)) for *Metrosideros laurifolia*. Analyses were carried out using R software with the 'FactoMineR' package. HCPC used Euclidean distances for calculating dissimilarities between observations and average method to define cluster ..... 224

## Conclusion

**Fig.2.** Schéma récapitulatif de l'ensemble du travail de thèse. Les éléments en gras ont été mis en évidence dans le cadre de ce travail. Les autres éléments sont repris de la bibliographie pour aider à la compréhension (Revilenni et al., 2016, Amir et Ducouso, 2010, Jaffré et L'Huillier, 2010) (a) action de la plante pour la rhizobactérie, (b) action de la plante pour l'AMF ; (c) action de la rhizobactérie pour la plante, (d) action de la rhizobactérie pour l'AMF, (e) action de l'AMF pour la plante et (f) action de l'AMF pour la rhizobactérie. .... 226

## Annexes

**Annexe 1** Analyse en composantes principales suivi d'une classification hiérarchique pour *T. comosa* et *M. laurifolia*. Les variables utilisées pour *T. comosa* sont les biomasses des parties aériennes (BS) et racinaires (BR), la densité (M) et la fréquence (F) de mycorhization, la sporulation de *Rhizophagus neocaledonicus* (Spore\_Rhizo) et *Claroideoglossum etunicatum* (Spore\_Claro), les concentrations en éléments dans les parties aériennes (ie. Ca\_S) et racinaires (ie. Ca\_R) (Ca, Mg, K, P), les contenus en éléments (ie. Ca\_upt) (Ca, Mg, K, P), le ration Ca/Mg dans les parties aériennes (CaMg\_S) et racinaires (CaMg\_R) et les facteurs de translocation des métaux (ie. Co\_TF) (Co, Cr, Fe, Mn, Ni). Pour *M. laurifolia*, il s'agit des mêmes variables + l'abondance des arbuscules. .... 262

**Annexe 2** Photographies des plants de *Tetraria comosa* après huit mois en serre en fonction des différents traitements. .... 263

**Annexe 3** Photographies des plants de *Metrosideros laurifolia* après sept mois en serre en fonction des différents traitements. .... 264

**Annexe 4** Analyse en composantes principales des résultats issus de Gonin et al. (2013). Les variables utilisées sont les concentrations en métaux disponibles sur les sites échantillonnés (i.e. NiSol) (Ni, Co, Cr, Mn, Fe) et les valeurs de tolérance (Ni, Co, Cr Mn). 1. *Caballeronia novacaledonica* STM10272<sup>T</sup>, 2. STM10274, 3. STM10275, 4. STM10276, 5. STM10277, 6. STM10278, 7. *Paraburkholderia ultramafica* STM10279<sup>T</sup>, 8. STM10280, 9. STM102781, 10. STM10282, 11. STM10283, 12. *Curtobacterium citreum* BE, 13. BB, 14. AM, 15. AR, 16. BS, 17. BQ, 18. BR, 19. GU, 20. FN et 21. ES..... 265

**Annexe 5** Relations phylogénétiques entre les espèces de *Bradyrhizobium*, basées sur l'analyse génomique de l'ARNr 16S. Les valeurs indiquées au niveau des nœuds d'arbres sont des valeurs d'occurrence de 1000 répliques de bootstrap. Les valeurs de bootstrap supérieures à 75% sont affichées. La barre d'échelle indique le nombre de substitutions par site. .... 266

**Annexe 6** Relations phylogénétiques entre les espèces de *Sphingomonas* basées sur l'analyse génomique de l'ARNr 16S. Les valeurs indiquées au niveau des nœuds d'arbres sont des valeurs d'occurrence de 1000 répliques de bootstrap. Les valeurs de bootstrap supérieures à 75% sont affichées. La barre d'échelle indique le nombre de substitutions par site. .... 267

**Résumé :** Un tiers de la surface de la Nouvelle-Calédonie est recouvert par des massifs ultramafiques caractérisés par des conditions édaphiques extrêmes contribuant au développement d'une flore unique reconnue à travers le monde. L'interaction avec les microorganismes du sol et notamment les rhizobactéries constitue une adaptation essentielle chez ces plantes. Cependant, ces bactéries ainsi que leur rôle dans l'adaptation des plantes aux contraintes ultramafiques sont encore méconnues. C'est dans ce contexte que s'insère cette thèse dont l'objectif est de comprendre le rôle de ces rhizobactéries dans l'adaptation des plantes à la contrainte édaphique. Cette thèse s'intéresse plus particulièrement aux bactéries appartenant au genre *Burkholderia* et *Curtobacterium*. Ce travail a été scindé en trois objectifs : (1) Caractériser les isolats bactériens, (2) Evaluer la réponse adaptative des bactéries à la contrainte édaphique et (3) Evaluer l'action promotrice de la croissance des plantes. Ainsi, ce travail a permis de mettre en évidence l'existence de taxons originaux inféodés aux sols ultramafiques avec des mécanismes particuliers impliqués dans la tolérance aux métaux et jouant un rôle majeur dans l'adaptation des plantes à la contrainte édaphique. Des mécanismes de résistance aux métaux différents selon les espèces bactériennes considérées ont été mis en évidence et sont responsables des diminutions des teneurs en métaux dans les plantes. Cependant, ces inoculations bactériennes seules n'ont pas permis d'améliorer significativement la croissance des plantes. Des essais de co-inoculation avec des champignons mycorrhiziens à arbuscules ont montré des effets bénéfiques sur la mise en place de la symbiose mycorrhizienne entraînant une amélioration de la croissance des plantes. Finalement, ce travail de thèse a permis de montrer l'importance des rhizobactéries dans les sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie, tant en terme de diversité d'espèces que d'effet sur l'adaptation des plantes endémiques à ce milieu. De plus, les résultats obtenus permettent de dégager des conclusions intéressantes sur les adaptations des espèces végétales des sols ultramafiques, préalable primordiale à l'amélioration des programmes de restauration écologique. L'interaction de ces rhizobactéries avec les champignons mycorrhiziens à arbuscules semble être une voie prometteuse pour la restauration des sites miniers dégradés de Nouvelle-Calédonie.

**Mots clés :** Rhizobactéries, Exopolysaccharides, Tolérance aux métaux, Sols ultramafiques, Champignons mycorrhiziens à arbuscules, Adaptation des plantes

**Abstract:** In New Caledonia, a tropical archipelago in the South Pacific Ocean, one third of the main island is covered by ultramafic soils that contribute to the development of a unique flora recognized throughout the world. Interaction with soil microorganisms, particularly rhizobacteria, is an essential adaptation in plants found on ultramafic soils. However, these bacteria and their role in the adaptation of plants to ultramafic constraints are still unknown. The objective is to understand the role of these rhizobacteria isolated from New Caledonian ultramafic soils in the adaptation of plants to soil constraints. This thesis focuses on bacteria belonging to the genera *Burkholderia* and *Curtobacterium*. This work is divided into three objectives, (1) The characterization of the bacterial isolates, (2) The evaluation of the adaptive response of bacteria to metal stress and (3) The evaluation of the plant growth promoting effect. This work highlights the existence of original taxa subordinated to ultramafic soils with particular mechanisms of resistance to metals involving in the adaptation of plants to soil stress. Mechanisms of resistance to metals depending on the bacterial species considered have been identified and are responsible of alleviation of metal in plants. However, these bacterial inoculations alone did not significantly improve plant growth. Co-inoculation trials with arbuscular mycorrhizal fungi have shown beneficial effects on the development of mycorrhizal improving the plant growth. Finally, this thesis shows the importance of rhizobacteria in the ultramafic soils of New Caledonia, both in terms of species diversity and the effect on the adaptation of endemic plants to this environment. In addition, the results obtained make interesting conclusions on the adaptation of plant species in ultramafic soils for improving ecological restoration programs. Moreover, the interaction of the rhizobacteria with arbuscular mycorrhizal fungi seems to be a promising way to restore degraded mining sites in New Caledonia.

**Key words:** Rhizobacteria, Exopolysaccharides, Metal tolerance, Ultramafic soils, Arbuscular mycorrhizal fungi, plant adaptation