

OBSERVATOIRE « HOMMES-MILIEUX »
Littoral méditerranéen



AstraSymbiote

Impact de la pollution sur la biodiversité symbiotique des racines d'Astragalus tragacantha, espèce clé de voute des phryganes littorales de la rade de Marseille

Rapport final

15/03/2014

Responsable scientifique

Lucie MICHÉ

Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale (IMBE)
UMR CNRS / IRD / Aix-Marseille Université / Université d'Avignon
lucie.miche@imbe.fr

Sommaire

Sommaire	2
Résumé succinct du projet	3
1. Informations générales concernant le projet.....	4
2. Contexte problématique initial	5
3. Méthodologie	7
4. Résultats	11
5. Discussion	17
Conclusion	20

Résumé succinct du projet

Biodiversité et urbanisation font rarement bon ménage ; pourtant le littoral de Marseille supporte une diversité végétale remarquable vivant au contact d'un tissu urbain de près de 1,5 millions d'habitants. La pollution des sols, héritage récent du passé industriel de Marseille, est un attribut crucial de l'écologie végétale de cette zone. D'abord car cette pollution multi-métallique peut perturber le fonctionnement écologique, ensuite certaines plantes sont capables de fixer ces particules métalliques polluantes ; une capacité qui pourrait être appliquée à l'ingénierie écologique pour fixer ces polluants et limiter leur dispersion par le vent. Enfin il se trouve que l'une des plantes candidates pour cette application est *Astragalus tragacantha* (Fabacée), espèce rare, en régression, formant des coussins épineux caractéristiques d'un milieu naturel exceptionnel en France, la « Phrygane ». Comme toutes les Fabacées, ou « Légumineuses », la croissance de l'Astragale dépend de son association avec des symbiotes racinaires. Or, leur biodiversité est méconnue ainsi que l'effet des pollutions sur celle-ci. L'objectif a été de caractériser ces symbioses fonctionnelles ; et d'analyser si ces interactions symbiotiques sont modifiées en condition de pollution métallique. Au sein d'un gradient de pollution nous avons évalué *in situ* la « santé » des plantes, puis recherché la présence de champignons à l'intérieur des racines d'Astragale (endomycorhizes) et analysé la diversité microbienne du sol et des racines par technique de séquençage d'ADN haut débit. Les résultats préliminaires montrent que les racines d'Astragales sont fortement associées aux champignons et qu'elles abritent une communauté bactérienne distincte de la communauté voisine du sol.

Les points positifs de ce projet sont la découverte d'une diversité microbienne d'une ampleur taxonomique inattendue, la démonstration d'une spécificité des communautés racinaires et une différenciation dans l'espace formant de bonnes bases d'hypothèses pour des recherches à venir.

Mots clés : plante rare, symbioses, anthropisation, pollution, ETMM, services écosystémiques, littoral, Parc National des Calanques

1. Informations générales concernant le projet

Responsable(s) scientifique(s)

Lucie MICHÉ
IMBE - Aix-Marseille Université
Pôle de l'Etoile, Faculté St Jérôme,
Av. Escadrille Normandie-Niemen - Boite 431
F-13397 Marseille Cedex 20
Téléphone : (+33)4 91 28 90 01
Email : lucie.miche@imbe.fr

Nom-Prénom	Fonctions et laboratoire	Spécialité
AFFRE Laurence	MCF HDR - Aix-Marseille Université, IMBE	Ecologie Végétale
BAUMEL Alex	MCF HDR - Aix-Marseille Université, IMBE	Ecologie Végétale
LAFFONT-SCHWOB Isabelle	MCF HDR - Aix-Marseille Université, IMBE	Ecophysiologie
MARTINEAU Antoine	DUT Génie Biologique option Environnement - Aix-Marseille Université	Génie Biologique
MICHÉ Lucie	MCF - Aix-Marseille Université, IMBE	Ecologie Microbienne
MIRLEAU Pascal	MCF - Aix-Marseille Université, IMBE	Ecologie Microbienne
RABIER Jacques	MCF HDR - Aix-Marseille Université, IMBE	Physiologie Végétale
SALDUCCI Marie-Dominique	TCE -Aix-Marseille Université, IMBE	Ecophysiologie

Temporalité

Date de début des travaux : printemps 2013

Date de fin des travaux pour la rédaction du rapport : février 2014

Poursuite de l'étude en cours : Oui

Demande de soutien financier à l'OHM pour l'année 2014 : Non

2. Contexte problématique

La région méditerranéenne, « hotspot » de biodiversité, possède une flore remarquable avec un fort taux d'endémisme (Médail & Quézel, 1999). La végétation du littoral a été soumise depuis des millénaires à de fortes contraintes édaphiques et climatiques, favorisant l'émergence d'une végétation clairsemée caractéristique formée de plantes de petite taille et structurée par les coussinets épineux de l'**Astragale**. Cette végétation thermo-xérophile, aussi appelée **phrygane**, est fréquente sur le littoral et les massifs de la méditerranée orientale (Grèce, Turquie, Liban). Cette végétation est cependant plus clairsemée en méditerranée occidentale, et notamment en France, où l'**Astragale de Marseille** (*Astragalus tragacantha*, Fabacées) est une espèce rare, présentant une distribution restreinte à la rade de Marseille. Plusieurs facteurs aggravent la rareté de cette espèce : la destruction des milieux par l'urbanisation du littoral fait irrémédiablement disparaître de nombreuses populations d'*A. tragacantha*, et la zone sud de la rade de Marseille représente une relique de ces toutes dernières populations. Par ailleurs, les dommages liés à la fréquentation littorale (piétinement) et les plantations d'espèces envahissantes très compétitives (griffes de sorcières, agaves, figuiers de barbarie) participent à sa disparition. La dynamique régressive de ces populations d'Astragale a été observée dans la rade de Marseille et il n'est pas exclu de la voir s'éteindre à l'échelle du siècle à venir. **La restauration écologique des phryganes a donc été identifiée comme un objectif de gestion prioritaire du Parc National des Calanques (PNCa), en parallèle d'un suivi et de la protection des populations actuelles.**

En plus de l'Astragale, 25 espèces végétales sur les 650 recensées au cœur du massif de Marseilleveyre sont considérées rares ou endémiques. Le littoral péri-marseillais est ainsi ancré dans une situation paradoxale, avec des formations végétales périurbaines remarquables insérés dans un tissu urbain de près de 1,5 millions d'habitants. Ses habitats possèdent d'ailleurs un statut de protection à différents niveaux : Z.N.I.E.F.F., sites Natura 2000, Sites Naturels Protégés du Conservatoire du Littoral, Réserve Naturelle Nationale de l'archipel de Riou, ainsi que le récent Parc National des Calanques (PNCa). Le littoral péri-marseillais doit pourtant faire face à perturbations environnementales et anthropiques croissantes, avec une pollution notoires des eaux, des embruns et des sols. Celle-ci résulte d'une part, de l'évacuation des eaux traitées (station d'épuration) et de fleuves (Huveaune et Jarret) au cœur même du massif des Calanques ; et d'autre part des activités industrielles passées, implantées loin du centre-ville : manufactures de produits chimiques, fours à chaux, métallurgie. La plupart de ces industries ont aujourd'hui cessé leurs activités, mais sans aucune démarche globale de réhabilitation ; laissant des friches industrielles polluées qui génèrent un problème de santé publique.

Un exemple typique de l'incidence actuelle de cette activité industrielle passée se trouve sur le site de l'**Escalette**, dont l'ancienne usine de traitement du plomb argentifère a engendré l'accumulation d'éléments traces métalliques et métalloïdes (**ETMM**) dans les sols (principalement Pb, As, Sb, Cu et Zn). Des travaux de recherche sur les flux de contaminants récemment coordonnés par l'IMBE (ANR-CESA-018 Marséco) ont fait état d'une **dispersion des polluants** plus large et éparse que précédemment envisagée (InVS-DRASS, 2005), en particulier sur toute la partie littorale du massif de Marseilleveyre. Ces pollutions impactent directement les espèces marines par lixiviation des dépôts de scories vers la mer, et les espèces terrestres par dispersion des particules polluées par le vent sur le littoral et transfert des pollutions de l'eau vers la terre à travers les embruns. Les effets de ces pollutions sont multiples: risques sanitaires pour les habitants et usagers du site, régression des populations de certaines espèces végétales et coûts économiques importants de restauration des habitats.

Bien que contaminé, le site de l'**Escalette est pourtant colonisé** par une communauté végétale littorale diversifiée, dont certaines populations endémiques comme l'Astragale de Marseille. La tolérance de cette plante à la pollution ouvre ainsi des perspectives intéressantes pour son utilisation en **phytostabilisation** des sols (Laffont-Schwob et al., 2011). Cette technique de restauration de sites pollués de manière diffuse et sur une grande étendue, se base sur les capacités des plantes et de leurs microorganismes associés à piéger les ETMM au niveau des racines (Pilon-Smits, 2005), réduisant ainsi leur dispersion dans l'air et les eaux d'écoulement en limitant l'érosion et le lessivage du sol (Kidd et al., 2009). En renforçant le couvert végétal sur ce site, la phytostabilisation réduirait la dispersion des particules polluées par le vent. Cela constituerait ainsi une solution alternative de restauration écologique non-invasive, en adéquation avec les objectifs de gestion du PNCal. **Mais pour être réalisable, cette technique nécessite au préalable une connaissance approfondie des facteurs écologiques contrôlant la régénération démographique de l'Astragale de Marseille. En particulier, l'étude des microorganismes associés aux racines de l'Astragale pourrait s'avérer essentielle au contrôle de la survie des plantules, leur installation, leur croissance, et du maintien des plantes adultes.**

Une particularité d'*A. tragacantha* concerne sa capacité à établir une double symbiose au niveau racinaire : avec des espèces fongiques (formant des endomycorhizes) mais également des bactéries fixatrice d'azote (formant des nodules). Sachant que les sols contaminés par les ETMM sont généralement pauvres en éléments nutritifs et présentent une structure fortement altérée, cette capacité symbiotique pourrait jouer un rôle important dans le maintien de l'espèce végétale sur ce site (Gamalero et al., 2009). Or, très peu de données sont actuellement disponibles sur cette plante, pourtant classée prioritaire dans le livre rouge des espèces menacées de France. Et si l'Astragale semble relativement tolérante à cette pollution en ETMM (ce qui pose la question du rôle des microorganismes associés aux racines dans cette tolérance), certains individus adultes montrent néanmoins des signes préoccupants de **nécroses foliaires suite à leur exposition répétée aux embruns salés et pollués** par des traces d'hydrocarbures et de détergents (Dumas, *en préparation*), accentuant encore la régression des populations d'Astragale.

Or, la biodiversité des communautés microbiennes symbiotique de l'Astragale est encore méconnue et ne peut pas être extrapolée à partir des modèles biologiques courants compte tenu de son écologie particulière ; ou d'études ponctuelles ciblant des taxons microbiens précis. Cette méconnaissance fondamentale est un verrou pour l'évaluation des conséquences des pollutions sur les phryganes et pour les projets de restauration de ces milieux. Dans une démarche de conservation d'*A. tragacantha* et de son potentiel en phytostabilisation de la pollution, **notre objectif a alors été de mieux caractériser ces symbioses fonctionnelles ; et d'analyser si ces interactions symbiotiques sont modifiées en conditions de fort stress métallique et d'exposition aux embruns, correspondant à sa zone de répartition actuelle.**

Afin d'appréhender au mieux la complexité des communautés microbiennes associées à l'Astragale de Marseille dans différents contextes environnementaux, notre choix s'est porté sur la puissance des nouvelles technologies de séquençage d'ADN à haut débit de type « code barre ». Leur utilisation s'est en effet révélée particulièrement efficace dans la recherche (par exemple) de candidats bactériens impliqués dans l'amélioration de la croissance des plantes (Manter et al., 2010), ou pour corréliser santé des plantes et communautés fongiques associées à leurs racines (Yu et al., 2012). L'échantillonnage du matériel biologique a été réalisé *in situ*, de manière peu impactante et organisé de façon à comparer la biodiversité des sites pollués à celle de sites non (ou moins) pollués.

3. Méthodologie

En se basant sur les analyses des sols réalisées dans le cadre du projet ANR Marséco (Annexe 1), quatre sites d'études ont été sélectionnés suivant un **gradient de pollution multi-métallique décroissant: Escalette, anse de la Maronaise, Mont-Rose, archipel du Frioul**.

Une demande de dérogation pour la cueillette de spécimens d'espèces végétales protégées, auprès du Préfet de la région Provence-Alpes-Côte d'Azur a été déposée à la DDTM 13, après avis conforme du directeur du Parc National des Calanques. Cette autorisation obtenue (Annexe 2), la campagne de prélèvements d'échantillons de racines d'Astragale a été réalisée au printemps 2013 :

1. Sur chacun des sites, la recherche de **8 individus sains (S) et 8 individus montrant au moins 50% de nécroses foliaires (B)** a été faite au hasard, jusqu'à atteindre le quota de 16 Astragales. Chaque individu a alors été géo-localisé et photographié:

Tableau des localisations GPS des Astragales au Mont Rose			Tableau de localisation GPS des Astragales à l'Escalette		
Nom	N	E	Nom	N	E
RS1	43° 13' 53,9"	5° 21' 3,7"	ES1	43° 13' 34,8"	5° 20' 54,3"
RB1	43° 13' 53,9"	5° 21' 3,6"	EB1	43° 13' 34,8"	5° 20' 54,3" à 1m
RS2	43° 13' 53,9"	5° 21' 03,7"	ES2	43° 13' 35,0"	5° 20' 54,7"
RB2	43° 13' 53,5"	5° 21' 02,7"	EB2	43° 13' 34,8"	5° 20' 54,9"
RS3	43° 13' 53,2"	5° 21' 02,5"	ES3	43° 13' 35,8"	5° 20' 55,3"
RB3	43° 13' 53,3"	5° 21' 02,6"	EB3	43° 13' 35,2"	5° 20' 54,9"
RS4	43° 13' 53,5"	5° 21' 01,9"	ES4	43° 13' 34,4"	5° 20' 54,6"
RB4	43° 13' 53,6"	5° 21' 01,9"	EB4	43° 13' 34,3"	5° 20' 54,5"
RS5	43° 13' 53,3"	5° 21' 01,2"	ES5	43° 13' 36,8"	5° 20' 53,7"
RB5	43° 13' 53,4"	5° 21' 00,9"	EB5	43° 13' 36,9"	5° 20' 53,8"
RS6	43° 13' 52,7"	5° 21' 00,5"	ES6	43° 13' 37,0"	5° 20' 54,3"
RB6	43° 13' 52,7"	5° 21' 00,4"	EB6	43° 13' 37,0"	5° 20' 54,2"
RS7	43° 13' 52,7"	5° 21' 00,6"	ES7	43° 13' 37,3"	5° 20' 55,1"
RB7	43° 13' 52,7"	5° 21' 00,5"	EB7	43° 13' 37,2"	5° 20' 55,0"
RS8	43° 13' 52,9"	5° 21' 01,2"	ES8	43° 13' 37,1"	5° 20' 55,0"
RB8	43° 13' 52,6"	5° 21' 01,1"	EB8	43° 13' 37,1"	5° 20' 55,1"

Tableau des localisations GPS des Astragales à la Maronaise			Tableau de localisation GPS des Astragales au Frioul		
Nom	N	E	Nom	N	E
MB1	43° 12' 53,3"	5° 20' 30,6"	FS1	43° 16' 08,0"	5° 17' 50,4"
MS1	43° 12' 53,2"	5° 20' 30,3"	FB1	43° 16' 07,9"	5° 17' 50,3"
MB2	43° 12' 53,1"	5° 20' 30,4"	FS2	43° 16' 08,0"	5° 17' 51,1"
MS2	43° 12' 53,4"	5° 20' 30,2"	FB2	43° 16' 08,0"	5° 17' 51,1"
MB3	43° 12' 53,3"	5° 20' 30,5"	FS3	43° 16' 07,0"	5° 17' 50,7"
MS3	43° 12' 53,4"	5° 20' 30,3"	FB3	43° 16' 07,1"	5° 17' 50,4"
MB4	43° 12' 52,9"	5° 20' 30,6"	FS4	43° 16' 07,7"	5° 17' 50,6"
MS4	43° 12' 53,0"	5° 20' 30,8"	FB4	43° 16' 07,1"	5° 17' 50,6"
MB5	43° 12' 52,8"	5° 20' 31,2"	FS5	43° 16' 08,1"	5° 17' 51,3"
MS5	43° 12' 53,3"	5° 20' 31,1"	FB5	43° 16' 08,7"	5° 17' 47,1"
MB6	43° 12' 52,7"	5° 20' 32,0"	FS6	43° 16' 08,7"	5° 17' 47,1"
MS6	43° 12' 52,7"	5° 20' 31,6"	FB6	43° 16' 08,9"	5° 17' 47,1"
MB7	43° 12' 52,7"	5° 20' 32,0"	FS7	43° 16' 08,8"	5° 17' 47,2"
MS7	43° 12' 52,8"	5° 20' 32,0"	FB7	43° 16' 08,8"	5° 17' 47,2"
MB8	43° 12' 52,8"	5° 20' 33,1"	FS8	43° 16' 09,9"	5° 17' 46,7"
MS8	43° 12' 52,5"	5° 20' 33,3"	FB8	43° 16' 09,7"	5° 17' 47,0"



Figure 1. Exemples d'*A. tragacantha* (saines : S et brûlées par les embruns : B), échantillonnées sur les sites de l'Escalette (E), du Mont Rose (R), de la Maronaise (M) et du Frioul (F).

2. Nous avons alors évalué le lien entre l'état phénotypique des astragales (individus nécrosés ou non) et leurs **teneurs en phytométabolites** issus du métabolisme primaire (chlorophylles) et secondaire (différents composés phénoliques) à l'aide d'un équipement portable de mesures non-destructives par capteurs optiques (**Multiplex® Force-A**) : cet appareil permet notamment le suivi *in situ* de biomarqueurs de stress (molécules fluorescentes). Pour cela, des mesures ont été réalisées sur chacun des individus pour chaque site. L'appareil de mesures non-destructives est positionné en mettant la fenêtre de détection en contact avec des rameaux d'Astragale : il émet des flashes aux longueurs d'onde UV, bleue, verte ou rouge et enregistre en réponse les différentes émissions de fluorescence (jaune, rouge, rouge lointain) proportionnelles aux concentrations de phytométabolites spécifiques. Des calculs de ratios de ces différentes valeurs permettent de s'affranchir de la géométrie des échantillons étudiés et d'en déduire les teneurs en flavonols, anthocyanes, chlorophylles et un indice de carence azoté. En raison de l'importante dispersion des mesures liée à la biologie de l'Astragale (phénomènes d'anémomorphose, effets nécrotiques des embruns), un grand nombre de répétitions a été nécessaire pour chaque individu (25 points de mesure).

3. Dans un deuxième temps, des **prélèvements de sol et racines** ont été réalisés pour chacune des plantes. Les coussinets épineux ont été soulevés délicatement afin de dégager les racines : le sol a été creusé sur une dizaine de centimètres en 4 points sous la canopée des astragales, afin de mettre en évidence leurs racines et pouvoir ainsi prélever quelques racines secondaires fines à l'aide de pinces, sans prélever de racines primaires pour ne pas compromettre la viabilité des individus. Le sol (mycosphérique) a ensuite été remis en place, après en avoir conservé 40 mL pour analyses.

4. En s'appuyant sur le stage de DUT d'Antoine Martineau (Mai-Juin 2013), les **ADN totaux ont été extraits** de chaque prélèvements, à l'aide de kits commerciaux adaptés aux tissus végétaux et au sol (NucleoSpin® Plant II et NucleoSpin® Soil - Macherey-Nagel), en suivant les instructions du fournisseur. Quelques fragments de racines ont également été conservés dans des fioles contenant de l'alcool à 60° pour une observation microscopique (après coloration) de la présence d'endomycorhizes.
5. Les communautés microbiennes ont été caractérisées par **séquençage haut débit** de type « **code barre** » (été 2013). Nous avons utilisé différents couples d'amorces afin de balayer un large spectre taxonomique : pour cela, la région ITS des ADNr fongiques (Yu et al., 2012) et les régions hypervariables V3-V4 de l'ADNr 16S procaryote (Gottel et al., 2011 ; Vasileiadis et al., 2012) ont été ciblées. Afin d'avoir une vision plus précise de la diversité infra-spécifique des rhizobia symbiotiques un marqueur alternatif (*dnaK*) a également utilisé (Stekowski et al, 2003). De même, la région ITS n'étant pas la plus adaptée pour caractériser les champignons endomycorhiziens (Bellemain et al, 2010 ; Krüger et al, 2012), nous avons choisi de compléter cette étude avec des amorces ciblant la région V4 de l'ADNr 18S (la mieux renseignée dans GenBank : cf Lumini et al, 2010). Enfin, les amorces ciblant ces quatre régions ont également dû être choisies de façon à amplifier des fragments de taille homogène, et adaptée aux capacités de séquençage de la technologie Illumina (240 à 340 pb). Elles sont listées dans le tableau 1 :

Tableau1 : amorces retenues pour amplifier les 4 « code-barres » microbiens

Amorce	Séquence (5'->3')	Cible	Tm	Référence
TSdnaK2	GTACATGGCCTCGCCGAGCTTCA	dnaK	62°C	Stępkowski et al, 2003
TsdnaK3	AAGGAGCAGCAGATCCGCATCCA			
515sF	GTGCCAGCAGCCGCGTAATAC	16S-V4	55°C	Cette étude (modification des amorces dégénérées 530F& 803R, selon Vasileiadis et al, 2012)
805sR	GACTACCAGGGTATCTAATCC			
AMV4.5NF	AAGCTCGTAGTTGAATTCG	18S – V4	50°C	Sato et al,2005
AMDGR	CCCAACTATCCCTATTAATCAT			
ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	ITS1	48°C	Gardes & Brun 93
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC			

Au total, les 4 gènes cibles ont ainsi été analysés pour chacun des 128 échantillons (4 sites x 16 plantes x 2 prélèvements). Le séquençage haut débit a été réalisé à l'automne 2013 sur la plateforme de Genotypage de Toulouse / Midi-Pyrénées (GeT-PlaGe), sous la responsabilité d'Olivier Bouchez et Céline Jeziorski. Un run d'Illumina-MiSeq paired-end (2 x 250pb : une lecture de séquence double sens) comprenant 3 banques (3 répliquats techniques ; soit un total de 1536 PCR séquencées) a été nécessaire. Le séquençage a ainsi généré plus de 26 millions de séquences d'ADN.

6. **Analyses bioinformatiques des séquences.** Le traitement de ces données à très haut débit nécessite l'utilisation de programmes dédiés (le plus souvent en langage Unix ou Python). C'est pourquoi la porteuse du projet a suivi une formation spécifique en 2013 (*Second Metabarcoding Spring School in Crete, Greece, 13-17 May*), afin d'apprendre à utiliser le pack « OBITools » (<http://www.grenoble.prabi.fr/trac/OBITools>). Les différentes étapes d'analyse de ces données comprennent :

- a. L'assemblage en « contigs » des brins « sens » et « antisens » de chaque séquence, en fonction des mesures de qualités de séquences fournies par les fichiers de sortie MiSeq.
 - b. L'assignation de chaque séquence à son échantillon d'origine (« démultiplexage »). Cette assignation se base à la fois sur les amorces utilisées, et sur une combinaison de 25 « Tags » différents de 8 pb qui avaient été au préalable ajoutés en 5' des amorces.
 - c. Enlever toutes ces séquences d'amorces et de Tags, pour ne conserver que celles des gènes marqueurs
 - d. Regrouper (et dénombrer) toutes les séquences identiques en contigs, pour alléger les analyses suivantes
 - e. Aligner et regrouper les séquences similaires (>97%) en **OTU (Operational Taxonomic Unit)**, pour travailler à l'échelle du Genre (ou de la Famille).
 - f. Supprimer les séquences résultants d'erreurs de PCR/séquençages (séquences uniques, chimères, ...)
 - g. Affiliation taxonomique : identifier les taxons en alignant chaque OTU contre des bases de données de références spécifiques à chaque gène (en accès libre : GreenGenes, RDP, ou Silva (16S, 18S) ; Unite (ITS) ...ou à construire soi-même (*dnaK*)).
 - h. Obtenir un tableau de sortie recensant les abondances et distributions observées pour chaque OTU au sein des échantillons.
7. **Analyses statistiques.** Comparaison de l'abondance et la richesse taxonomique des microorganismes présents dans les sols et racines des Astragales entre différentes parcelles, selon un gradient de pollution multi-métallique et d'exposition aux embruns. A l'aide du logiciel Primer-E (*Plymouth Marine Laboratory*), ces analyses **multivariées** visent à corréler des changements de la structure des communautés microbiennes telluriques (sols) et symbiotiques (racines), avec la variation des facteurs environnementaux.

4. Résultats

1. Analyse des teneurs en phytométabolites par mesure non-destructive

Les résultats ont été analysés statistiquement (JMP 10 statistical software (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA) avec le test non paramétrique de Wilcoxon) au niveau de l'hétérogénéité intra-individuelle, entre individus d'un même site et entre les 4 sites.

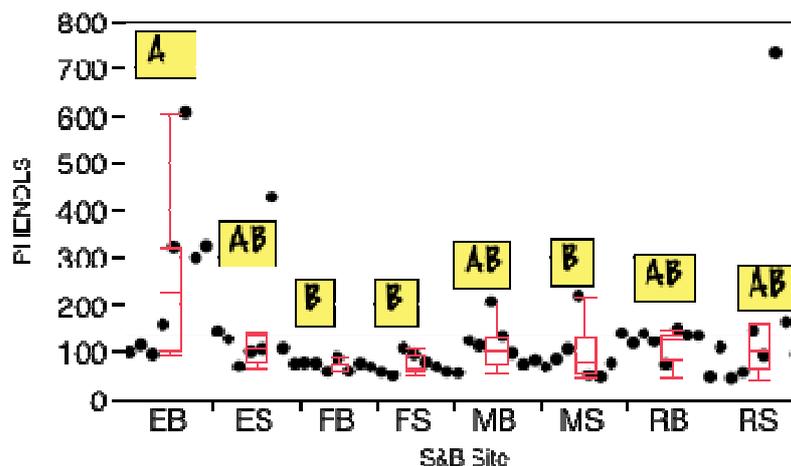


Figure 2. Indice Multiplex PHENOLS présenté sous forme de boîtes à moustache et de points individuels. E :Escalette, F : Frioul, M : Maronaise, R : Mont Rose, B :Brulé, S : Sain . Les mesures sont réparties sur l'ensemble de la portion saine des anémomorphoses d'*Astragalus tragacantha*. N=8 individus/sous population ,1 point=moyenne de 25 mesures/individu. Les moyennes représentées par la même lettre ne sont pas significativement différents

Le paramètre le plus discriminant est l'indice Multiplex PHENOLS (Figure 2), qui reflète les variations relatives de l'ensemble des composés solubles et fixés (acides hydroxy-cinnamiques) (Cerovic et al. 2008; Agatti et al. 2011). On observe une grande hétérogénéité intra individuelle et entre individus, variable entre les sites : les deux sous-groupes d'individus du Frioul présentent le moins d'hétérogénéité, tandis que la plus grande hétérogénéité est trouvée sur le sous-groupe de l'Escalette «nécrosé». De plus sa moyenne est significativement différent des sous-groupes du Frioul et du groupe sain de la Maronaise. La plus forte variabilité sur sols pollués que sur sol moins pollué a déjà précédemment été observée chez d'autres espèces végétales et peut être le reflet des réponses de la plante à des stress abiotiques ; ou encore de la grande disparité des taux de pollution mesurés intra-site.

Afin de mieux comprendre cette hétérogénéité un contrôle a été effectué sur les trois stades phénologiques (âge physiologique) des organes : Juvénile non lignifié, Adulte lignifié et Nécrosé (mort ou sénescant) (*prélèvements conservés de Pierre-Jean Dumas, 2008*) (Figure 3).

L'indice Phénols résulte du rapport des fluorescences dans les bandes du Bleu et de l'infrarouge proche pour une excitation ultraviolette. Dans le cas des rachis foliaires (se transformant en épine) de feuilles nécrosées, du fait de la faible présence de pigmentation chlorophyllienne et de l'augmentation de la fluorescence Bleue, l'indice PHENOLS augmente fortement.

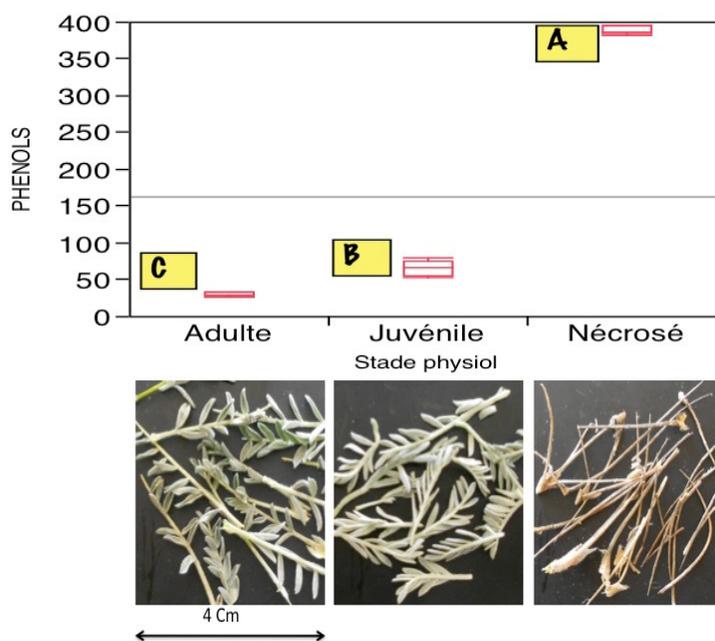


Figure 3 Indice Multiplex PHENOLS sur 20 organes excisés de la Maronaise (échantillon 17, N=5) au stade Juvénile, Adulte, ou Nécrosé.

Ainsi les hétérogénéités mesurées correspondent à deux types de répartition des nécroses observés visuellement :

- 1) Soit la nécrose est limitée à la portion de l'individu directement exposée aux embruns, la portion « saine » restant vivante de manière homogène (Fig.1, RB5)
- 2) Soit la prédominance de rachis foliaires de feuilles nécrosées s'étend de manière hétérogène au reste de la plante (Fig.1, FB6)

Le deuxième comportement a été particulièrement observé dans la population soumise aux pollutions de l'Escalette avec plomb et arsenic prédominants.

Cette approche de mesures non-destructives mérite donc d'être poursuivie en affinant la distinction entre zones saines et zones nécrosées et en établissant des indices représentatifs des proportions de feuilles juvéniles, feuilles adultes et rachis épineux ayant perdu les folioles.

2. Observation des symbioses racinaires fongiques

Les observations cytologiques des fragments de racines colorés ont permis de mettre en évidence une forte colonisation par des espèces fongiques endomycorhiziennes, formant des réseaux de mycelium non septé, de nombreuses vésicules et des arbuscules (Figure 4).

Le nombre de fragments observés n'est pas suffisant pour un traitement statistique des données en comparant les sites entre eux, mais ces observations permettent d'attester d'une bonne fonctionnalité de la symbiose *in situ*.

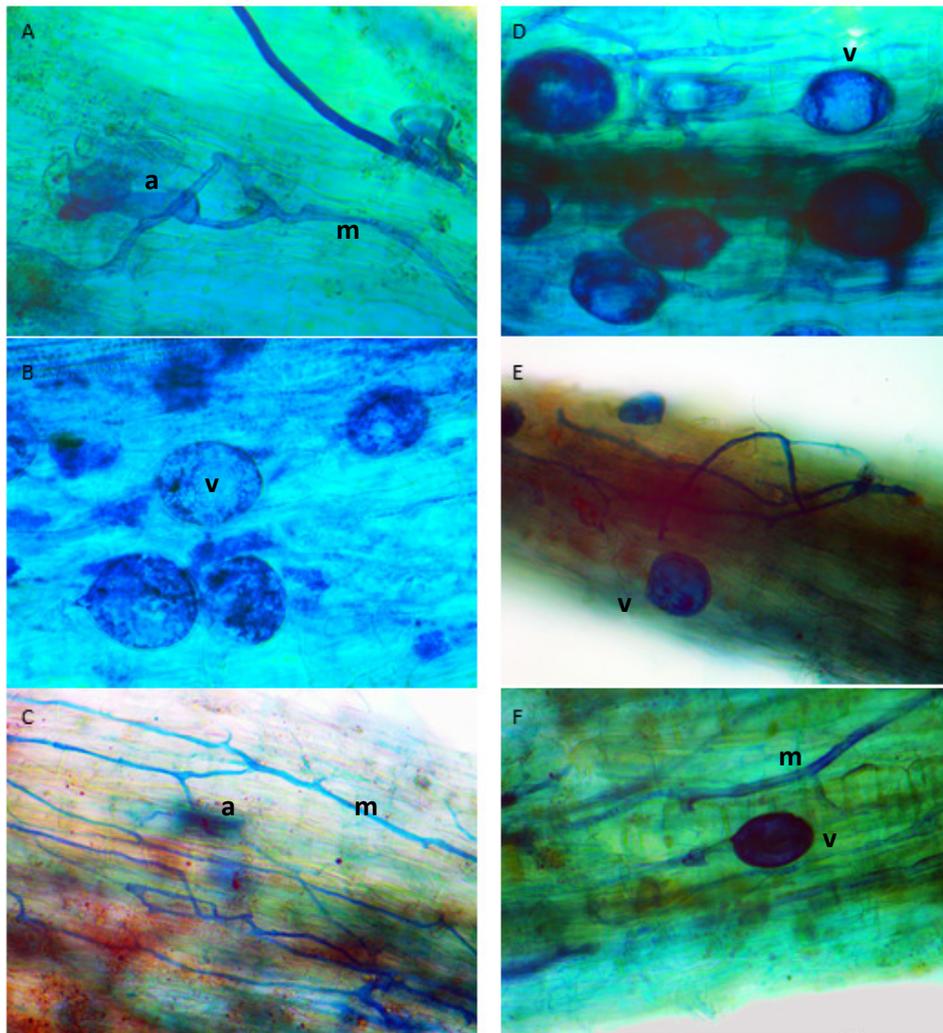


Figure 4. Structures fongiques présentes dans les racines d'Astragales avec des vésicules (v), du mycélium(m) et des arbuscules (a) ; A, B, D,F racines d'individus sains du Mont Rose ; C, E: racines d'individus nécrosés du Frioul.

D'autres structures fongiques ont pu être observées : il s'agit d'endophytes septés foncés (DSE) comme présentés dans la figure 5 :

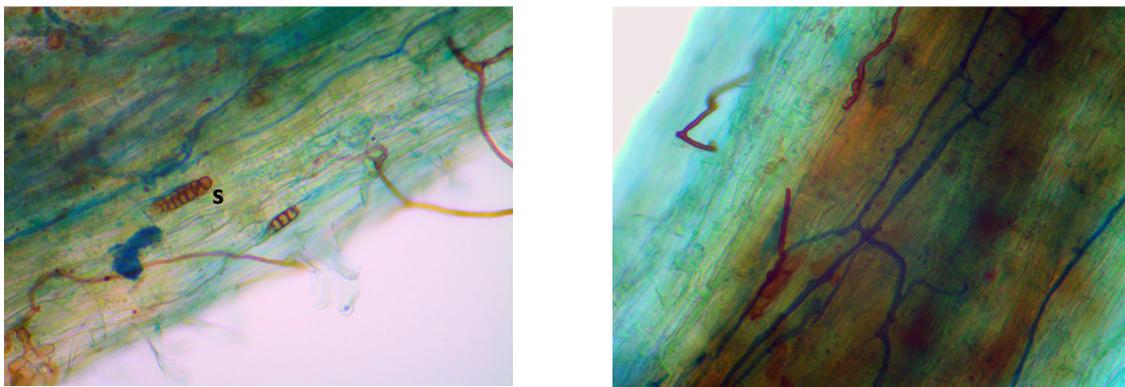


Figure 5. Présence concomitante de structures endomycorhiziennes (en bleu) et de mycélium septé de DSE (en marron) avec des sclérotés (s) (racines du Frioul, individu nécrosé à gauche et sain à droite).

Il est ainsi intéressant de noter que les deux types de champignons endophytes (DSE et endomycorhizes) peuvent être concomitants dans les systèmes racinaires des Astragales.

3. Analyses bioinformatiques des séquences « code-barres ».

Le séquençage haut débit des 4 gènes marqueurs des communautés microbiennes a fourni plus de 26 millions de séquences à analyser (cf « Méthodologie »). Nous avons prévu d'utiliser les scripts « OBITools » (<http://www.grenoble.prabi.fr/trac/OBITools>) afin de traiter ces données et en obtenir l'identification phylogénétique, mais nous sommes retrouvés confrontés à des problèmes d'incompatibilité de version Python installée sur les clusters de calculs du serveur de l'OSU Pythéas. Celui-ci ayant été mis à jour en janvier 2014, nos analyses ont pris du retard par rapport à notre planning initial.

Afin d'y remédier, d'autres programmes ont été testés. Nous avons ainsi utilisé « Mothur » (<http://www.mothur.org/>), relativement intuitif à utiliser, mais malheureusement moins performant au niveau de sa rapidité d'exécution, et des fonctions disponibles (notamment en terme de traitement des données multiplexées). Pour l'instant, seules les données générées pour le gène marqueur 16S ont donc pu être traitées. Pour les trois autres gènes marqueurs, nous essaierons de nouveau l'utilisation du script « OBITools » à implémenter sur le serveur Pythéas (ce qui nécessitera encore plusieurs semaines d'analyses).

4. Analyses statistiques multivariées – résultats obtenus pour le gène marqueur 16S

Les différentes étapes d'analyses bioinformatiques permettant de filtrer les données de séquençage ont abouti à l'identification de 3 millions de séquences 16S, réparties en 64 000 OTU sur l'ensemble des 128 prélèvements. Les analyses multivariées réalisées sous Primer-E afin de rechercher quels paramètres environnementaux structuraient au mieux ces communautés microbiennes ont mis en évidence :

- aucune différence significative en ce qui concerne la santé des plantes mesurées au multiplex (*non montré*) : les données obtenues à partir des plantes « saines » et « brûlées » par les embruns ont donc été regroupées.
- une structuration nette des communautés bactériennes en fonction de leurs prélèvements d'origine : sol ou racine (Figure 6A) ; phénomène connu sous le nom « d'**effet rhizosphère** » (Buée et al, 2009).

Par contre, lorsque l'on sépare les données récoltées à partir des racines, ou des sols (Figure 6B), deux profils se distinguent. On observe ainsi une **nette structuration des communautés bactériennes telluriques, principalement en fonction du degré de pollution des sols** (en rouge pour l'Escalette, *PCO de gauche*). En ce qui concerne les communautés rhizosphériques (Figure 6B, *à droite*), cette structuration est moins nette. Il apparaît ainsi que c'est avant tout la colonisation des racines d'Astragales qui exerce un filtre sur ces communautés ; l'effet de site étant dans ce cas plus secondaire. La figure 6B montre néanmoins que les communautés symbiotiques de l'Escalette sont différentes des communautés symbiotiques de la Maronaise ou du Frioul avec celles du Mont Rose en position intermédiaire. Donc un gradient continu de différenciation des communautés semble apparaître en corrélation avec la pollution. Cette tendance devra être approfondie avec des analyses discriminantes visant à identifier les taxons microbiens indicateurs.

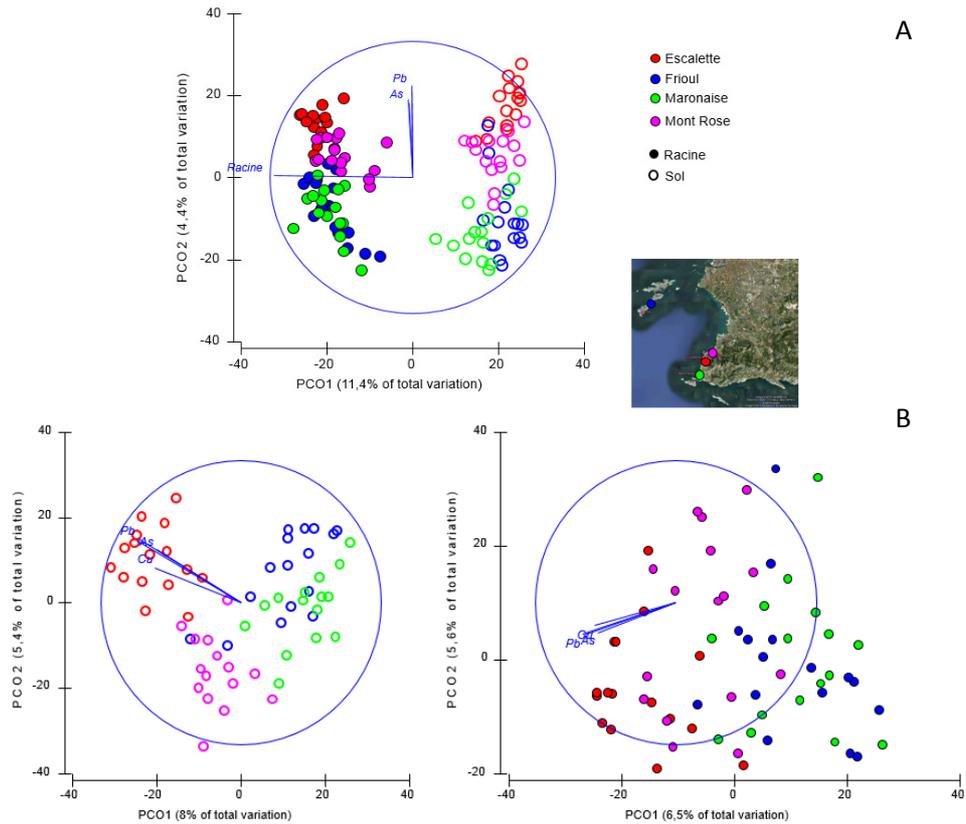


Figure 6. Ressemblance entre communautés microbiennes en fonction de leur échantillon de provenance, et du taux de pollution métallique

5. Assignations phylogénétiques des OTU - marqueur 16S

Les séquences des 64 000 OTU obtenues ont été alignées à la base de données de référence Silva (<http://www.arb-silva.de/>) afin d'en identifier les taxons. Par mesure de simplification, ces groupes taxonomiques ont été regroupés au niveau de leur (sous)classe (Figure 7) :

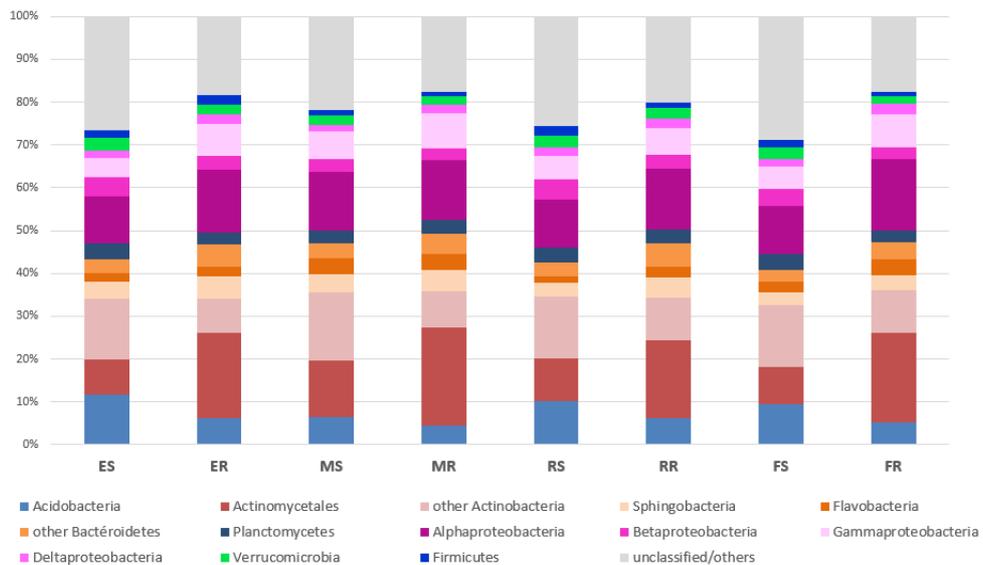


Figure 7. Principales divisions bactériennes (marqueur 16S) colonisant les sols (S) ou racines d'Astragale (R) pour chacun des 4 sites

Plusieurs résultats surprenants ressortent de cette classification :

- Un pourcentage non négligeable de séquences n'a pu être identifié (*en gris*), particulièrement en ce qui concerne les prélèvements de sols : ce résultat confirme la connaissance encore très partielle que nous possédons sur la diversité des microorganismes, et notamment de la microflore tellurique (Janssen 2006). En effet, les données récoltées jusqu'à présent étaient essentiellement basées sur la microflore cultivable, qui ne représente en réalité qu'un faible pourcentage de la microflore totale (Buée et al., 2009)
- Au niveau symbiotique, les rhizobia (alpha-proteobactéries) les plus abondantes colonisant les racines d'*Astragalus tragacatha* appartiennent à l'espèce *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110 (*non montré*), qui est connu pour être un symbiote du soja. Ce résultat est assez inattendu, sachant que plusieurs études préalablement publiées sur différentes espèces d'*Astragalus* (mais n'incluant pas *A. tragacantha*) ont majoritairement isolé des bactéries du genre *Rhizobium* et *Mezorhizobium* (Wei et al., 2008).
- Mais surtout, de nombreuses Actinobactéries sont fortement enrichies au niveau racinaire (Actinomycetales, *en rouge sur le graphique*). D'après la base de données NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), certaines de ces OTU seraient potentiellement endophytes, et coloniseraient préférentiellement des sols contaminés par des métaux ou hydrocarbures (*données de métagénomiques malheureusement non publiées*).

Ces résultats ouvrent alors de nouvelles perspectives et pistes de recherche sur le rôle des microorganismes associés aux racines, dans la polluo-tolérance d'*A. tragacantha*.

5. Discussion

Indicateurs de l'état sanitaire des plantes.

Un des paradigmes de la physiologie végétale est que les stress environnementaux stimulent la production d'éthylène, qui lui-même accélère la sénescence des feuilles (Taiz 2006). De ce fait les multiples stress environnementaux accélèrent la chute des folioles et la formation de tissus lignifiés, en particulier les épines. Qu'en est-il pour les Astragales ? Parmi les métabolites suivis à l'aide du Multiplex, seul l'indice Phénols a permis de différencier des états physiologiques: les teneurs en phénols étaient significativement supérieures pour les Astragales nécrosées de l'Escalette comparées à celles des Astragales nécrosées et saines du Frioul et les individus sains de la Maronaise. Cependant, pour chaque site pris indépendamment, il n'y a pas eu de différence significative entre les teneurs en phénols des individus sains et ceux nécrosés. Ceci peut s'expliquer par le fait que les rameaux qui ont été pris en compte dans les mesures sur les individus brûlés par les embruns sont des rameaux sains (sans nécrose), et que les perturbations métaboliques des rameaux nécrosés peuvent ne pas affecter la composition en phytométabolites des rameaux non-nécrosés chez un même individu. Ceci est notamment visible pour les sites du Frioul, de la Maronaise et du Mont Rose.

Par contre, pour le site de l'Escalette, les données très dispersées observées chez les individus nécrosés peuvent être dues à une moindre séparation des zones nécrosées et des zones saines sur un même individu ; faisant que les mesures ont pu être réalisées sur des échantillons présentant une présence hétérogène de rachis épineux entraînant alors une augmentation des teneurs en phénols. Ce résultat pourrait être le reflet de l'effet conjugué des fortes pollutions du sol (par rapport aux autres sites), des embruns pollués et d'un plus fort piétinement vu l'accessibilité du site.

Influence des paramètres environnementaux sur la structuration des communautés bactériennes : Réponse des communautés telluriques à la pollution.

De nombreuses études ont démontré l'impact négatif de la pollution en ETMM sur la diversité des communautés microbiennes : aux plus fortes teneurs en polluants, la diversité des microorganismes est nettement affectée, au détriment des OTU les plus résistants qui deviennent alors majoritaires (Qu et al., 2011). Cela peut résulter en un appauvrissement des activités enzymatiques, et donc du fonctionnement global de l'écosystème.

Dans cette étude, nous avons observé une nette structuration des communautés bactériennes des sols mycosphériques selon un gradient de pollution métallique (Figure 6), même si on ne peut exclure que d'autres facteurs environnementaux sont potentiellement impliqués eux-aussi (Chodak et al., 2013). Par contre, aucun appauvrissement de diversité du marqueur 16S n'a été détecté (*non montré*), suggérant que les taux de pollution des sites n'ont pas atteint de seuils critiques risquant d'impacter la biodiversité. Cette observation est d'ailleurs corroborée par le fait que l'Astragale est elle-même tolérante à cette pollution et continue à être observée sur le site de l'Escalette notamment.

Gardons cependant à l'esprit l'état provisoire et encore incomplet de nos analyses qui ne concernent ici qu'un seul marqueur (16S). Une autre limite de cette étude réside dans le fait que le gène marqueur étudié (16S) n'est pas suffisamment discriminant pour identifier les taxons bactériens au niveau de l'espèce (ceux-ci sont au mieux identifiés au niveau du Genre). Or, des différences importantes de colonisation de niche peuvent être observées pour différentes souches de la même espèce bactérienne : il serait alors intéressant d'approfondir ces résultats en utilisant un (ou plusieurs) autre gènes marqueur complémentaire, permettant ainsi d'avoir des données plus précises en termes de richesse (sous)-spécifique.

Identification de taxons microbiens indicateurs parmi les communautés racinaires.

La rhizosphère est définie comme la zone de sol influencée par le métabolisme racinaire des plantes. Elle est caractérisée par une forte activité microbienne, qui joue un rôle important dans la nutrition et la santé des plantes. Les racines sont colonisées par une microflore distincte de celle du sol (« **effet rhizosphère** »), mais sa composition reste fortement influencée par les facteurs environnementaux (Schlaeppli et al., 2014). Il est généralement admis qu'un stress exercé sur les plantes conduit à une modification de la composition en molécules des exsudats racinaires, et donc des communautés microbiennes associées (Bais et al, 2006). Pourtant, de même que pour les mesures au Multiplex, les analyses des barcodes génétiques bactériens n'ont montré aucune différence réellement significative entre les individus sains d'Astragale et ceux du même site présentant des nécroses importantes. Là encore, une interprétation possible serait que, sachant que les phryganes sont déjà continuellement soumises à de nombreux stress environnementaux (vents violents, salinité et xéricité extrêmes, ...), il est probable que des stress additionnels tels qu'une pollution organique modérée des embruns, ou des sols en ETMM, n'induisent pas de synthèse significativement plus importante en composés de réponses aux stress.

Par contre, nous avons pu observer que cette structuration des communautés bactériennes est très nette en fonction des prélèvements réalisés au niveau du sol ou des racines (Figure 6A) : à partir des communautés bactériennes telluriques, il y a enrichissement, au contact de la plante des OTU adaptées à la colonisation des racines. Ceci explique que l'effet de la pollution en ETMM soit plus net pour les communautés telluriques que racinaires, même s'il reste en partie visible pour ces dernières. La plante exerce en effet un filtre à partir de la microflore tellurique à proximité, qui a pour effet de tamponner les résultats de structuration des communautés observés pour la microflore tellurique (Figure 6B).

La détermination des communautés bactériennes dominantes de la rhizosphère a longtemps reposé sur des dénombrements indirects, basés sur notre capacité à cultiver ces microorganismes. Les récentes analyses de communautés par séquençage à haut débit ont cependant révélé que ces données étaient en partie erronées, car seul un faible pourcentage de microorganismes est effectivement cultivable en laboratoire. On sait désormais que les OTU les plus abondants de la rhizosphère appartiennent aux Protéobactéries, suivies des Actinobactéries et Acidobactéries (en proportion variables selon les plantes et sites étudiés ; Buée et al., 2009) ; données qui sont en adéquation avec les résultats que nous avons obtenus (Figure 7).

Chez les **Protéobactéries**, le groupe le plus abondamment représenté concerne généralement, les alpha-protéobactéries, auxquelles appartiennent les rhizobia, symbiotiques des Fabacées. Même si nous n'avons pas travaillé à partir de nodules isolés (très difficiles à obtenir sur une plante adulte *in situ*), nos analyses ont détecté que plus de 50% des OTU d'alpha-protéobactéries obtenues à partir des extraits de racines appartiennent à la famille des **Rhizobiales** (*non montré*) : celles-ci sont donc largement enrichies par rapport aux extraits de sols, confirmant leur importance dans la rhizosphère des légumineuses. Si certaines rhizobia appartenant au genre *Rhizobium* ont bien été détectées parmi les genres les plus fortement enrichis au niveau des racines, l'OTU la plus abondante détectée appartient au genre *Bradyrhizobium*. Ce résultat est inattendu car il ne va pas dans le sens des recherches précédemment effectuées sur d'autres espèces d'Astragales (Wei et al., 2008), appuyant l'idée qu'il est très difficile de généraliser les résultats obtenus sur des organismes modèles. Dans tous les cas, il sera intéressant de mieux préciser la richesse spécifique des rhizobia en se basant sur les analyses du gène marqueur *dnaK* : là aussi, des différences significatives de comportements symbiotiques et de tolérance à la pollution peuvent être observées entre des souches très proches de la même espèce.

En ce qui concerne les extraits de sols, un enrichissement en alpha-protéobactéries appartenant à la famille des Sphingomonadales a été observé (*non montré*). La présence de bactéries du genre *Sphingomonas* a été détectée par Vina et al. (2005) parmi les communautés dominantes de bactéries impliquées dans la bioremédiation de sols contaminés aux HAP. Ce résultat pourrait alors indiquer que les sols étudiés sont également contaminés aux hydrocarbures, ce qui ouvre une nouvelle piste à explorer quant aux facteurs environnementaux impliqués dans la structuration des communautés bactériennes.

Enfin, la Figure 7 montre que de nombreuses bactéries de la famille des **Actinomycétales** sont très fortement enrichies au niveau des racines des Astragales, jusqu'à atteindre près de 20% de l'ensemble des OTU identifiées. Ceci suggère alors que ce groupe de bactéries filamenteuses est également très important pour le fonctionnement de l'écosystème de la rhizosphère, et pourrait lui aussi être lié à la santé et fitness des plantes. Les travaux de Zhu et al. (2013) ont également identifié les Actinobactéries comme bactéries communes et abondantes dans la rhizosphère du soja. La famille des Actinomycétales est réputée pour sa très large gamme de capacités métaboliques, incluant la synthèse d'une grande diversité de molécules antimicrobiennes ; ce qui leur confère des potentialités en lutte biologique contre les pathogènes racinaires (Zhu et al., 2013). D'autres études ont montré leur implication non seulement dans la protection contre les maladies, mais également pour améliorer la tolérance des plantes aux stress abiotiques (tels que le sel), voire stimuler directement leur croissance (Palaniyandi et al., 2013). Enfin, les travaux d'Oller et al. (2013) ont mis en évidence une Actinomycétale parmi les bactéries les plus résistantes à l'arsenic, ainsi que sa capacité à piéger et accumuler le métalloïde.

La forte proportion d'Actinobactéries rhizosphériques que nous avons détectée ouvre donc de nombreuses perspectives de recherche dans leur rôle sur la santé des Astragales, ainsi que leur tolérance aux stress abiotiques et à la pollution. Une des limites à l'étude de leur rôle dans l'écosystème pourrait cependant être liée à la difficulté potentielle de les cultiver au laboratoire.

Conclusion

Les études sur les microorganismes édaphiques du littoral méditerranéen sont rares et leur diversité largement méconnue. Ce travail a ainsi eu pour but d'enrichir nos connaissances sur une biodiversité discrète mais indispensable au fonctionnement des écosystèmes.

Les premiers résultats présentés dans ce rapport sont très prometteurs, car même si pour l'instant un seul marqueur génétique (16S) a pu être étudié en profondeur, nos analyses ont déjà mis en évidence plusieurs indicateurs potentiellement intéressants à approfondir ; ouvrant de nombreuses perspectives de recherche. Les étapes suivantes consisteront à :

- Déterminer si les profils observés pour les bactéries sont extrapolables aux communautés fongiques ; ou si celles-ci répondent différemment aux facteurs environnementaux
- Affiner l'identification (sous)-spécifique des symbiotes racinaires (bactériens et fongiques) à l'aide des marqueurs *dnaK* et 18S, respectivement ; puis déterminer si une structuration plus fine des communautés est alors mise en évidence et si elle peut être corrélée à la pollution et l'état de santé des plantes.
- Dans un 2^e temps, une étude détaillée des gènes fonctionnels impliqués dans la symbiose (*nod*) des souches les plus intéressantes ; ou l'étude de leur tolérance/résistance à la pollution (ETMM, HAP, ...) pourra également être envisagée.

A terme, cela permettra de détecter les symbiotes (ou endophytes) potentiellement les plus intéressants à utiliser dans un objectif de restauration écologiques/ renforcement des populations d'Astragales, ainsi que de phytostabilisation de la pollution.

Remerciements

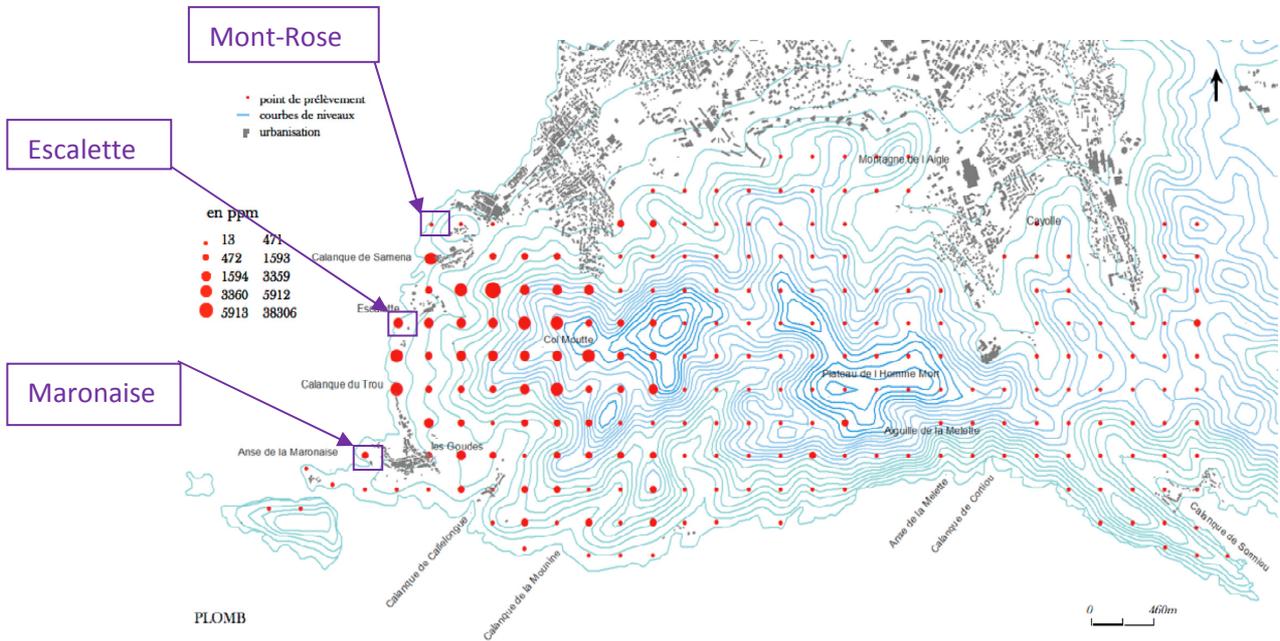
Les auteurs tiennent à remercier Lidwine Le Mire-Pécheux (Chargée de mission scientifique, PNCaI) et Pascal Grebet (DDTM 13/SE/PB) pour leurs aide et conseils dans le montage du dossier de demande de dérogation à la collecte de spécimens de plantes protégées. Un grand merci également à Florence Devic et Pauline Scibek, étudiantes en L3 ECOPE pour leur aide technique dans la préparation des racines et leur coloration.

Références

- Agati G., Cerovic Z.G., Pinelli P., Tattini M. 2011. Light-induced accumulation of ortho-dihydroxylated flavonoids as non-destructively monitored by chlorophyll fluorescence excitation techniques. *Environ Exp Bot.* 73: 3-9.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol.* 57:233-66.
- Bellemain, E., Carlsen T., Brochmann C., Coissac E., Taberlet P., Kauserud H. 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an *in silico* approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology* 10:189.
- Buée M., De Boer W., Martin F., van Overbeek L., Jurkevitch E. 2009. The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant Soil* 321:189–212.
- Cerovic Z.G., Moise N., Agat, G., Latouche G., Ben Ghazlen N., Meyer, S. 2008. New portable optical sensors for the assessment of winegrape phenolic maturity based on berry fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis.* 21: 650-654.
- Chodak, M., M. Golebiewski, J. Morawska-Ploskonka, K. Kuduk, M. Niklinska. 2013. Diversity of microorganisms from forest soils differently polluted with heavy metals. *Applied Soil Ecology* 64: 7-14.
- Dumas P-J. Vulnérabilité écologique des phryganes littorales méditerranéennes. Université Aix-Marseille (*en préparation*).
- Gamalero, E., G. Lingua, G. Berta, B. R. Glick. 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
- Gardes, M. and T. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2:113 - 118.
- Gottel N.R., Castro H.F., Kerley M., Yang Z., Pelletier D.A., Podar M., Karpinets T., Uberbacher E., Tuskan G.A., Vilgalys R., Doktycz M.J., Schadt C.W. 2011 Distinct microbial communities within the endosphere and rhizosphere of *Populus deltoides* roots across contrasting soil types. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 : 5934-5944
- InVS-DRASS. 2005. Synthèse de l'évaluation des risques sanitaires relative à la contamination environnementale du littoral sud de Marseille (Montredon – Callelongue).
- Janssen PH. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol.* 72(3): 1719-28.
- Kidd P., Barceló J., Pilar Bernal M., Navari-Izzo F., Poschenrieder C., Shilev S., Clemente R., Monterroso C. 2009. Trace element behaviour at the root-soil interface: implications in phytoremediation. *Environ. Exp. Bot.* 67: 243-259
- Krüger, M., C. Krüger, C. Walker, H. Stockinger, A. Schüssler. 2012. Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytol.* 193:970-984
- Kumar S., Carlsen T., Mevik B.H., Enger P., Blaaid R., Shalchian-Tabrizi K., Kauserud H. 2011. CLOTU: an online pipeline for processing and clustering of 454 amplicon reads into OTUs followed by taxonomic annotation. *BMC Bioinformatics* 12:182
- Laffont-Schwob I., Dumas P.J., Pricop A., Rabier J., Miché L., Affre L., Masotti V., Prudent P., Tatoni T. 2011. Insights on metal-tolerance and symbionts of the rare species *Astragalus tragacantha* aiming at phytostabilization of polluted soils and plant conservation. *Ecologia Mediterranea* 37(2): 57-62.

- Lumini, E., A. Orgiazzi, R. Borriello, P. Bonfante, and V. Bianciotto. 2010. Disclosing arbuscular mycorrhizal fungal biodiversity in soil through a land-use gradient using a pyrosequencing approach. *Environ Microbiol* 12:2165-2179.
- Manter DK, Delgado JA, Holm DG, Stong RA. 2010. Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots. *Microbial Ecol.* 60:157–166
- Médail, F. and P. Quézel. 1999. Biodiversity hotspots in the mediterranean basin: setting global conservation priorities. *Conserv. Biol.* 13: 1510-1513.
- Oller, A. L. W., M. A. Talano, and E. Agostini. 2013. Screening of plant growth-promoting traits in arsenic-resistant bacteria isolated from the rhizosphere of soybean plants from Argentinean agricultural soil. *Plant and Soil* 369: 93-102.
- Palaniyandi, S. A., S. H. Yang, L. X. Zhang, and J. W. Suh. 2013. Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 9621-9636.
- Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. *Annu Rev Plant Biol* 56:15-39
- Sato, K., Suyama, Y., Saito, M., Sugawara, K. 2005. A new primer for discrimination of arbuscular mycorrhizal fungi with polymerase chain reaction-denature gradient gel electrophoresis. *Grassl Sci* 51: 179–181
- Qu, J. J., G. M. Ren, B. Chen, J. H. Fan, Y. E. 2011. Effects of lead and zinc mining contamination on bacterial community diversity and enzyme activities of vicinal cropland. *Environ Monitoring Assessment* 182: 597-606.
- Schlaeppli, K., N. Dombrowski, R. G. Oter, E. V. L. van Themaat, and P. Schulze-Lefert. 2014. Quantitative divergence of the bacterial root microbiota in *Arabidopsis thaliana* relatives. *PNAS USA* 111: 585-592.
- Stepkowski, T., Czaplinska M., Miedzinska K., Moulin L. 2003. The variable part of the *dnaK* gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related alpha Proteobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 26:483-494.
- Taiz L., and Zeiger E. 2002. *Plant physiology* (3rd Ed.). Sinauer associates, pp. 574,581.
- Vasileiadis, S., E. Puglisi, M. Arena, F. Cappa, P. S. Cocconcelli, M. Trevisan. 2012. Soil bacterial diversity screening using single 16S rRNA gene V regions coupled with multi-million read generating sequencing technologies. *PLoS One* 7:e42671.
- Vinas, M., J. Sabate, M. J. Espuny, A. M. Solanas. 2005. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. *Appl Environ Microbiol* 71: 7008-7018.
- Wei G.H., Zhang Z.X., Chen C., Cen W.M., J W.T., 2008. Phenotypic and genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of the legume genera *Astragalus*, *Lespedeza* and *Hedysarum* in Northwestern China, *Microbiol Res* 163: 651-662.
- Yu, L., Nicolaisen M., Larsen J., Ravnskov S. 2012. Molecular characterization of root-associated fungal communities in relation to health status of *Pisum sativum* using barcoded pyrosequencing. *Plant Soil* 357:395-405
- Zhu, Y. B., J. Q. Tian, F. Y. Shi, L. Su, K. K. Liu, M. C. Xiang, and X. Z. Liu. 2013. Rhizosphere bacterial communities associated with healthy and Heterodera glycines-infected soybean roots. *Europ J Soil Biol* 58: 32-37.

Annexe 1



Cartographie de la pollution au plomb mesurée dans le massif de Marseilleveyre
(collectif du projet ANR-CESA-018 Marséco 2008 – 2012, non publié)

(Les taux mesurés dans les îles de l'archipel du Frioul sont en dessous du seuil de détection)



Cartographie des quatre sites de prélèvements retenus
(cartes IGN au 1/25000^e)

Annexe 2



PREFET DES BOUCHES-DU-RHONE

DIRECTION DÉPARTEMENTALE DES TERRITOIRES
ET DE LA MER DES BOUCHES-DU-RHÔNE
SERVICE DE L'ENVIRONNEMENT
Pôle biodiversité - Chasse

Arrêté préfectoral n°2013 148-0001 du 28/05/2013 portant autorisation pour l'Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie, à titre dérogatoire à l'article L411-1 du Code de l'Environnement, de prélever des échantillons de racines d'Astragale de Marseille (*Astragalus tragacantha* L.) sur spécimens vivants, sur le territoire du Parc National des Calanques, en cœur de parc, dans le cadre d'un programme de recherche scientifique sur l'impact de la pollution sur la diversité des micro-organismes symbiotiques, pour l'année 2013.

Le Préfet
de la Région Provence - Alpes - Côte - d'Azur
Préfet des Bouches-du-Rhône,
Officier de la Légion d'honneur,
Officier de l'Ordre national du mérite

- Vu** le Code de l'Environnement, articles L.411-1, L.411-2, R.411-1 à 14,
- Vu** le décret ministériel n° 2004-374 du 29 avril 2004 relatif aux pouvoirs des Préfets, à l'organisation et à l'action des services de l'État dans les régions et départements,
- Vu** l'arrêté ministériel du 19 février 2007, fixant les conditions de demande d'instruction des dérogations définies au 4^{ème} alinéa de l'article L.411-2 du Code de l'Environnement portant sur les espèces de faune et flore ainsi que les habitats à protéger,
- Vu** l'arrêté ministériel du 20 janvier 1982 modifié par arrêté du 31 août 1995, fixant la liste des espèces végétales protégées sur l'ensemble du territoire et les modalités de leur protection, notamment son annexe II,
- Vu** la demande en date du 25 février 2013 de l'Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale, ci-après dénommé l'IMBE, sous la signature de Madame Lucie MICHÉ, Docteur en écologie microbienne, maître de conférences à la faculté de Saint-Jérôme, Aix-Marseille-Université,

- Vu** l'avis favorable, sous conditions, du Conseil National de la Protection de la Nature, ci-après dénommé le CNPN, en date du 6 mai 2013,
- Vu** l'arrêté préfectoral n° 2013 084-0002 du 25 mars 2013 portant délégation de signature à Monsieur Gilles SERVANTON, directeur départemental interministériel des territoires et de la mer des Bouches-du-Rhône,
- Vu** l'arrêté préfectoral n° 2013 137-0001 du 17 mai 2013 portant délégation de signature aux agents de la Direction Départementale des Territoires et de la Mer des Bouches-du-Rhône, ci-après dénommée la DDTM 13,
- Vu** l'avis conforme, avec prescriptions, du Directeur par intérim de l'établissement public du Parc National des Calanques, émis le 22 mars 2013,
- Considérant** parmi les milieux méditerranéens côtiers l'originalité et l'importance écologiques des espaces provençaux d'implantation de l'Astragale de Marseille (*Astragalus tragacantha L.*) situés en grande partie sur d'anciennes friches de l'industrie chimique et métallurgique du sud marseillais aujourd'hui gravement polluées et incluses dans le cœur du Parc National des Calanques s'inscrivant quant à lui dans une zone climatique subdésertique conférant au milieu naturel des conditions écologiques édaphiques et climatiques particulièrement rudes occasionnées par un déficit hydrique prononcé, une forte xéricité et des vents violents et fréquents, aggravées du fait des apports salés des embruns refoulant sur le continent les polluants issus des complexes chimiques continentaux déversés en mer par les vents du nord,
- Considérant** l'importance des enjeux biologiques et écologiques portés par la recherche scientifique menée par les services de l'Etat sur ces territoires aux conditions écologiques extrêmes d'origine naturelle et anthropique, dans un contexte général d'érosion de la biodiversité.
- Sur proposition** du Directeur Départemental des Territoires et de la Mer des Bouches-du-Rhône,

ARRÊTE :

Article 1er, objectifs :

Le présent arrêté fixe les conditions et limites de dérogation à l'interdiction d'intervention sur l'espèce protégée qu'est l'Astragale de Marseille (*Astragalus tragacantha L.*), en vue de la réalisation d'un programme d'étude scientifique pour l'étude de l'impact de la pollution sur la biodiversité symbiotique racinaire s'appuyant sur des prélèvements de racine de cette espèce.

Article 2, personnels mandatés pour intervenir sur l'Astragale de Marseille :

Les personnes dont les noms et qualités suivent sont seules habilitées à procéder aux prélèvements, voire à participer aux processus concernant in situ ces prélèvements :

1. Lucie MICHÉ, Docteur en écologie microbienne, maître de conférence (MDC) à Aix-Marseille Université, responsable du programme de recherche faisant l'objet de la présente autorisation,
2. Alex BAUMEL, Dr en sciences, maître de conférence à Aix-Marseille Université,
3. Pascal MIRLEAU, Dr en sciences, MDC à Aix-Marseille Université,
4. Jacques RABIER, Dr en sciences, MDC à Aix-Marseille Université,
5. Isabelle LAFFONT-SCHWOB Dr en sciences, MDC à Aix-Marseille Université,
6. Laurence AFFRE, Dr en sciences, MDC à Aix-Marseille Université,
7. Vincent DUBUT, ingénieur de recherche à Aix-Marseille Université
8. Lidwine LE-MIRE-PECHEUX, chargée de mission scientifique au Parc National des Calanques.

Agissant dans le cadre de leur mission de recherche telle que présentée à l'article 1 du présent arrêté, ces personnes sont tenues de porter sur eux la présente autorisation en vue de les présenter à toute réquisition des services de police ou de gendarmerie.

Article 3, champs d'application :

Le présent arrêté s'applique uniquement sur la commune de Marseille, sur le territoire du Parc National des Calanques, en cœur de parc.

Conformément à la proposition du pétitionnaire approuvée par le CNPN, les prélèvements seront limités aux 4 sites énumérés ci-après :

1. l'Escalette,
2. l'anse de la Maronaise,
3. le Mont-Rose
4. l'archipel du Frioul.

Article 4, période d'exercice et validité de la dérogation :

La présente dérogation n'est valide que pour l'année 2013, pour la période allant de la date de publication du présent acte au 31 décembre 2013.

Article 5, modalités d'intervention :

A) Conditions générales d'exécution des prélèvements :

Conformément aux prescriptions du CNPN, les personnes visées à l'article 1 du présent acte, chargées de l'exécution des prélèvements veilleront à « *prendre toutes les mesures appropriées pour que les prélèvements réalisés ne conduisent pas à des impacts négatifs sur l'état de conservation des populations de cette espèce protégée ou sur d'autres espèces protégées ou patrimoniales présentes dans les différents sites étudiés* »,

B) Protocole d'intervention :

Sur chacun des 4 sites énumérés à l'article 3 du présent acte :

1. 16 placettes seront définies, correspondant chacune à une plante.
De ces placettes ainsi définies, 8 d'entre elles seront choisies contenant un spécimen d'Astragale sain, les 8 autres, un spécimen détérioré.
2. Ces placettes ainsi délimitées seront repérées par coordonnées GPS.
3. Des photographies de l'état initial des placettes et des spécimens d'Astragale de Marseille devant subir les prélèvements devront être réalisées.
4. Un rapport écrit, descriptif sommaire de l'état initial des placettes, portant les coordonnées GPS et les photographies de ces placettes sera remis aux services du Parc National des Calanques, comptable du suivi de la flore et de la faune sauvage sur le territoire qui le définit.

Article 6, quota de prélèvement :

A l'intérieur de chacune de ces placettes, une série de prélèvements pourra être effectuée, sur les racines du spécimen d'Astragale de Marseille la concernant, en fonction des différentes conditions écologiques des points de la placette.

Conformément aux prescriptions émises par le CNPN, 64 séries de prélèvements pourront être effectuées.

Article 7, bilan des opérations de prélèvement et des travaux de recherche :

Conformément à l'avis du CNPN, le pétitionnaire est tenu « *de transmettre à la DREAL PACA, à la DDTM des Bouches-du-Rhône, au Parc national des Calanques, au CBN méditerranéen, ainsi qu'à l'expert délégué flore du CNPN, un rapport de mission faisant état des prélèvements réalisés, ainsi que, lorsqu'ils seront disponibles, les résultats de l'étude réalisée et les articles scientifiques rédigés à partir de cette étude.* »

Article 8, publication et recours :

Le présent arrêté sera publié au Recueil des Actes Administratifs de la Préfecture des Bouches-du-Rhône.

Il pourra faire l'objet d'un recours devant le Tribunal Administratif de Marseille dans un délai de deux mois suivant sa publication.

Article 9, suivi et exécution :

- Monsieur le Directeur Départemental des Territoires et de la Mer,
- Monsieur le Directeur du Parc National des Calanques,
- Monsieur le Colonel commandant le Groupement Départemental de Gendarmerie,
- Monsieur le Chef du service départemental de l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage,

sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté qui sera publié au Recueil des Actes Administratifs de la Préfecture des Bouches-du-Rhône.

Fait à Marseille, le 28/05/13
Le Directeur Départemental des Territoires et de la Mer,
par délégation,
Le Chef du Service de l'Environnement



Jean-Baptiste SAVIN