

RAPPORT DE MEMOIRE

Année 2012

Nathanaëlle LECLERC

Dans le cadre du Projet
ECOMINE BIO TOP



AGROCAMPUS OUEST

CFR Angers
2, rue le Nôtre
49100 Angers



SIRAS Pacifique

16, rue Edouard Glasser Motor Pool
BP 8173 - Nouméa Cedex
Nouvelle-Calédonie

Live – UNC

Campus de Nouville
Nouméa
Nouvelle-Calédonie



Mémoire de Fin d'Etudes

Diplôme d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences Agronomiques, Agroalimentaires, Horticoles et du Paysage

Spécialisé en Gestion Durable du Végétal en Horticulture et aménagement paysager

2012

**Amélioration de la technique d'enrobage de graines
d'espèces endémiques avec des spores de champignons
mycorhiziens pour la revégétalisation de sites miniers par
hydroseeding**

Nathanaëlle Leclerc

Date : Signature :

Autorisation de diffusion :

Volet à renseigner par l'enseignant responsable de l'option ou son représentant

Bon pour dépôt (version définitive)

Devant le jury :

Soutenu à Angers, le 10/10/12

Sous la présidence de : Jean-Charles Michel

Maître de stage : Pr. Hamid Amir

Enseignant référent : Armin Bischoff

Autres membres du jury : Olivier Damas, Alexandre Degrave.

*"Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur
et non celle d'AGROCAMPUS OUEST".*

Fiche de diffusion du mémoire

A remplir par l'auteur⁽¹⁾ avec le maître de stage.

Aucune confidentialité ne sera prise en compte si la durée n'en est pas précisée.

Préciser les limites de la confidentialité⁽²⁾ :

➤ Confidentialité absolue : oui non

(ni consultation, ni prêt)

↳ Si oui 1 an 5 ans 10 ans

➤ A l'issue de la période de confidentialité **ou** si le mémoire n'est pas confidentiel, merci de renseigner les éléments suivants :

Référence bibliographique diffusable⁽³⁾ : oui non

Résumé diffusable : oui non

Mémoire consultable sur place : oui non

Reproduction autorisée du mémoire : oui non

Prêt autorisé du mémoire : oui non

.....
Diffusion de la version numérique : oui non

↳ Si oui, l'auteur⁽¹⁾ complète l'autorisation suivante :

Je soussigné(e) _____, propriétaire des droits de reproduction dudit résumé, autorise toutes les sources bibliographiques à le signaler et le publier.

Date :

Signature :

Rennes/Angers, le

Le maître de stage⁽⁴⁾,

L'auteur⁽¹⁾,

L'enseignant référent,

(1) auteur = étudiant qui réalise son mémoire de fin d'études

(2) L'administration, les enseignants et les différents services de documentation d'AGROCAMPUS OUEST s'engagent à respecter cette confidentialité.

(3) La référence bibliographique (= Nom de l'auteur, titre du mémoire, année de soutenance, diplôme, spécialité et spécialisation/Option) sera signalée dans les bases de données documentaires sans le résumé.

(4) Signature et cachet de l'organisme.

ABSTRACT

In order to make easier the reestablishment of New-Caledonia endemic species on degraded soils by Nickel mining exploitations when topsoil use is impossible, the use of mycorrhizal symbiosis seems to be a good opportunity. Indeed, those micro-organisms provide plants with the ability to resist to water and metallic stresses. To ensure plants mycorrhizis from their germination after hydroseeding, so for better performance in revegetation, we tested a mycorrhizal seed coating technic which appears to be the best with Alginate at 12,5g/L in distilled water which pH is taken to 7,5 containing mycorrhizal fungi spores. If this technic leads to the half the AMF spores germination, it permitted 40% of roots mycorrhization, a rate barely reached by classic inoculation with double quantity of inoculant. By the way, this coating can also be stored once dry without mitigating these proprieties.

Key words: seed coating, alginate, mycorrhizae spores, hydroseeding, mine sites rehabilitation.

RESUME

Pour faciliter la réimplantation d'espèces végétales endémiques de la Nouvelle Calédonie sur des sols ayant été dégradés par l'exploitation minière lorsque la réutilisation de topsoils est impossible, l'utilisation de la symbiose mycorrhizienne semble être une technique intéressante. En effet, ces micro-organismes confèrent aux plantes une capacité de résistivité aux stress hydrique et métallique. De manière à assurer la mycorrhization des plants dès leur germination après hydroseeding, nous avons mis en place une technique d'enrobage des graines d'espèces endémiques à partir d'Alginate, concentré à 12,5g/L, dissout dans de l'eau distillée dont le pH a été ajusté à 7,5, contenant les spores de champignon mycorrhizien. Si cette technique entraîne une diminution de moitié du taux de germination des spores pour un même temps de germination, elle permet tout de même un taux de mycorrhization racinaire de 40% pour les plants dont les graines ont été enrobées. Un taux à peine atteint par inoculation classique avec un inoculum deux fois plus riche en quantité. Cet enrobage peut, par ailleurs, être conservé une fois séché sans perdre ses propriétés.

Mots-clefs : Enrobage, alginate, spores de champignon mycorrhizien, hydroseeding, revégétalisation de sites miniers

REMERCIEMENTS

Merci à Céline Grymonprez, malgré un abandon prématuré, de m'avoir acceptée sur ce stage et permis de découvrir une magnifique contrée lointaine. Merci à Hamid Amir pour m'avoir offert une grande autonomie accompagnée d'un précieux suivi lors de ce stage dans les laboratoires du LIVE. Merci à Armin Bischoff, mon tuteur de stage, pour ses conseils lors de la rédaction de ce mémoire.

Merci à toute l'équipe du LIVE pour les cafés et gâteaux partagés dans la joie et la bonne humeur, avec un remerciement tout particulier pour Valérie qui m'a aidé à faire mes premiers pas dans l'enrobage, Stéphane pour son rôle de maître de stage adoptif, Simon pour toutes ces heures de détente bien méritées, Matthieu pour ses conseils avisés sur la thèse, Léa pour son rire. Merci aux stagiaires du PPME pour nous avoir donné l'image d'étudiants très studieux au LIVE.

Bien sûr un grand merci à toutes les personnes que j'ai croisées plus ou moins longtemps, plus ou moins intensément à la résidence internationale, toutes sans exception, car sans vous ce voyage à l'autre bout du monde aurait été bien différent.

Entre autre un grand merci à Emilie pour tes rires, tes larmes, tes doutes et tes convictions, vive la Bretagne, aux Francis pour leur humour décapant, Stéphane pour ton enthousiasme, Charlotte pour ton calme et tes supers gâteaux au Carambar bien meilleurs que les miens à l'alginate, Jess pour ton énergie et tous ces muscles que j'ai découverts grâce toi, à Oliv' de m'avoir laissé gagner la compétition et tous les autres que je n'oublie pas évidemment. Merci à Martin, Benichou, Stéphane de m'avoir permis de découvrir mon talent de coiffeuse et surtout à Léo d'avoir veillé sur nous durant tout ce temps.

Merci à Jaques pour ces heures passées à rouler ensemble à travers Nouméa et grâce à qui je pourrai rouler seule maintenant à travers la monde. Merci les smurfs !

Et enfin, un grand merci à ma famille et plus particulièrement à mes parents, mes frères et sœurs : Charles, Vass, Nanc' et Nono pour leur soutien, leur présence, leur amour malgré mon absence durant toutes ces années d'études, vous êtes en grande partie responsables de ce que je suis aujourd'hui. Je vous laisse juger seuls de ce qu'il faut en tirer. Merci à ma belle-mère et mon parrain pour leur soutien respectif dans tous mes projets.

Merci à Antoine pour ta patience et ce voyage... qu'il ne s'arrête jamais !

- Oleti -

Table des matières

ABSTRACT	3
RESUME	3
REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	5
GLOSSAIRE	8
LISTE DES ABREVIATIONS	10
LISTE DES FIGURES	11
LISTE DES TABLEAUX	11
LISTE DES ANNEXES	12
AVANT-PROPOS	13
INTRODUCTION	14
I. ETAT DE L'ART	16
I.1. ACTIVITE MINIERE ET REVEGETALISATION EN NOUVELLE-CALEDONIE	16
I.1.1. ACTIVITE MINIERE ET CONSEQUENCES ENVIRONNEMENTALES	16
<i>Genèse et caractéristiques des sols ultramafiques</i>	16
<i>Evolution des méthodes d'extraction minières</i>	16
<i>Conséquences environnementales</i>	17
I.1.2 LA NOUVELLE-CALEDONIE : UN TRESOR BOTANIQUE MENACE	18
<i>Endémisme, micro endémisme et hotspot de biodiversité</i>	18
<i>Le maquis minier</i>	18
<i>Le rôle de la couverture végétale</i>	18
I.1.3. LA REVEGETALISATION DES SITES MINIERS	19
<i>Concept de la restauration écologique et application à la Nouvelle-Calédonie</i>	19
<i>Evolution des lois et prise de conscience</i>	20
<i>Premiers essais de revégétalisation et méthodes actuelles</i>	20
<i>Focus sur l'ensemencement hydraulique ou hydroseeding</i>	21
I.2. LA MYCORHIZATION CONTROLEE PAR ENROBAGE : UN ELEMENT ESSENTIEL A LA REVEGETALISATION...	21
I.2.1. MYCORHIZES ET ROLE DANS LE DEVELOPPEMENT DES PLANTS	21
<i>Les endomycorhizes</i>	21
<i>Endomycorrhizes et croissance de la plante</i>	22
I.2.2. ROLE DES AMF SUR SOL UMF	22
<i>Rôle dans la disponibilité en Phosphore</i>	22
<i>Rôle dans la protection face aux métaux lourds</i>	23
I.2.3. ASPECTS TECHNIQUES ET PRATIQUES DE LA MYCORHIZATION CONTROLEE, APPLIQUEE A LA RESTAURATION ECOLOGIQUE DES TERRAINS MINIERS.	23
I.2.4. L'ALGINATE : UN MATERIEL INTERESSANT POUR L'ENROBAGE DE GRAINES D'ESPECES ENDEMIQUES AVEC SPORES D'AMF, UTILISEES EN REVEGETALISATION PAR HYDROSEEDING	24
<i>Origine et structure de l'alginate</i>	24
<i>Propriétés mécaniques et physico-chimiques de l'Alginate</i>	24
<i>Utilisation générale de l'alginate</i>	25

<i>L'alginate pour l'encapsulation de micro-organismes</i>	25
II. MATERIEL ET METHODES	26
II.1. MATERIEL VIVANT	26
II.1.1. MATERIEL VEGETAL.....	26
<i>Costularia comosa</i>	26
<i>Alphitonia neocaledonica</i>	26
<i>Gymnostoma deplancheanum</i>	27
<i>Dodonea viscosa</i>	27
<i>Sorghum vulgare</i>	27
<i>Lots de graines SIRAS</i>	27
II.1.2. LES SPORES D'AMF ET EXTRACTION	28
II.2. AMELIORATION DU PROTOCOLE D'ENROBAGE	28
II.2.1. CONDITIONS DE MANIPULATION	29
II.2.2. PROTOCOLE D'ENROBAGE ET VARIABLES A TESTER POUR SON AMELIORATION.....	29
<i>La concentration de la solution d'Alginate</i>	29
<i>Le pH de l'eau distillée utilisée pour la solution d'alginate</i>	30
<i>La technique d'enrobage</i>	30
II.2.3. ESTIMATION DE LA QUALITE DE L'ENROBAGE	30
II.2.4. SUIVI DE GERMINATION DES GRAINES ENROBEES	31
II.2.5. SUIVI DE GERMINATION DES SPORES	31
<i>Coloration et comptage</i>	31
<i>Préparation du bleu de trypan et du lactoglycérol</i>	31
II.3. EFFICACITE DE LA METHODE D'ENROBAGE DES GRAINES : MYCORHIZATION DES PLANTS.	31
II.3.1. CONDITIONS EXPERIMENTALES	31
II.3.2. MODALITES	32
II.3.3. TAUX DE MYCORHIZATION	33
<i>Coloration des mycorhizes</i>	33
<i>Montage</i>	33
<i>Observation</i>	33
<i>Intensité globale de la mycorhization</i>	34
II.4. STOCKAGE DE GRAINES ENROBEES AVEC DES SPORES D'AMF	34
II.4.1. EFFET DU SECHAGE DE L'ENROBAGE SUR LA GERMINATION DES GRAINES	34
II.4.2. CONDITIONS DE STOCKAGE	34
II.5. ANALYSES STATISTIQUES DES RESULTATS	34
III. RESULTATS ET DISCUSSION	35
III.1. AMELIORATION DU PROTOCOLE D'ENROBAGE	35
III.1.1. INFLUENCE DES DIFFERENTS PARAMETRES SUR LA QUALITE DE L'ENROBAGE	35
<i>Influence de la concentration sur la qualité de cet enrobage</i>	35
<i>Influence du pH de l'EDSA sur la qualité de cet enrobage</i>	35
<i>Influence de la méthode d'enrobage sur la qualité de cet enrobage</i>	36
<i>Bilan sur la qualité de l'enrobage</i>	37
III.1.2. INFLUENCE DES DIFFERENTS PARAMETRES SUR LA GERMINATION DES GRAINES	37
<i>Influence de la concentration de l'alginate sur la germination des graines</i>	38

<i>Influence du pH de l'eau distillée stériles (EDS) utilisée pour la solution d'alginate sur la germination des graines</i>	39
<i>Influence de la méthode sur la germination des graines</i>	40
<i>Bilan sur la germination des graines</i>	40
III.1.3. INFLUENCE DES DIFFERENTS PARAMETRES SUR LA GERMINATION DES SPORES	41
<i>Influence de la concentration sur la germination des spores</i>	41
<i>Influence du pH de l'eau distillée utilisée sur la germination des spores</i>	41
<i>Influence de la méthode sur la germination des spores</i>	42
<i>Bilan sur la germination des spores</i>	42
III.2. EFFICACITE DE LA TECHNIQUE D'ENROBAGE AVEC SPORES D'AMF DE GRAINES PAR RAPPORT A LA TECHNIQUE D'INOCULATION CLASSIQUE.	43
III.3. STOCKAGE DES GRAINES ENROBEES : PREMIERS RESULTATS	44
III.3.1. SECHAGE DE L'ENROBAGE.....	44
III.3.2. CONSERVATION DES GRAINES ENROBEES	45
<i>Conservation du potentiel germinatif des graines</i>	45
<i>Conservation du potentiel germinatif des spores</i>	45
CONCLUSION	47
BIBLIOGRAPHIE	48
SITIOGRAPHIE	54
ANNEXES	55

Glossaire

- AMF** Arbuscular Mycorrhizal Fungus. Forme de mycorhizes archaïque (apparue au Dévonien lors de la colonisation des continents par les végétaux) associant un champignon de l'embranchement des glomérormycètes avec un végétal (L'Huillier et al., 2010).
- Arbuscule** Structure typique de la symbiose MA qui se développe dans les cellules pénétrées par le mycélium du champignon et au niveau de laquelle ont lieu les échanges entre la plante et le champignon. Cette structure doit son nom à sa forme qui rappelle celle d'un arbuste (L'Huillier et al., 2010).
- Autochtone** Qualifie ce qui habite en son lieu d'origine, son caractère « local ».
- Biodiversité** « Variété et variabilité de tous les organismes vivants. Elle inclut la variabilité génétique à l'intérieur des espèces et de leurs populations, la variabilité des espèces et de leurs formes de vie, la diversité des complexes d'espèces associés et de leurs interactions, et celles des processus écologiques des systèmes qu'ils influencent ou dont ils sont acteurs » (XVIII^e Assemblée Générale de l'IUCN, Costa Ric, 1998)
- Biotrophe** Se dit d'un champignon symbiotique obtenant des nutriments des cellules vivantes de son partenaire, par opposition au nécrotrophe qui profite de cellules mortes.
- DSE** Dark Septate Endophyte. Regroupe un ensemble de champignons ascomycètes anamorphiques qui colonisent les tissus racinaires inter et intracellulaires.
- Ecosystème** Unité écologique fonctionnelle constituée d'un ensemble d'individus vivant dans un milieu donné. Cette notion intègre aussi leurs interactions (L'Huillier et al., 2010).
- Edaphique** En écologie, ce qui a trait à un facteur écologique lié au sol (pH, Humidité, concentrations, ...). En Pédologie, ce terme désigne ce qui se rapporte au sol (L'Huillier et al., 2010).
- Endémique** Qui est particulier à une localité donnée. Ici, espèce dont l'aire de répartition naturelle ne s'étend pas au-delà de la Nouvelle-Calédonie.
- Hotspot** Selon la définition d'usage de Norman Myers, un hotspot se définit par un site contenant une très grande biodiversité, un fort taux d'endémisme et dont la survie de plusieurs espèces est menacée (Spicer, 2009).
- Hydroseeding** Technique consistant à asperger les sols nus avec une solution contenant des résidus végétaux, de l'eau, des engrais, des substances collantes et des graines afin de revégétaliser ces sols et limiter les risques d'érosion et de transfert.

Hyphe	Filaments cellulaires dont est constitué le mycélium des champignons supérieurs.
Inoculum	Substance introduite par inoculation
Latérite	Ensemble des matériaux meubles riches en oxydes, en hydroxydes de fer et en aluminium, constituant les sols provenant de l'altération poussée des roches sous climat tropical (L'Huillier et al., 2010).
Maquis minier	Formation végétale arbustive et herbacée plus ou moins buissonnante, située sur substrat ultramafiques (Province Sud, 2008a).
Mycorhize	La mycorhize (du grec «mukês» pour champignon et «rhiza» pour racine) est l'association symbiotique d'un champignon avec les racines d'une plante (L'Huillier et al., 2010).
Péridotite	Roche magmatique regroupant les harzburgites et les dunités. Roche fréquemment altérée par serpentinisation.
Restauration Ecologique	Processus qui assiste l'autoréparation d'un écosystème dégradé ou détruit.
Rhizosphère	Zone du sol dans laquelle s'exerce l'influence des racines des plantes, notamment sur la microflore par l'intermédiaire de substances chimiques sécrétées par les racines.
Roche Ultra-Mafique	Roche ignée de couleur foncée, à faible concentration de silicate (moins de 45%), et à haute teneur en fer et magnésium (Webster's online dictionary, 2011).
Saprophyte	Roche ou couche géologique produite par l'altération chimique d'une roche mère, due à l'action du climat, sans avoir été transportée. Elle est souvent friable et contient un mélange de nouvelles structures et restes de la roche mère. Elle peut être enrichie en Ni dans le cas d'une altération de péridotite (L'Huillier et al., 2010).
Sol latéritique	Sol rouge vif à rouge brun, très riche en oxyde de fer et en alumine, formé sous climat tropical. Pauvre en matière organique, en silice et en éléments nutritifs fertilisants (Ca, Mg, K, Na). Il s'agit d'un sol impropre à la culture. (LAROUSSE, 2011c).
Symbiose	Relation permanente entre deux organismes d'espèces différentes et qui se traduit par des effets bénéfiques aussi bien pour l'un que pour l'autre.
Topsoil	Terme anglophone désignant la partie superficielle du sol dans laquelle l'activité biologique est plus active, renfermant notamment semences et spores

Liste des abréviations

°GL	Degré Gay-Lussac
AM	Arbuscular Mycorrhizal
AMF	Arbuscular Mycorrhizal Fungi
Ane	<i>Alphitonia neocaledonica</i>
C	Concentration
Cco	<i>Costularia comosa</i>
DES	Dark Septate Endophyte
Dvi	<i>Dodonea viscosa</i>
EDS	Eau Distillée Stérile
EDSA	Eau Distillée Stérile utilisée pour la solution d'Alginate
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tetra Acétique
Gde	<i>Gymnostoma deplancheanum</i>
LIVE	Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement
NC	Nouvelle-Calédonie
P	Phosphore
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
PGPB	Plant Growth Promoting Bacteria
R(%)	Taux de Recouvrement en pourcentage
SIRAS	Société Internationale de Révégétalisation et Aménagement des Sites
T°	Température en degré Celcius
TTC	Chlorure De Triphényl-2,3,5 Tétrazolium
UMF	Ultramafique
UNC	Université de la Nouvelle-Calédonie

Liste des figures

Figure 1 Coupe d'un profil type de sol issu de roche	16
Figure 2 Approches de la restauration des sols dégradés en exploitations minières.....	19
Figure 3 Volume d'exploration racinaire et mycorhizien du sol.	21
Figure 4 Graines de Cco.....	26
Figure 5 Graines d'Ane.....	26
Figure 6 Graines de Gde.....	27
Figure 7 Graines de Dvi	27
Figure 8 Protocole d'enrobage des graines par l'alginate de Sodium à la micro-pipette.....	29
Figure 9 Protocole d'enrobage en gâteau des graines par l'alginate de sodium	30
Figure 10 Evaluation du taux de recouvrement des graines d'une modalité	30
Figure 11 Photos des plantules de sorgho après transplantation.....	32
Figure 12 Notation du degré de mycorhization des fragments racinaires.....	33
Figure 13 Influence de la concentration de l'alginate sur le taux de recouvrement R(%)	35
Figure 14 Influence du pH de l'EDS de la solution d'alginate sur le taux d'enrobage R(%) .	36
Figure 15 Influence de la technique d'enrobage utilisé sur le taux de recouvrement R(%).....	36
Figure 16 Influence de la concentration de l'enrobage en alginate sur la germination.	38
Figure 17 Influence du pH de l'EDSA sur le taux de germination des graines.....	39
Figure 18 Photos de graines fraîchement enrobées.....	40
Figure 19 Influence de la concentration de l'alginate sur le taux de germination des spores. .	41
Figure 20 Influence du pH de l'EDSA sur le taux de germination des spores d'AMF.....	41
Figure 21 Taux de mycorhization des plants de sorgho enrobés ou inoculés	43
Figure 22 Photos d'enrobage frais et sec sur Dvi	44
Figure 23 Influence du séchage de l'enrobage sur le taux de germination.....	45
Figure 24 Influence des modalités de conservation.	46

Liste des tableaux

Tableau 1 Souches pures de spores d'AMF utilisées	28
Tableau 2 Modalités de l'expérience évaluant l'efficacité de la technique d'enrobage.....	32
Tableau 3 Tableau des résultats des tests ANOVA de l'influence des différents paramètres..	37
Tableau 4 Taux de germination et de viabilité des lots de graines SIRAS.....	39
Tableau 5 Influence du temps (mois) et des modalités de conservation.....	45

Liste des Annexes

- Annexe I La Nouvelle-Calédonie : localisation et répartition de sols ultramafiques
- Annexe II Les vers à stériles latéritiques
- Annexe III Les cicatrices laissées par les exploitations minières dans le paysage
- Annexe IV Le climat de Nouvelle-Calédonie
- Annexe V Répartition des formations végétales de Nouvelle-Calédonie
- Annexe VI Extrait du code minier
- Annexe VII Les espèces invasives de Nouvelle-Calédonie suite à des essais de revégétalisation
- Annexe VIII L'hydroseeding
- Annexe IX Les champignons mycorhiziens
- Annexe X Les interactions champignons mycorhiziens et bactéries du sol
- Annexe XI Les algues brunes : des productrices d'Alginate
- Annexe XII Structure et gélification de l'alginate de sodium
- Annexe XIII *Costularia comosa*
- Annexe XIV *Alphitonia neocaledonica*
- Annexe XV *Gymnostoma deplancheanum*
- Annexe XVI *Dodonea viscosa*
- Annexe XVII Le Sorgho
- Annexe XVIII Protocole d'extraction des spores du LIVE
- Annexe XIX Protocole d'enrobage de graines avec spores d'AMF à l'alginate du LIVE
- Annexe XX Protocole de coloration des spores de l'enrobage du LIVE
- Annexe XXI Répartition moyenne des enrobages dans les catégories 1 à 4 réalisée pour le taux de recouvrement selon les différents traitements
- Annexe XXII Technique d'inoculation à partir de poudre de microbilles d'alginate encapsulant un inoculum

AVANT-PROPOS

Ce stage fait partie du programme CNRT-Ecomine sur la « Caractérisation et fonctionnement de sols de surface (topsoils), d'espèces végétales et des champignons associés, des maquis miniers de Nouvelle-Calédonie. Application à la restauration écologique des terrains dégradés ». Placé sous la responsabilité de M. Hamid Amir, directeur du Laboratoire Insulaire de Vivant et de l'Environnement (LIVE) de l'Université de Nouvelle-Calédonie (UNC) et professeur en microbiologie, il réunit de nombreux acteurs de la recherche sur la revégétalisation de la Nouvelle-Calédonie, notamment le LIVE, l'Institut Agronomique Néo-Calédonien (IAC), l'Institut de la Recherche pour le Développement (IRD), le CIRAD, l'INRA, le CNRS et enfin la SIRAS-Pacifique, Société Internationale de Revégétalisation et d'Aménagement des Sites. Il répond aux objectifs de la sous-tâche 3 (sur 3) de la tâche 2 (sur 3) du volet 2 (sur 4) de ce programme. Cette petite partie, qui a tout de même occupé tout mon stage, n'ayant fait intervenir que la SIRAS-Pacifique et le LIVE, j'ai choisi de ne mentionner que ceux-là dans le reste de mon rapport pour alléger le texte et plus de lisibilité. Les autres partenaires n'en restent pas moins importants pour le projet global.

Les travaux présentés dans ce mémoire sont la suite directe d'un stage réalisé en 2011 par Christophe Zilliox (AgroParisTech). Son mémoire a donc été la base de mon travail.

Introduction

À la fin du XIXe siècle, la Nouvelle-Calédonie était le premier pays producteur mondial de Nickel et devint premier producteur de Cobalt au tournant du XXe. Son histoire et son économie sont intimement liées à la richesse et la particularité de ses sols. Malheureusement les richesses naturelles ne sont pas éternelles et les filons garniéritiques dont la teneur en Nickel était de l'ordre de 15% lors des premières exploitations ont disparu dès 1920. Pour garder son rang actuel de cinquième producteur mondial de Nickel, les industries minières ont dû alors s'attaquer aux roches latéritiques titrant à 1,5 % de Nickel, généralisant ainsi les exploitations à ciel ouvert. Cette technique nécessitant le décapage du couvert végétal et des horizons supérieurs ainsi que le stockage des stériles miniers sur d'importantes surfaces défigure les magnifiques paysages Néo-Calédoniens. Cette détérioration n'est cependant que la partie visible de l'Iceberg des dégâts causés par l'exploitation minière sur le milieu. En effet, ces sols ultramafiques qui font la richesse de la Nouvelle-Calédonie, sont aussi l'origine d'une biodiversité végétale exceptionnelle présentant un fort taux d'endémicité. Ainsi, de nombreux programmes de revégétalisation ont vu le jour pour tenter de préserver ce patrimoine unique.

C'est dans ce contexte que le programme CNRT « Caractérisation et fonctionnement de sols de surface (topsoils), d'espèces végétales et des champignons associés, des maquis miniers de Nouvelle-Calédonie. Application à la restauration écologique des terrains dégradés » a vu le jour en 2009, sous la responsabilité du Pr. Hamid Amir, directeur du Laboratoire Insulaire de Vivant et de l'Environnement (LIVE) de l'Université de Nouvelle-Calédonie (UNC). Le volet 2 de ce projet sur lequel travail le LIVE et la SIRAS-Pacifique, (Société Internationale de Revégétalisation et d'Aménagement des Sites), vise à améliorer les connaissances des champignons mycorhiziens et leur utilisation lors des chantiers de revégétalisation. Les objectifs fixés sont l'étude de la biodiversité des champignons mycorhiziens et leur adaptation au milieu ultramafique, suivi d'expérimentations de mycorhization à travers la mise au point d'une technique d'enrobage des graines d'espèces endémiques en vue de son utilisation en hydroseeding.

En effet, certaines plantes particulièrement abondantes sur maquis minier sont fréquemment utilisées en revégétalisation, aussi bien en plantation qu'en hydroseeding. Des expériences en serre ont démontré que l'apport de champignons mycorhizien à arbuscules (AMF) stimule leur croissance et augmente leur tolérance au Nickel (*Amir et Lagrange, 2008*). La mycorhization des plantes utilisées en revégétalisation pourrait donc permettre d'augmenter le taux de réussite des chantiers de revégétalisation par hydroseeding dont les résultats sont plutôt décevants jusqu'à présent. Pour cela, il est nécessaire de mettre en place une technique d'enrobage des graines avec spores de champignons mycorhiziens pour permettre la mycorhization, dès germination, des graines semées par propulsion hydraulique. Pour cela, le LIVE a travaillé sur différents matériaux et mis en place un protocole à base d'alginate de sodium qui sera la base de mon travail. Les objectifs de mon stage étaient l'amélioration de cette technique prometteuse (*Amir et Ducouso, 2010*) d'enrobage de graines d'espèces endémiques avec des spores de champignons mycorhiziens, mais aussi de tester l'efficacité de cette technique en termes de mycorhization en la comparant à la technique classique d'inoculation des plantules en pépinière.

Dans un premier chapitre dédié à la bibliographie, nous aborderons l'activité minière et la revégétalisation en Nouvelle-Calédonie pour centrer ensuite notre attention sur un élément essentiel à la revégétalisation : les champignons endomycorhiziens et voir enfin les propriétés physico-chimiques de l'alginate qui font de lui le matériau retenu pour la technique d'enrobage. Nous présenterons en chapitre deux (Matériel et méthodes), les protocoles détaillés mis en place pour répondre aux objectifs fixés précédemment : amélioration de protocole d'enrobage et évaluation de son efficacité et de sa fiabilité dans le temps. Les résultats de ces expériences seront livrés, analysés et discutés en chapitre trois.

I. ETAT DE L'ART

I.1. Activité minière et revégétalisation en Nouvelle-Calédonie

I.1.1. Activité minière et conséquences environnementales

Genèse et caractéristiques des sols ultramafiques

Il y a environ 160 millions d'années, le glissement de la plaque Pacifique a provoqué le détachement et l'éloignement de la Nouvelle-Calédonie du continent australien. Entraînée par un phénomène d'obduction, une partie du socle continental calédonien a été recouverte par une nappe de roches éruptives, essentiellement des péridotites. Ces roches, dites ultramafiques et dont l'altération produit le minerai de nickel, s'étendent sur un tiers de la superficie de la Grande Terre (Sarrailh, 2002) et principalement dans le Grand Sud (Annexe I).

Elles sont caractérisées par une faible teneur en aluminium, potassium, phosphore et calcium et de fortes concentrations en fer, magnésium et certains autres métaux tels que nickel, cobalt et chrome, très prisés par l'industrie minière. Au niveau de l'horizon à latérites rouges, la teneur en fer et chrome est très élevée et tend à diminuer graduellement en se dirigeant vers les horizons inférieurs. À l'inverse, la concentration en magnésium, silice, cobalt, manganèse et nickel tend à augmenter en se rapprochant de la roche mère. Le pH est relativement acide en surface (4,7 à 6,4), mais celui-ci, par la présence plus marquée de magnésium en profondeur, augmente progressivement jusqu'à un niveau neutre à la base de la couche de latérites jaunes. La capacité d'échange cationique du sol, donnant une idée de la fertilité des sols de surface, est relativement faible avec des valeurs inférieures à 15 mEq/100g (Latham, 1975) qui tendent également à augmenter avec la présence d'argile magnésienne en

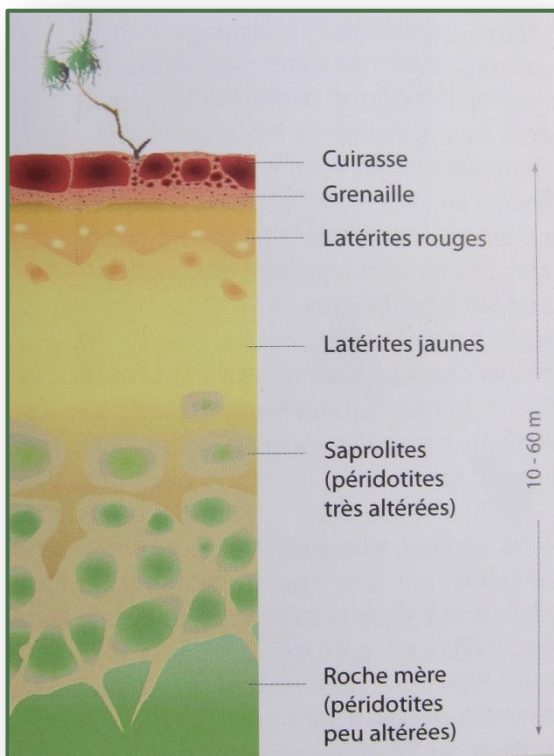


Figure 1 Coupe d'un profil type de sol issu de roche UMF (L'huillier et al., 2010)

profondeur. Seul le magnésium situé à la base du profil, soit au niveau de la latérite jaune (Fig.1), est plus mobile.

Ces particularités édaphiques, que l'on ne retrouve nulle part ailleurs au monde, ont fait de la Nouvelle-Calédonie le troisième producteur mondial de nickel (Mazzeo, 2004) et influent sur les méthodes et les conséquences de l'exploitation minière (Laroche, 2011).

Evolution des méthodes d'extraction minières

Dix ans après la découverte de la Garniérite par Jules Garnier en 1864 à Dumbéa, la première extraction du minerai de Nickel est réalisée au mont Dore, puis s'étend sur d'autres

régions. Si les premières extractions se faisaient par galeries souterraines le long d'un filon de garniérite dont la teneur était de l'ordre de 15%, les taux ont progressivement diminué à 5%, puis disparus, dès 1920. Ce phénomène et le ralentissement du cours du Nickel depuis 1980 a entraîné l'exploitation à ciel ouvert des horizons latéritiques et saprolitiques (Fig.1) dont les teneurs respectives sont 1,5 et 2,5% (Mathieu, 2002).

Ce type d'exploitation, décapant les couches végétales et les horizons supérieurs du sol à trop faible teneur, a des conséquences catastrophiques sur l'environnement, en particulier depuis 1950 où les extractions se sont mécanisées et de plus grandes profondeurs ont été atteintes. Les stériles miniers, constitués par les horizons décapés et les roches triées du minerai, étaient jusqu'en 1975 déversés sur les versants détruisant ainsi une surface encore plus importante de végétation et les pistes tracées au bulldozer pour exploitation ou prospection laissent encore de larges cicatrices sur le paysage. Aujourd'hui de nouvelles techniques plus respectueuses de l'environnement sont employées : pelle hydraulique et camion d'évacuation remplacent les bulldozers, le stockage de stériles est stabilisé en vers (Annexe II), drainé et protégé de l'érosion sur des sites choisis, un terrain naturel protecteur en bordure des pistes et des zones d'extraction doit être conservé et des caniveaux et décanteurs sont mis en place pour réguler les flux hydriques et réduire la charge solide des eaux de ruissellement (Alla et al., 2007).

Conséquences environnementales

Les conséquences de l'activité minière sur l'environnement sont aujourd'hui inscrites dans le paysage Calédonien. Des zones dénudées mal délimitées, entourées de coulées de « terre rouge » indiquent une ancienne mine tandis que des surfaces dénudées mieux circonscrites traduisent des mines plus récentes (Annexe III). L'impact visuel résultant d'un siècle de destruction du sol et de la végétation est associé à des perturbations du régime hydrique, un accroissement de l'érosion et un transport de matériaux sur les pentes conduisant à une pollution et un engravement des rivières ainsi qu'à un dépôt d'alluvions le long du rivage des centres miniers (Bird et al., 1984 ; Dupon, 1986 ; Jaffré et al., 1977). Le décapage, le recouvrement par des déblais terreux ou encore la pollution des rivières entraînent inéluctablement la réduction des écosystèmes et des populations pouvant entraîner une perte de la biodiversité et un dépérissement, à long terme des populations (Honnavy & Jacquemyn, 2006 ; Oostermeijer et al., 2003). Les risques de perte de biodiversité sont d'autant plus importants que l'écosystème touché par l'activité minière se trouve déjà en situation critique : faible étendue, fragmentation (Jaffré et al., 2004 ; Jaffré et al., 2010). Par ailleurs, les pratiques d'exploitation et de transport sur mine conduisent à l'émission de nombreuses poussières dans l'atmosphère qui pourraient être stoppées en partie par un couvert végétal plus dense (Laroche, 2011).

Mais les effets néfastes d'un projet minier sur la qualité du sol ne se limitent pas à cela. En effet, la disparition de la couche de topsoil, chargée en matière organique, est synonyme de disparition des stocks de graines locales et de la flore microbienne indispensable à la restauration végétale. Ainsi, même après plusieurs années, certains sols miniers laissés à l'abandon demeurent entièrement dénudés (Jaffré et al., 1977 ; Wild and Wiltshire, 1971). C'est pourquoi la viabilité du topsoil après stockage en vers est un sujet de recherche d'actualité soutenu par le programme CNRT en Nouvelle-Calédonie en parallèle de la technique d'enrobage étudiée ici.

I.1.2 La Nouvelle-Calédonie : un trésor botanique menacé

Endémisme, micro endémisme et hotspot de biodiversité

La Nouvelle-Calédonie se situe à 1500 km à l'est de l'Australie, à 800km au Sud-Ouest du Vanuatu et à 1700km au Nord de la Nouvelle-Zélande, juste au-dessus du tropique du Capricorne, et entre 163° et 167° de longitude Est (*Annexe I*). Elle est donc soumise à un climat intertropical qui se caractérise par une saison chaude et humide et une saison fraîche séparées par deux intersaisons (*Annexe IV*). Elle est constituée d'une île principale de 400 km de long et 50 km de large traversée en son long d'une chaîne montagneuse, de l'archipel des îles Loyauté et d'îles éparses (*Zongo, 2010*). Cet isolement géographique et cette particularité pédo-climatologique ont engendré, au cours des millénaires, une originalité importante de sa flore, conférant aux terres de la Nouvelle-Calédonie un très fort endémisme (76,8%).

En effet, à ce jour, plus de 550 espèces (89 familles et 223 genres) ont été recensées dans le Grand Sud avec un taux d'endémisme spécifique atteignant plus de 90%. Parmi ces espèces, certaines sont extrêmement rares et menacées d'extinction selon les critères de l'IUCN. Ces caractéristiques font du massif du Grand Sud une entité phytogéographique à part entière (*Morat, 1999*) reconnue comme « hotspot » mondial des flores métallophytes (*Whiting et al., 2004*).

Le maquis minier

La forêt dense et humide et les maquis miniers, ensemble des groupements non forestiers, sont les deux formations végétales principales des UMF (*Jaffré, 1980 ; Morat et al., 1981*) (*Annexe V*). On suppose que la forêt dense humide recouvrait l'ensemble des massifs miniers avant l'arrivée de l'homme (3500-4000ans). Les incendies d'origine anthropique, le stockage de stériles miniers, l'engravement du lit des rivières par des déblais miniers des exploitations et l'aggravation des crues due à une diminution du couvert végétal (*Bird et al., 1984 ; Dupon, 1986*) sont les principales causes de leur régression. Cette régression n'est pas sans conséquences puisqu'on trouve dans ces forêts environ 1380 espèces de plantes vasculaires dont 82% sont endémiques (*Jaffré et al., 2009ab*). Les maquis miniers, quant à eux, résultent en grande partie de la destruction de la forêt et représentent des stades variés de succession secondaire. C'est pour cela qu'ils présentent une grande variété physiologique structurale et floristique (*Barrière et al., 2007 ; Dagostini et al., 1997 ; Enright et al., 2001 ; Jaffré et al., 1994ab ; Jaffré et al., 2003 ; Morat et al., 1986 ; Viro, 1956*). Ils représentent aujourd'hui plus de 80% des terrains miniers et rassemblent environ 1140 espèces de plantes vasculaires, dont le taux d'endémisme est de 89%. Les familles les plus caractéristiques du maquis minier sont par ordre décroissant du nombre d'espèce les Myrtaceae, Euphorbiaceae, Rubiaceae, Apocynaceae, Cunilastraceae, Rutaceae. Certaines familles comme les Casuarinaceae sont moins fournies en nombre d'espèces mais très abondantes. Par ailleurs la composante herbacée des maquis miniers est principalement constituée de Cypéracées (*Jaffré, 1980 ; Jaffré et al., 2009b*). 27% des plantes de maquis minier sont « hémi-accumulatrices » et une quarantaine d'espèce est dite « hyper-accumulatrice » ce qui fait de la Nouvelle-Calédonie, avec Cuba, l'une des régions les plus fournies en espèces hyperaccumulatrices de Nickel (*Reeves, 2003*).

Le rôle de la couverture végétale

La couverture végétale joue le rôle de protection contre l'érosion hydrique de surface puisqu'elle freine le ruissellement de l'eau et son cheminement favorisant ainsi son infiltration. De plus, la litière produite par le couvert végétal éponge une importante partie de l'eau diminuant d'avantage le ruissellement. Ainsi elle diminue le transport des sédiments qui polluent la rivière. Par ailleurs, les racines des plantes assurent une meilleure cohésion du sol,

et l'apport de matière organique par la litière : une meilleure constitution. En plus de toutes ces caractéristiques liées à l'érosion, le couvert végétal est aussi un habitat idéal pour la faune qui favorise le transport de semences et ainsi une colonisation intéressante de l'espace par les végétaux (L'Huillier *et al.*, 2010).

I.1.3. La revégétalisation des sites miniers

Cette biodiversité exceptionnelle à fort taux d'endémicité et de micro-endémicité soumise à des menaces telles que les feux et l'extraction minière place la Nouvelle-Calédonie comme l'un des «hotspots» mondiaux de biodiversité (Myers *et al.*, 2000).

Concept de la restauration écologique et application à la Nouvelle-Calédonie

L'écologie de la restauration s'adresse à l'ensemble des processus naturels et assistés

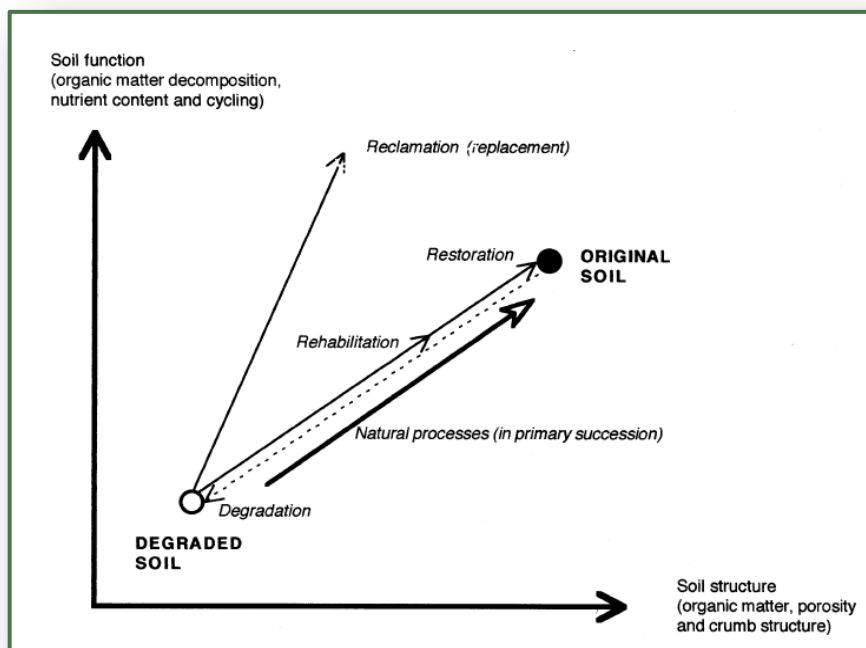


Figure 2 Les différentes approches de la restauration des sols dégradés en exploitation minières (Bradshaw, 1992)

partir duquel devrait se développer une succession secondaire conduisant progressivement à des groupements végétaux plus complexes et plus diversifiés. Les caractéristiques fonctionnelles de l'écosystème peuvent être reconstituées rapidement alors que la restauration intégrale peut exiger des centaines d'années (Fig.2).

Jusqu'à ce jour, aucun suivi de végétation sur le long terme sur terrain minier n'a été réalisé, mais il suffit d'observer le sol nu de certaines mines abandonnées depuis plus de cinquante ans pour se rendre compte que la recolonisation naturelle est très lente et imparfaite voire nulle (Jaffré *et al.*, 1977). En effet la succession spontanée se fait très lentement et difficilement du fait des conditions de stress liées au climat - vent, ensoleillement, pluies cycloniques mais aussi sécheresse prolongée -, du manque de matière organique de ces sols ou le topsoil a été décapé, de l'introduction d'espèces invasives – cerfs et cochons sauvages- et de l'usage généralisé du feu. Ainsi des efforts de revégétalisation sont essentiels pour sauvegarder une partie de la richesse endémique puisque d'après l'Union mondiale pour la nature (UICN), 32,4 % des espèces de la flore du maquis présentent un risque plus ou moins fort d'extinction.

par les interventions initiant ou favorisant le rétablissement des écosystèmes dégradés (SER, 2004). La restauration écologique des sites miniers actuelle est la suivante : implantation d'un premier couvert de végétation résistante, pérenne, à base d'espèces natives colonisatrices des terrains dénudés à

Evolution des lois et prise de conscience

Jusqu'en 2008, il n'existait aucun moyen juridique efficace pour garantir la protection de l'environnement sur site minier. Depuis 2009, le code minier (*Annexe VI*) impose aux projets miniers une étude d'impact avant exploitation, un schéma de réhabilitation des zones dégradées complété par un plan de restauration et de fermeture, la réparation des dégradations dues à l'activité minière. Il n'en demeure pas moins que les nombreuses années d'exploitation minière non règlementées ont laissé leurs marques sur le paysage (*Annexe III*). En 2007, quelques 20 000 ha de sols dégradés par l'activité minière étaient toujours à l'abandon sur la Grande Terre (1,2 % de sa surface) et seulement 296 ha auraient été restaurés depuis 1971. Avec un rythme de revégétalisation actuel de 30 à 40 ha/an (*DIMENC, 2006*), la restauration complète de ces anciens sites miniers pourrait prendre plus de 600 ans. Or, ces sols dénudés représentent une menace permanente pour la préservation de certains écosystèmes.

Actuellement, le code minier n'exige ni la restitution de la faune et de la flore originelle lors des travaux de réhabilitation, ni l'utilisation de plantes indigènes mais il recommande l'utilisation de plantes pionnières originaires et endémiques des massifs miniers ainsi que la conservation d'îlots de végétation naturelle pour favoriser la dissémination d'espèces secondaires locales (*Laroche, 2011*).

Premiers essais de revégétalisation et méthodes actuelles

Après plusieurs essais ratés de revégétalisation à base d'espèces exotiques : *Acacia*, *Poeceae Pinus Caribaea* (*Jaffré et Latham, 1976*) (*Annexe VII*) et indigènes : *Acacia spirorbis*, *Casuarina collina* (*Cherrier, 1990*), ce n'est qu'en 1988 que certaines plantes endémiques sont testées. L'utilisation d'espèces pionnières locales et mieux adaptées au milieu permet d'offrir des résultats intéressants tout en minimisant l'apport d'engrais, l'invasion d'espèces allochtones ainsi que l'implantation d'espèces locales grégaires et invasives ayant tendance à créer des groupements monospécifiques (*Pelletier et Esterle, 1995*).

Aujourd'hui les sociétés d'extraction de Nickel ont chacune leurs propres stratégies. La SLN, Société Le Nickel, travaille directement avec une société spécialisée dans la revégétalisation : la Société internationale de réhabilitation et d'aménagement des sites du Pacifique (Siras-Pacifique) depuis la récolte des graines et l'élevage des plants en pépinière jusqu'à la plantation ou l'ensemencement hydraulique (hydroseeding). Elle peut ainsi planter presque exclusivement des plantes endémiques (92 %), 300 000 plants qui ont été mis en place depuis 1993 par cette société. La SMSP, Société Minière du Sud Pacifique, travaille avec de petites entreprises qui s'occupent principalement de la mise en place des plants (exotiques ou locales à croissance rapide) récupérés chez les pépiniéristes. VALE-Nickel, a mis en place une pépinière d'espèces endémiques avant le début de l'exploitation minière « Revégétalisation anticipée », puisque 30 000 plants d'espèces endémiques (dont les espèces rares de gymnospermes *Retrophillum minor* et *Araucaria muelleri*) ont été élevés en pépinière et un début de plantation a été réalisé autour de la base-vie, sur d'anciens stocks de latérites et des versants dégradés. (*Sarrailh., 2002*).

La réapplication de topsoil sur sols décapés est considérée comme la méthode de revégétalisation la plus efficace mais encore peu appliquée en Nouvelle-Calédonie (*Williamson and al., 1982; Van Kekerix and Kay, 1986; Bradshaw, 1997; Tordoff et al., 2000*) pour des raisons d'organisation et financières. Des programmes de recherche évaluent actuellement cette technique qui permettrait l'implantation d'espèces indigènes locales adaptées au milieu, une meilleure diversité spécifique et le développement naturel de symbioses mycorhiziennes. Cette technique, couplée à l'ensemencement hydraulique et la

plantation, permettrait d'accélérer le processus de revégétalisation et d'augmenter ses chances de réussite.

Quoiqu'il en soit, la revégétalisation devra concilier des moyens budgétaires très limités avec un minimum de restauration écologique et des surfaces à traiter importantes. Pour l'instant, on se heurte encore à la difficulté de fourniture en quantités suffisantes de graines d'espèces locales et à leur prix (Sarrailh, 2002).

Focus sur l'ensemencement hydraulique ou hydroseeding

Développée au début des années 1990, une technique d'ensemencement hydraulique (*hydroseeding*) (Annexe VIII) permet de projeter les semences à l'aide d'un hydrosemoir (Hydroseedeur), en mélangeant celles-ci avec du mulch, de la colle végétale et des engrais organiques ou minéraux. On peut ainsi traiter rapidement de grandes superficies à dénivelés importants, impraticables ou difficiles d'accès y compris sur les fortes pentes que présentent les versants. Elle permet aussi de végétaliser des substrats assez rocheux ou la plantation pourrait s'avérer difficile et réduit les coûts et les temps de travaux liés à la plantation. Elle nécessite cependant d'énormes quantités de semences, limitées par la production locale et le prix de la collecte manuelle, et les résultats sont encore aléatoires (Laroche, 2011).

Dans le but d'optimiser les chantiers de revégétalisation par hydroseeding, le programme de recherche CNRT tente d'élaborer une technique d'apport combiné de graines et de spores d'AMF (Arbuscular Mycorrhizal Fungus). En effet, les chercheurs sont de plus en plus conscients du rôle des AMF dans la restauration des sols contaminés par des polluants (Vavrek & Colgan, 2003).

I.2. La mycorhization contrôlée par enrobage des graines : un élément essentiel à la revégétalisation

I.2.1. Mycorhizes et rôle dans le développement des plants

Les endomycorhizes

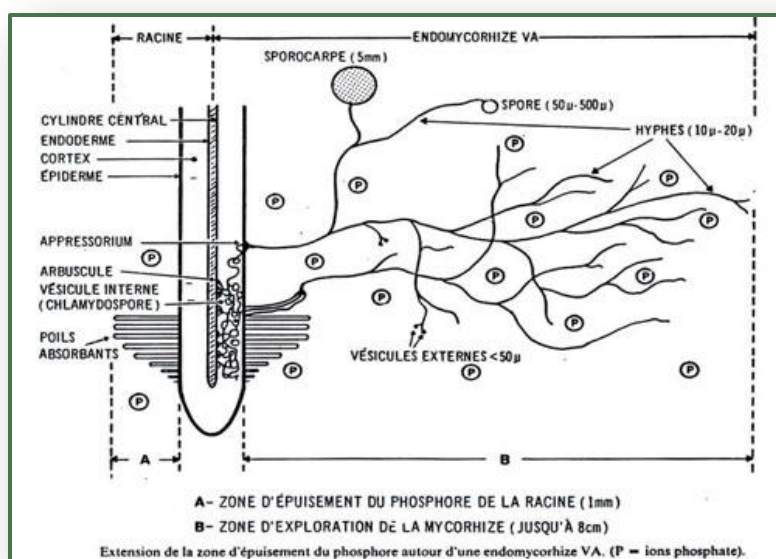


Figure 3 Volume d'exploration racinaire et mycorhizien du sol (<http://www.iftech.fr/Files/18760/S5000-shema.jpg>).

gloméromycètes (Schüßler *et al.*, 2001). Ils se développent initialement dans le sol puis

Les champignons mycorhiziens (Annexe IX) sont des symbiotes obligatoires. Il existe sept ou huit types d'associations, plantes-mycorhizes en fonction du type de structures intra et extra-radicales (Bianciotto *et al.*, 2000) dont seulement deux sont représentées en Nouvelle-Calédonie.

Nous nous intéressons au cas des mycorhizes endotrophes à arbuscules appartenant au phylum des

pénètrent dans les racines hôtes pour s'insinuer dans les tissus des racines jusqu'au parenchyme cortical où le mycélium pénètre dans les cellules pour repousser le cytoplasme sans jamais le traverser. Ils ne forment que très rarement des fructifications visibles à l'œil nu. Bien qu'ils soient symbiotes obligatoires, ils peuvent se conserver et se propager dans le sol grâce à des spores résistantes qui se forment généralement sur ou à proximité des racines.

En produisant une importante quantité de filaments mycéliens, ils ont un rôle d'interface entre la plante et le sol. Ce réseau multiplie le volume d'exploration autour de la plante (Fig.3) et ces filaments récupèrent les éléments nutritifs de façon plus efficace que les racines puis les transmettent à la plante en échange de composés carbonés. Ils jouent un rôle central dans la nutrition phosphatée de la plante (Smith & Read, 2008). D'ailleurs, 80% des espèces de plantes terrestres (Brundrett, 2009) et 94% des familles d'angiospermes sont mycorhizées dans le milieu naturel et leur absence est très rare (Merryweather et Fitter, 1995). Il a été montré, grâce à des mutants, que la colonisation racinaire est en partie contrôlée génétiquement par les AMF (Parniske, 2008). Cependant, aucune étude n'a été faite sur la manière dont la plante gère cette colonisation (Smith & Smith, 2011).

Endomycorhizes et croissance de la plante

De nombreuses études ont été réalisées sur l'impact de la mycorhization des plantes sur leur croissance et des résultats très variables ont été obtenus en fonction des conditions environnementales (sols, lumières,...), des souches de champignons mycorhiziens et des plantes utilisées (Cavagnaro et al., 2004 ; Facelli et al., 2010 ; Jones & Smith, 2004 ; Smith, 1980). La MGR (Mycorhizal Growth Response) peut être positive, lorsque l'absorption de phosphore ou d'autres éléments nutritifs est accrue par la voie mycorhizienne. Elle est aussi parfois négative lorsque la biomasse fongique est trop élevée ou lorsqu'elle est indépendante des échanges de phosphore et carbone (Smith & Read, 2008). De plus, un changement de sol peut affecter la croissance des plantes non mycorhizées sans avoir aucun impact sur celle des plantes mycorhizées (Schroeder & Janos, 2004). En effet, en plus d'avoir un effet direct sur la croissance de la plante, les champignons mycorhiziens induisent des changements physico-chimiques et microbiologiques dans la myco-rhizosphère (Hinsinger et al., 2009; Lambers et al., 2009) (Annexe IX).

Par ailleurs, il a été montré que la mycorhization est aussi fonction de la teneur en éléments nutritifs dans les sols et une concentration forte en certains induit une diminution du taux de mycorhization en général (Marschner & Cakmak, 1986). En effet, la plante conservant son mode d'absorption direct par les racines et l'épuisement en P de la rhizosphère se faisant plus lentement (Fig.3), la mycorhization n'est pas nécessaire à la plante. Des études montrent qu'à une concentration en P de 50 mg/kg, la colonisation par les mycorhizes est maximale, alors qu'elle est réduite à une concentration de 100 mg/Kg (Amijee et al., 1989).

I.2.2. Rôle des AMF sur sol UMF

Rôle dans la disponibilité en Phosphore

Les sols ultramafiques sont des sols carencés en P. Ils le sont d'autant plus une fois décapés par l'extraction minière mais aussi et surtout parce qu'ils sont riches en oxydes de fer et d'aluminium. En effet, les oxydes et hydroxydes fixent les ions phosphates dans les sols (Borggaard, 1983). La carence en phosphore explique en partie l'absence de reprise végétale sur ces sols. Or, il semble que sur sol ultramafique, la mycorhization provoque une nette augmentation du transfert de phosphore vers la plante, résultant en une meilleure croissance de celle-ci (Doubkovà et al., 2012 ; Doherty et al., 2008). En plus d'augmenter l'interface sol/plante, les champignons mycorhiziens des sols UMF permettent d'accentuer la

solubilisation du phosphore par sécrétion racinaire d'acides organiques (*Gaur and Adholeya, 2004*).

Rôle dans la protection face aux métaux lourds

Les AMF des sols ultramafiques se sont adaptés à de fortes concentration en Ni puisqu'il le tolère bien mieux (*Perrier et al., 2006*). Certaines espèces de *Glomus* résistent à des concentrations jusqu'à 3 fois supérieures que d'autres *Glomus* (*Amir et al., 2008*). En effet, ils modifient les entrées et sorties des métaux de la plante, se comportant ainsi comme une protection pour celle-ci face à des sols toxiques. Ainsi, bien que toutes les plantes qui se développent sur des sols contaminés accumulent des quantités importantes de métaux lourds dans leur racines (>10 000ppm), cette accumulation est bien moins élevée dans les racines de plantes mycorhizées par des AMF adaptés à ce type de sol (*Cuenca et al., 2001*). Elles permettent la fixation des métaux dans les membranes cellulaires du champignon (*Franco et al., 2004*) ou la sécrétion d'oxalates pour bloquer les ions métalliques dans les sols (*Fomina et al., 2005*) ou encore un stockage dans la plante entière. Différentes voies métaboliques semblent permettre à la plante mycorhizée d'être plus tolérante à la toxicité du sol. Ainsi sur 39 publications traitant de la lutte contre la toxicité des métaux lourds, 84% montrent que les plantes mycorhizées s'adaptent mieux aux sols pollués que celles non mycorhizées (*Amir et al., 2010*).

Il a été montré que les AMF sont naturellement abondants sur sols ultramafiques ou similaires (*Amir et al., 1997; Turnau & Mesjasz-Przybylowicz 2003; Perrier et al., 2006; Gonçalves et al., 2007; Jourand et al., 2010*). Cependant, on note une diminution nette du développement de la symbiose (moins de spores, de germination et de colonisation) (*Amir et al., 2007; Gustafson & Casper, 2004; Jarstfer et al., 1998*) et une diversité amoindrie par rapport à d'autres types de sols (*Pawlowska et al., 1996; Regvar et al., 2001*).

Il semble que les bactéries PGPR, comme les AMF ont un effet sur l'assimilation d'éléments nutritifs ainsi que sur la tolérance aux stress métalliques stimulateur lorsque leur présence est combinée à celle des AMF (*Vivas et al., 2005; Ma et al., 2006*). Ces pistes d'études sont au cœur de la recherche dans le domaine des mycorhizes à l'heure actuelle. L'ensemble de ces éléments prouve finalement l'intérêt que peuvent avoir les AMF en revégétalisation et en phytoremédiation de sites pollués par l'activité humaine (*Schützendübel & Polle 2002; Hildebrandt et al 2007; Khade & Adholeya 2007*) d'autant plus que différentes études rapportent un intérêt des AMF vis-à-vis de la tolérance aux maladies et/ou à la sécheresse, dont les mécanismes semblent distincts de l'approvisionnement nutritif indirect (*Johnson et al., 1997; Jones & Smith, 2004; Newsham et al., 1995, Strullu, 1991*).

L'utilisation des mycorhizes serait donc un moyen efficace pour augmenter les rendements des chantiers de revégétalisation (*Vogelsang et al., 2004*). En effet, certaines espèces pionnières des maquis miniers, comme les cypéracées (*C.comosa*), semblent être dépendantes des mycorhizes dans des milieux appauvris en nutriments, comme sur les sols UMF de Nouvelle-Calédonie (*Muthukumar et al., 2004*).

I.2.3. Aspects techniques et pratiques de la mycorhization contrôlée, appliquée à la restauration écologique des terrains miniers.

Les terrains miniers décapés, même anciens, ne montrent aucune présence de spores MA, ni de propagules ectomycorhiziens (*Amir et al., 1997*). C'est pourquoi il est nécessaire d'assurer la mycorhization des plants avant leur plantation et celle des graines au moment du semis. C'est le moyen le plus efficace d'assurer l'apport en mycorhize et donc d'augmenter

l'adaptation des plants et des plantules sur ce type de sol. Pour cela, il faut commencer par vérifier l'affinité des espèces végétales vis-à-vis des champignons. Ensuite il faut récupérer un échantillon de sol riche en petites racines dans un maquis peu dégradé sous une espèce végétale réputée pour être bien mycorhizée (*Xanthostemon*, *Alphitonia*, *Dodonea*, ...) et en déposer quelques grammes sur les racines de semis. Il est possible d'avoir un inoculum dense et efficace en procédant à une phase préalable de multiplication d'un inoculum sur plantes hôtes en conditions semi-contrôlées. Cela peut permettre d'obtenir des résultats encore plus intéressants.

Par ailleurs, la culture *in vitro* d'AMF donne de bons résultats mais l'efficacité des propagules dans des conditions défavorables, tel que site minier, reste incertaine et certains AMF perdent leur infectiosité après succession de plusieurs générations de culture (*Plenchette et al.*, 1996). Par ailleurs, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, la culture d'AMF est importante à réaliser pour préserver la biodiversité fongique (*Diop*, 2003).

En Afrique, des études visent à améliorer le potentiel mycorhizien des sols en introduisant dans le milieu des espèces qui enrichissent les sols en spores de champignons MA (*Duponnois et al.*, 2007), un procédé qui pourrait être adapté aux maquis miniers puisque les mycorhizes y jouent un rôle essentiel dans le développement des plantes et leur résistance aux métaux. En effet leur potentiel mycorhizien est lié à l'écologie mais aussi à l'origine phylogénétique de l'espèce (*Miller et al.*, 1999). Cependant les tentatives de mycorhization des sols *in situ* qui ont été réalisées à de par le monde, donnent des résultats généralement décevants. Ainsi l'enrobage de semences avec un inoculum mycorhizien est une technique prometteuse bien qu'elle nécessite encore des mises au point.

I.2.4. L'alginate : un matériel intéressant pour l'enrobage de graines d'espèces endémiques avec spores d'AMF, utilisées en revégétalisation par hydroseeding

Origine et structure de l'alginate

Extrait principalement d'algue brune (*Laminaria*, *Ascophylum*,..) (*Annexe XI*) mais aussi produit par certaines bactéries, l'alginate est un polysaccharide linéaire, anionique, non toxique, composé de monomères d'acides guluronique et mannuronique reliés par des ponts oxygènes. Il existe une grande diversité d'alginate qui se différencient par la proportion des deux acides, leur répartition, leur poids moléculaire et leur pureté (*Goujon*, 2004). On les trouve sous forme de poudre blanche à dissoudre dans l'eau portée à ébullition.

En présence de cations divalents ou trivalents, l'alginate est capable de former un hydrogel par interaction entre cations et groupements carboxylate des monomères (*Annexe XII*). On appelle cela la gélification ionotropique (*Mjahed*, 2009). Le sel de cation le plus utilisé est le chlorure de calcium CaCl_2 (*Ouwerx*, 1998). La gélification correspond donc à la formation d'un réseau tridimensionnel composé d'une succession d'« egg-box » reliées par des segments polysaccharidiques selon la composition de chaque segment en monomères d'acides mannuronique et guluronique (*Vincent*, 2010).

Propriétés mécaniques et physico-chimiques de l'alginate

Les propriétés mécaniques des gels d'alginate (rigidité, viscosité, gonflement/rétrécissement, densité du réseau) dépendent de la concentration en alginate, de la composition de l'alginate, de sa masse moléculaire mais aussi de la nature de l'ion divalent utilisé pour la polymérisation. Par exemple, l'affinité Alginate/ Cu^{2+} est 10 fois plus élevée que Alginate/ Ca^{2+} , et plus l'affinité est grande moins le gel est homogène et poreux (*Ouwerx*,

1998). Le pH de l'eau dans laquelle sont dissous les cristaux d'alginate peut avoir une influence sur le gel : en dessous de pH 4 le volume du gel est réduit et au-dessus de pH 10 il augmente du fait de la répulsion électrostatique jusqu'à dissociation à partir de pH 12 (Velings & Mestdagh, 1995). Il est aussi possible d'obtenir de meilleures propriétés mécaniques en diminuant la température de réaction, induisant ainsi une diminution de la diffusion des cations divalents et donc une augmentation du temps de gélification permettant la formation d'une structure tridimensionnelle plus ordonnée et donc plus résistante.

Par ailleurs, une fois formé, le gel d'alginate est insoluble dans l'eau et stable dans une gamme de température allant de 0 à 100°C. La dégradation de l'alginate se fait par expulsion très lente des ions calcium hors du gel (Bashan, 1986). Cependant une dissolution rapide est envisageable par déplacement des ions Ca^{2+} à l'aide d'agents chélateur comme l'EDTA, le lactate, le tampon phosphate 7,4 ou encore des concentrations très fortes en ions Na^+ ou Mg^{2+} (Mjahed, 2009).

Utilisation générale de l'alginate

L'utilisation d'alginate est une pratique courante et ancienne en Extrême-Orient, notamment dans l'alimentation. Si la consommation en l'état reste rare en Occident, le marché principal de ces algues reste celui de l'agro-alimentaire puisque les alginates sont d'intéressants épaississants et gélifiants. Aujourd'hui son utilisation s'est répandue dans de nombreux domaines : l'aéronautique, l'industrie pharmaceutique et biotechnologique qui s'intéressent aux propriétés rhéologiques des gels obtenus (Vincent, 2010) et l'industrie tissulaire l'utilise pour la micro-encapsulation de cellule lors de l'élaboration de tissus artificiels (Mjahed, 2009) ou encore l'encapsulation de protéines (Léonard, 2002). A titre d'exemple cette technique est très utilisée pour la culture de chondrocytes dans le traitement de l'arthrose (Häuselmann et al., 1994).

L'alginate pour l'encapsulation de micro-organismes

Ces propriétés particulièrement intéressantes n'ont pas échappé au monde de l'agriculture qui s'est aussi attelé à étudier l'encapsulation d'organismes pour diverses fins. En effet, dès 1989, l'équipe de Janick et al., a mis au point une technique de production de graines artificielles de carottes en enrobant, dans un gel d'alginate, des embryons obtenus par culture *in-vitro*. Une dizaine d'années plus tard une équipe (Shah et al., 1998) obtient des résultats satisfaisants dans un essai d'encapsulation d'hyphes du champignon pathogène de pucerons, *Erynia neoaphidis*, pour permettre une lutte biologique contre ce ravageur.

Après d'intéressants résultats de mycorhization par inclusion de mycélium produit en fermenteur dans une matrice polymère (Le Tacon et al., 1983), Declerck et al. (1996) montrent que les spores d'AMF sont capables de mycorhizer les plants après avoir été encapsulées dans des billes d'alginate. La technique est reprise en 2000 et 2003 en Turquie et montre qu'il est possible d'immobiliser des micro-organismes dans les billes d'alginate et de les utiliser comme absorbant biologique pour l'élimination efficace de métaux lourds à partir de solutions aqueuses (Arıca et al., 2003). C'est ensuite au tour des PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria), récemment découvertes, d'être encapsulées dans des microbilles d'alginate pour une inoculation réalisée avec succès de plants de tomates (Bashan et al., 2002). Plusieurs utilisations de poudres de microbilles séchées d'alginate encapsulant des inoculum ont d'ailleurs été décrites (Douds et al., 2004).

Malgré tous ces résultats très prometteurs, un problème reste à résoudre. En effet, les résultats d'inoculation par apport de billes d'alginate contenant des micro-organismes bénéfiques sont relativement satisfaisants lors de ces expériences en conditions contrôlées, cependant la projection de ces microbilles par l'hydroseeder entraîne une dispersion de celles-ci qui peuvent alors tomber à plusieurs centimètres des graines. Ce qui, dans le cas des

spores de champignons mycorhiziens, pourrait être fatal puisqu'ils sont des symbiotes obligatoires et pourraient mourir le temps que leurs filaments traversent la distance qui les sépare de racines. Ainsi la technique serait inutile (Bashan et Gonzalez, 1999). Par ailleurs il a été constaté que lorsqu'on ajoute un hydrocolloïde comme l'alginate dans la cuve de l'hydroseedeur on obtient de meilleur taux de germination des graines du fait s'une plus forte adhésion au sol (Merlin et al. 1999). Les conditions modérées pour l'immobilisation et sa simplicité sont des raisons qui expliquent que l'alginate de sodium est la matrice d'immobilisation la plus couramment utilisée (Idris et Suzana, 2006 ; Taqieddin et Amijee, 2004).

C'est pourquoi, l'équipe du LIVE, cherche à utiliser les propriétés de l'alginate pour élaborer une technique d'enrobage direct des graines d'espèces endémiques contenant des spores d'AMF, puis tester son efficacité en serre et sur le terrain.

II. Matériels et méthodes

II.1. Matériel vivant

II.1.1. Matériel végétal

Costularia comosa

De la famille des cypéracées, *Costularia* est une espèce endémique, pionnière des maquis miniers et elle constitue, sur massifs ultramafiques la principale composante de la flore herbacée. On la trouve sur toute la Grande Terre, mais plus particulièrement sur sols bruns hypermagnésiens et sur sols latériques, entre 50 et 1000m d'altitude (Annexe XIII). Les graines ne présentent pas de dormance et peuvent être mises à germer entre 20 et 35°C, sans prétraitement nécessaire (L'huillier et al., 2010). S'agissant d'un akène, la description de la semence est basée sur le fruit. Ovale de taille très réduite, environ 2-3mm de longueur et 1mm de largeur au centre de l'ovale, le fruit est souvent accompagné d'un petit plumet (Fig.4) (Zongo 2010).

1000graines triées = 0,2- 0,28g.

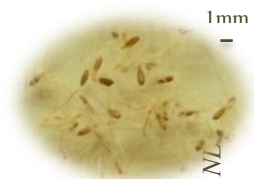


Figure 4 Graines de Cco

Alphitonia neocaledonica

De la famille des rhamnacées, *Alphitonia neocaledonica* est endémique de la Nouvelle-Calédonie où elle est largement répandue dans le sud de la Grande Terre. Il se trouve sur sols bruns hypermagnésiens de l'ensemble des massifs miniers et plus spécifiquement sur sols ferrallitiques entre 0 et 1000m d'altitude (Annexe XIV). Ces graines présentent une forte dormance physique. Il est nécessaire de lever cette dormance, après avoir extrait les graines, par deux ébouillantage successifs de 5 min avant de mettre à germer entre 25 et 35 °C. Toutes les graines viables germent en moins de 15 à 20 jours (L'huillier et al., 2010). Les graines sont ovales aplaties d'environ 0,5-0,6x 0,2-0,3 pour 1,5mm d'épaisseur avec une extrémité plus rectiligne. D'un aspect lisse et luisant noir, elles sont recouvertes d'un arille de couleur



Figure 5 Graines d'Ane

rouge qui s'effrite facilement à la main (Fig.5) (Zongo, 2010). L'individu adulte est un arbre mince et élancé de 1 à 3m, de cime ronde et dont l'écorce est blanche marbrée assez lisse. 1000 graines = 22-23g

Gymnostoma deplancheanum

De la famille des casuarinacées, *Gymnostoma deplancheanum* est une espèce endémique de la Nouvelle-Calédonie. Il se développe sur sols bruns hypermagnésiens et plus particulièrement sur les serpentinites au pied des massifs miniers mais ne dépasse cependant que très rarement les 600m d'altitude (Annexe XV). Peu présente dans le grand Sud, il se trouve pourtant sur presque tous les substrats ultramafiques de la Grande Terre. Ces graines n'ont pas de dormance et germent en 15 jours entre 22 et 29°C (L'huillier et al., 2010). L'individu adulte est un arbuste ou un arbre de 3 à 6m. Les graines sont fortement ailées à 2/3 de la surface et marron clair. Elles mesurent environ 1cm de long, 4mm de large et sont bombées au niveau de l'embryon (Fig.6) (Zongo, 2010).

1000graines = 2,7 – 5,7g

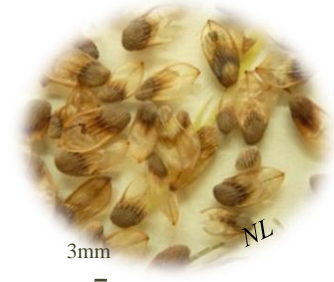


Figure 6 Graines de Gde

Dodonea viscosa



Figure 7 Graines de Dvi

De la famille des sapindacées, il est indigène de la Nouvelle-Calédonie mais très largement répandu sur l'ensemble du territoire aussi bien sur maquis minier qu'en forêt sèche (Annexe XVI). Elle se développe comme plante pionnière sur les sols bruns hypermagnésiens, sur latérites ou sur terrains volcano-sédimentaires mais surtout en basse altitude : moins de 500m et très rarement jusqu'à 800m d'altitude (L'huillier et al., 2010). Les graines sont sphériques/ovalloïdes d'environ 3mm de diamètre et 2mm d'épaisseur et présentent une forte dormance physique qu'on lève par ébullition court (inférieur à 1min) dans les expériences réalisées, mais qu'il est possible de lever par scarification (Fig.7) (Baskin et al., 2004). Toutes les graines viables germent en 30 jours. Le test de viabilité met en évidence un embryon spiralé caractéristique de l'espèce.

1000graines = 4 - 7g.

Sorghum vulgare

De la famille des poaceae (graminée) (Annexe XVII), il est très utile comme plante modèle car sa croissance et sa capacité à être mycorhizé (Lendzemo, 2009). Il s'agit de la 5^{ème} céréale mondiale en terme de production et elle est cultivée soit comme fourrage soit pour ses grains. Les graines sont des caryopses de 4 mm environ, de forme sphérique (Steinbach et al., 1997).

Lots de graines SIRAS

Les lots de graines utilisés ont été fournis par la SIRAS. Les taux de germination ont été réalisés dans leurs locaux, après récolte, puis conservés dans des enveloppes, placées au froid sec 5°C jusqu'à utilisation. Au cours des différentes expériences réalisées, deux lots différents ont été utilisés, ce qui peut expliquer certaines différences dans les résultats.

Le taux de viabilité de chaque lot est réalisé : sur 4x25 graines en présence de tétrazolium TTC 1% chlorure. Les graines sont coupées en deux, chaque moitié est disposée dans une boîte de Pétri en verre contenant une feuille de papier Whatman® imbibée de

solution de chlorure de tétrazolium (2,3,5-triphenyl tétrazolium à 1% dans Tampon Phosphate à pH 7 (m/v)). La face coupée de la graine doit être en contact avec le papier imbibé. Les graines sont incubées à température ambiante pendant 24-48h à l'obscurité. Les enzymes de la respiration (réductases) sont actives et permettent la réduction des cofacteurs (NADPH + H⁺, NADH + H⁺ et FADH + H⁺) ainsi que la réduction du sel. Le sel de tétrazolium oxydé a une couleur jaune et lorsqu'il est réduit, une coloration rose apparaît. Enfin s'effectue l'observation de la coloration de la radicule et des cotylédons : si l'embryon est rouge, la semence est viable (*L'huillier et al., 2010*).

II.1.2. Les spores d'AMF et leur extraction

Les spores d'AMF utilisées proviennent de souches pures isolées au LIVE et nommées en fonction de l'endroit où elles ont été récoltées. Ces souches sont annuellement multipliées par culture Trappe (*Trappe, 1977*) adaptée aux AMF, en serre, sur sorgho. Cette méthode consiste à inoculer chaque année, les plants de sorgho par ajout de quelques grammes de terre contenant la souche pure obtenue dans la culture précédente ; puis de récupérer, sécher et conditionner en sachet le contenu du pot (racines et terre) après plusieurs mois de culture. Les souches utilisées dans les expériences réalisées lors de ce stage sont présentées en (*Tab.1*).

Tableau 1 Souches pures de spores d'AMF utilisées

Sol ou plante d'origine	Appellation finale	Date inoculation
<i>Psychotria baillonii</i> 3-4-5 (Koghi)	PSB2	11/12/12
<i>Psychotria oleoides</i> (Demazures)	PSO 1	10/12/12

Pour l'extraction des spores, on utilise des tamis de 350 µm 160 µm et 36 µm bien propres (lavées avec de l'éthanol 70°GL et éventuellement au bain à ultrasons) pour le tamisage humide du sol. On récupère les spores, retenues dans le petit tamis, en suspension dans de l'eau. On met environ 25mL de cette suspension dans un (ou plusieurs) tube(s) à centrifuger, dans lequel on ajoute, délicatement à l'aide de la seringue prolongée d'un tuyau, environ 25mL de la solution de saccharose **SOUS** la suspension de spores, sans secouer ni mélanger. Les tubes sont ensuite centrifugés à 800rpm (tour/mn) pendant 5mn. On récupère alors les spores, qui se retrouvent à l'interface des 2 solutions, avec une pipette de 5mL et on les transfère dans le petit tamis de 36 µm. Elles y sont rincées en passant le tamis sous l'eau pour enlever le sucre et récupérées dans un verre de montre pour être trier, compter, (*Annexe XVIII*).

II.2. Amélioration du protocole d'enrobage

Après avoir testé différents matériaux, un premier protocole d'enrobage avec spores de champignon mycorhizien a été mis en place par le LIVE. Toutes les expériences réalisées ici visent l'amélioration de ce protocole puisqu'il ne permet pas, aujourd'hui, un recouvrement satisfaisant des semences et peut diminuer les taux de germination (*Zilliox, 2011*).

II.2.1. Conditions de manipulation

L'enrobage des graines est réalisé dans les conditions les plus stériles possibles. En effet, des contaminations trop importantes peuvent conduire au pourrissement des graines enrobées et donc à une difficulté d'interprétation des résultats et à de grandes difficultés de lecture de la germination des spores.

Pour cela les graines étudiées sont enrobées sous hotte à flux laminaire vertical et tout le matériel (boîtes de pétri, pinces, bécher, cônes...) mais aussi les solutions (alginate, CaCl_2) utilisés sont autoclavés 20min à 121°C. Les conditions de manipulation stérile sont respectées : tout le matériel entrant sous la hotte est stérilisé, les mains lavées au savon antibactérien puis passées à l'alcool. Les graines sont désinfectées par un bain de 5 min dans l'alcool à 70°GL avant enrobage.

II.2.2. Protocole d'enrobage et variables à tester pour son amélioration

On utilise une solution d'alginate de concentration à définir en g/L (grammes de cristaux d'alginate/litre d'eau distillée stérile (EDS)) que l'on plonge dans une solution de CaCl_2 à 0,1M (soit 1,11g/100mL). Le mélange graines-spores-alginate est prélevé avec une micropipette de 5mL sur laquelle on a installé un cône dont l'extrémité a été coupée en fonction de la taille de la graine, soit d'un diamètre supérieur d'un millimètre au « diamètre » de la graine (Fig. 8) (Annexe XIX). Les spores ont été extraites préalablement en quantité suffisante pour que chaque graine enrobée porte environ 100 spores (Zilliox, 2011).

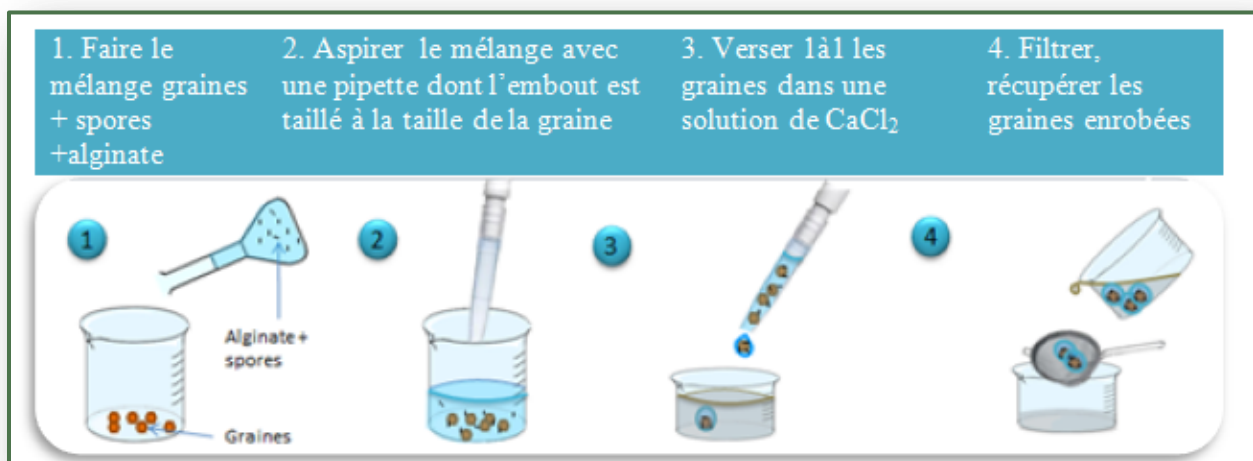


Figure 8 Protocole d'enrobage des graines par l'alginate de Sodium à la micro-pipette

Pour améliorer l'enrobage obtenu avec ce protocole, les différentes modalités testées sont détaillées dans les paragraphes qui suivent.

La concentration de la solution d'alginate

Nous cherchons ici la concentration de la solution d'alginate adéquate pour un enrobage de qualité qui ne gênerait toutefois la germination des spores ni des graines. Des concentrations d'alginate inférieures à 10g/L ayant donné des résultats insuffisants en terme de qualité de l'enrobage et un test à 20g/L ayant diminué fortement la germination des graines, on cherche un compromis entre ces deux concentrations (Zilliox, 2011). Pour cela, nous avons choisi de tester ici les concentrations C0 : pas d'enrobage, C10 : 10g/L d'alginate (concentration témoin), C12,5 : 12,5g/L et C15 : 15g/L. Par la suite, il a été décidé d'étudier la concentration intermédiaire de 12,5g/L, mais malheureusement cela a été fait sur un lot de graines différent.

Le pH de l'eau distillée utilisée pour la solution d'alginate

Nous cherchons à savoir si le pH de l'eau distillée utilisée pour dissoudre les cristaux d'alginate et obtenir la solution d'alginate (EDSA) (étape 3, Annexe XIX) peut jouer sur la qualité de l'enrobage et sur la germination des graines et des spores. Les pH testés seront pH7, pH7,5, pH8, pH9 et le pH de l'EDS soit pH~6,4 pour le témoin. Ces pH seront testés pour une concentration d'alginate à 10g/L.

La technique d'enrobage

Selon la graine à enrober, la qualité de l'enrobage avec la technique « micropipette » est parfois décevante. D'autres techniques d'enrobage ont donc été réfléchies et étudiées. Seule la technique présentant des résultats intéressants sera traitée dans ce rapport : il s'agit d'une technique d'enrobage en « gâteau », qui consiste à enrober le lot de graines dans une matrice d'alginate contenant des spores d'AMF en versant directement la solution de CaCl₂ sur le mélange alginate-graines-spores et en récupérant les graines ainsi enrobées une à une avec un emporte-pièce de taille adaptée à la graine (Fig. 9).

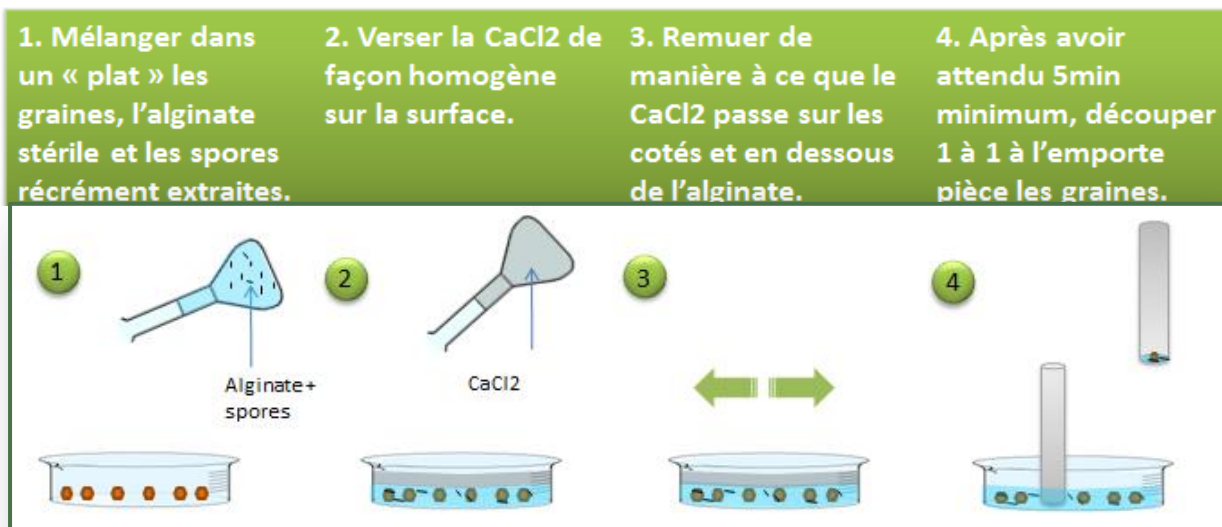


Figure 9 Protocole d'enrobage en gâteau des graines par l'alginate de sodium

II.2.3. Estimation de la qualité de l'enrobage



$$R(\%) = \frac{N1*12,5+N2*50+N3*85,25+N4*100}{Ntotal}$$

Figure 10 Evaluation du taux de recouvrement des graines d'une modalité

enrobage qui recouvre au moins 75% de la graine.

Pour estimer la qualité de l'enrobage à chaque modalité testée, les 20 graines enrobées de chacune des 4 répétitions sont réparties dans les classes suivantes 100%, [75-100% [, [25-

La qualité de l'enrobage est directement dépendante du pourcentage de recouvrement de la surface de la graine puisqu'en séchant, l'enrobage se durcit autour de celle-ci. On considère qu'à partir de 75% de la surface de la graine recouverte, l'enrobage a de grande chance de tenir lors du processus d'hydroseeding. On appellera donc « enrobage de qualité », un

75[et [0-25% [de la surface recouverte par l'enrobage (Fig. 10). A partir du nombre de graines estimé dans chaque classe, on détermine un taux de recouvrement, qui correspond à une moyenne pondérée de chaque classe, pour faciliter les tests statistiques.

De manière à limiter au maximum la subjectivité de l'observation, les graines enrobées sont réparties dans les boîtes de Pétri pour germination, la modalité et le numéro de répétition notés sur le côté du couvercle, les boîtes sont mélangées et l'observation réalisée aléatoirement.

II.2.4. Suivi de germination des graines enrobées

Pour l'ensemble des paramètres testés, pH et concentration, 80 graines sont enrobées et réparties pour avoir 4 répétitions de 20 graines. Après enrobage, elles sont mises à germer en boîtes de Pétri sur coton humide préalablement autoclavées, puis placées à l'étuve 25°C, lumière continue, jusqu'à obtention du plateau de germination. Le coton est régulièrement humidifié de manière à ce qu'il ne soit jamais sec ni inondé. Tous les 2-3 jours on compte le nombre de graines germées. Une graine est comptée comme germée lorsqu'on peut observer un germe d'au moins 1mm. Le suivi ne concerne pas l'adaptation et le développement des plantules.

II.2.5. Suivi de germination des spores

Coloration et comptage

Le taux de germination témoin est déterminé en mettant à germer 100 spores sur une membrane millipore déposée en boîtes de Pétri plastiques (Ø 4cm) stériles remplies de sable autoclavé, humidifié, puis fermées hermétiquement avec du parafilm. On les place ensuite en étuve 25°C à la lumière constante (Zilliox, 2011). On réalise ensuite un comptage des spores germées et non germées par observation au microscope (x40 ou x100) au bout de 25 jours.

Aux mêmes dates, on récupère trois enrobages présents autour des graines déjà germées dans les boîtes de pétri. L'enrobage est écrasé dans un verre de montre et plongé dans du bleu de trypan. Au bout de 5 à 10 min, l'enrobage est récupéré avec une pince et déposé sur une lame. On recouvre l'enrobage de quelques gouttes de glycérol pour éliminer le surplus de colorant et on l'écrase ensuite entre lame et lamelle, pour observer au microscope et compter le nombre de spores germées et non germées (Annexe XX).

Préparation du bleu de trypan et du lactoglycérol

Le Bleu de Trypan est un colorant vital qui pénètre les cellules mais qui ne peut être expulsé que par les cellules vivantes (processus nécessitant de l'ATP), il permet donc de colorer les tissus morts. Celui-ci étant toxique il sera manipulé avec soin et l'excédent récupéré dans la poubelle à produits toxiques.

Bleu trypan : 0.1% dans du lactoglycérol.

Lactoglycérol : acide lactique/glycérol (50/50 ; vol/vol)

II.3. Efficacité de la méthode d'enrobage des graines en termes de mycorhization des plants.

II.3.1. Conditions expérimentales

Des graines de sorgho sont enrobées selon le protocole d'enrobage à la pipette décrit en II.2.2 avec de l'alginate à 10g/L et environ 50 spores de PSO1 et 50 spores de PSB1 soit environ 100 spores d'AMF extraites comme indiqué en II.1.2. Pour assurer une plus grande

cohésion entre la graine, dont la surface est lisse, et l'enrobage qui n'est pas encore optimisé au moment du lancement de l'expérimentation, on scarifie légèrement les graines au papier de verre avant stérilisation et enrobage. Les graines ainsi enrobées sont mises à germer sur vermiculite sous éclairage en continu pendant quelques jours. En parallèle, des graines de sorgho sans enrobage sont placées à germer dans les mêmes conditions. Lorsque plus de 75% des plants ont formé leur deuxième feuille (6 jours) les plants sont transplantés en pot, à raison de un plant par pot et mis en serre selon 4 modalités décrites en II.4.2. On transplante 20 plants enrobés, 20 plants non enrobés pour les modalités Inoculation et 10 plants non enrobés de plus pour le témoin sans traitement.

La transplantation se fait dans des pots de 1L avec une toile au fond, reposant sur un sur-élévateur dans une soucoupe pleine d'eau pour éviter les fourmis. Les pots sont remplis de 800g à 1kg d'un mélange de « terre d'ici », récupérée sur le terrain de l'université et tamisée à 2mm, à laquelle on ajoute 20% de terreau « Agrofino® pot grand 40L univ. ». Le tout est préalablement autoclavé deux fois 1h à 121°C à 24h d'intervalle.

II.3.2. Modalités

Quatre modalités sont mises en place pour cette expérience : enrobage ou inoculation, ajout de phosphate ou rien (Tab. 2). Pour cela, une fois les plantules transplantées (Fig.11), on inocule celles qui n'ont pas été enrobées. L'inoculation se fait de la manière suivante : après extraction des spores (II.1.2.) verser une suspension de 5mL contenant 200 spores AMF environ autour de la plantule tout juste transplantée.



Figure 11 Photos des plantules de sorgho après transplantation

Par ailleurs, sur la moitié des pots inoculés et la moitié des pots dont les graines ont été enrobées, on ajoute 0,663g de phosphore, soit 500 Kg/ ha par pot, un mois après la transplantation, lorsque les pieds commencent à être vigoureux. Sur l'autre moitié des pots, on ne réalise aucun apport. On obtient ainsi quatre modalités et 10 pots par modalité. Sur les dix derniers pots on ne fait ni inoculation ni ajout de phosphate : il s'agit de la modalité témoin R qui permet de vérifier que dans aucune étape de l'expérience une mycorhization liée à une contamination n'est survenue. L'arrosage automatique est déclenché quotidiennement pendant 2min à 5h et 17h.

Tableau 2 Modalités de l'expérience en serre évaluant l'efficacité de la technique d'enrobage

Modalité	Caractéristiques correspondantes
EP	Enrobage des graines avant germination avec 100 spores d'AMF et ajout de phosphore (500kg/ha) 1 mois après
EØ	Enrobage des graines avant germination avec 100 spores d'AMF sans ajout de P
IP	Inoculation des graines non enrobées avec 200 spores d'AMF au moment de la transplantation et ajout de phosphore (500kg/ha) 1 mois après
IØ	Inoculation des graines non enrobées avec 200 spores d'AMF au moment de la transplantation sans ajout de phosphore
R	Aucun apport

II.3.3. Taux de mycorhization

Au bout de trois mois et demi, trois échantillons de racines de sorgho sont prélevés dans 5 pots représentatifs de chaque modalité. Seules les radicules et les racines fines sont prélevées car elles sont plus susceptibles d'être mycorhizées et plus facilement observables au microscope. Les échantillons de racines sont pris à trois endroits différents du système racinaire, légèrement en profondeur. Pour chaque pot, les trois échantillons de racines sont rassemblés et annotés. Les racines jeunes, bien blanches et épaisses, ne sont pas prélevées (couvertes de poils absorbants et non mycorhizées).

Coloration des mycorhizes

Les racines sont d'abord débarrassées des particules de terre au moyen d'un rinçage abondant à l'eau courante, dans une passoire. Elles sont ensuite placées dans des piluliers contenant une solution de KOH à 10% et mises à l'étuve (90°C, 1h). Après les avoir rincées à nouveau, sous l'eau courante, égouttées et replacées dans des piluliers, elles sont recouvertes d'une solution de bleu de trypan et mises à l'étuve 8 à 10min à 90°C. Elles sont ensuite, une fois de plus rincées abondamment et elles sont conservées dans de l'eau distillée avant le montage, à 4°C. Cette technique rapide fonctionne pour un grand nombre de plantes-hôtes.

Montage

On prélève des segments de racines colorées de quelques centimètres choisis au hasard. Pour quantifier les AMF, *Kormanik et McGraw (1982)* jugent nécessaire l'examen par plante de 30 segments racinaires d'une longueur de 1 à 3 cm. Ces segments sont montés parallèlement entre lame et lamelle par 10, dans de la glycérine.

Observation

Chaque fragment est soigneusement observé, sur toute sa longueur, au microscope, grossissements 100 et 400. Il existe plusieurs systèmes d'évaluation de l'importance de la colonisation mycorhizienne. On utilise ici le système proposé par *Trouvelot et al. (1986)*. Il consiste à noter par classe de 0 à 5 (Fig.12) l'estimation de la proportion de cortex colonisée par le symbiote mycorhizien pour chacun des 30 fragments racinaires observés. La présence des arbuscules et des vésicules est notée simultanément. On fera bien attention de différencier les DSE, champignons ascomycètes anamorphiques de couleur marron. La note de la densité du mycélium externe est attribuée de la façon suivante :

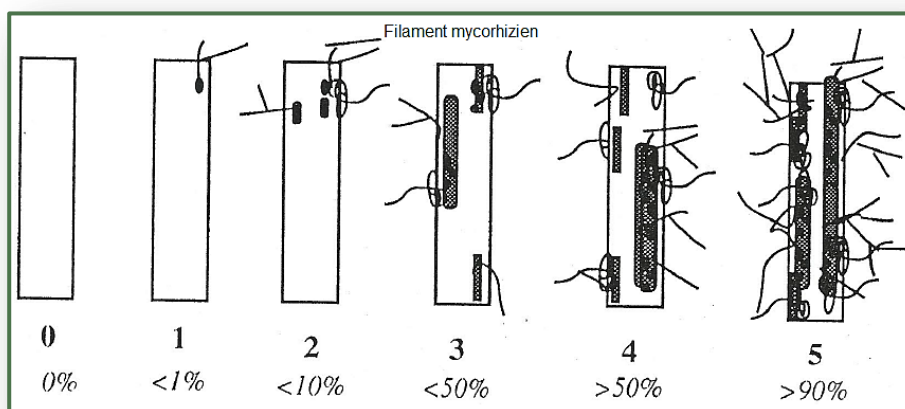


Figure 12 Notation du degré de mycorhization des fragments racinaires. L'échelle s'étend de 0 (pas de mycorhization) jusqu'à 5 (au moins 90% du fragment est mycorhizé) (Trouvelot et al., 1986).

Intensité globale de la mycorhization

Le paramètre qui traduit le mieux le degré de mycorhization et le suivant :

$$M(\%) = (95N_5 + 70N_4 + 30N_3 + 5N_2 + N_1) / N_{\text{total}}$$

Dans cette formule, N_n ($1 < n < 5$) représente le nombre de fragments mycorhizés notés n (ex : N_4 le nombre de fragments notés 4) et N_{total} le nombre total de fragments observés.

II.4. Stockage de graines enrobées avec des spores d'AMF

Cette expérience consiste à étudier la possibilité de conservation des graines ainsi enrobées avec des spores d'AMF dans l'alginate, dans le but d'une production à grande échelle.

II.4.1. Effet du séchage de l'enrobage sur la germination des graines

Pour connaître l'effet du séchage de l'enrobage autour de la graine sur le taux de germination des graines : 160 graines de Dvi, Cco et Ane sont enrobées. Une moitié est mise à germer en boîtes de Pétri (sur coton) précédemment autoclavé par lot de 20, et l'autre moitié est laissée sous la hotte à flux laminaire vertical une nuit pour le séchage de l'enrobage puis mise à germer de la même manière. Un suivi de germination est réalisé comme détaillé en II.2.4.

II.4.2. Conditions de stockage

Une fois enrobées et séchées, 80 graines de Dvi sont mises à germer (4x20 graines), les autres sont récupérées et stockées dans des flacons hermétiques selon trois modalités : frigo sec 5°C, étuve à température ambiante, étuve à température ambiante avec ajout d'un dessiccateur dans le flacon. Tous les mois, quatre répétitions de 20 graines par mode de conservation sont mises à germer et au bout de 20 et 25 jours le taux de germination des spores est relevé comme détaillé en II.2.4 et II.2.5.

Lorsque l'enrobage est sec, il est très difficile de colorer les spores encapsulées et impossible d'écraser l'alginate entre lame et lamelle. Il est donc nécessaire, au préalable, de le dissoudre dans une solution tampon phosphate pH 7,8 (*Mjahed, 2009*), pendant 10 à 15 min, avant de pouvoir procéder aux étapes de coloration (II.2.4.).

II.5. Analyses statistiques des résultats

Les résultats obtenus sont analysés par traitement statistique sous R. Après vérification des conditions d'homoscédasticité et d'égalité des variances du jeu de données étudiées grâce au package RVAidememoire, un test ANOVA permet d'attester d'une différence significative ou non des résultats. Un test LSD de Fisher est réalisé lorsque le test ANOVA montre une différence significative entre les paramètres analysés. Il permet de créer des groupes de paramètres dont les résultats sont significativement différents.

III. RESULTATS et DISCUSSION

III.1. Amélioration du protocole d'enrobage

III.1.1. Influence des différents paramètres sur la qualité de l'enrobage

Influence de la concentration sur la qualité de cet enrobage

On observe que le taux de recouvrement R(%) augmente avec la concentration en alginate, et cela pour 3 des 4 espèces étudiées, et ce, de manière significative. Il est compris selon les graines entre 40 et 90% pour C10, entre 65 et 95% pour C12,5 et entre 80 et 100% pour C15 (Fig. 13). En ce qui concerne Gde, on observe l'effet inverse et aucune différence significative entre les concentrations. La solution étant plus visqueuse, les graines ailées adhèrent beaucoup plus à la paroi de l'embout de pipette, il devient alors très délicat de les enrober. La répartition moyenne des graines dans les catégories 1 à 4 est détaillée en (Annexe XXI).

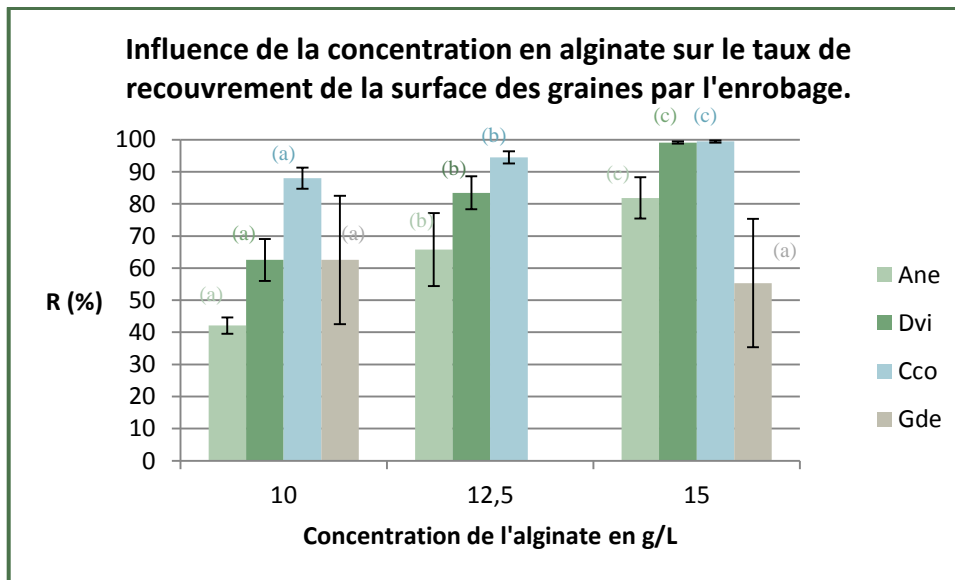


Figure 13 Influence de la concentration de l'alginate (g/L) sur le taux de recouvrement R(%) d'*A.neocaledonica*, *D.viscosa*, *C.comosa*, et *G.deplancheanum* (12,5g/L non réalisé). Test LSD-Fischer.

La concentration la plus intéressante en termes de qualité de l'enrobage est donc 15g/L, à condition que cette concentration n'entraîne pas une diminution de la germination des graines et des spores, comme cela a été constaté pour une concentration en alginate de 20g/L (Zilliox, 2011). Dans ce cas, une concentration de 12,5g/L d'alginate permet un enrobage tout à fait correct pour Ane, Dvi, et Cco. En ce qui concerne Gde, il est impératif de trouver une technique plus appropriée : celle-ci est tellement fastidieuse et peu satisfaisante que l'enrobage à 12,5g/L d'alginate n'a pu être réalisé.

Influence du pH de l'EDSA sur la qualité de cet enrobage

Etant données les difficultés rencontrées lors de l'enrobage à la pipette de Gde, ce paramètre n'a pu être testé sur cette espèce. Sur les trois autres, on remarque que plus le pH de l'EDSA augmente, plus le taux de recouvrement est important, quel que soit le type de graine et ce de manière significative (ANOVA***). En effet R(%) est compris entre 40 et 90 % à pH EDSA 6,4 pour Ane et Cco respectivement, Dvi se trouvant entre les deux, entre 85 et

100% pour pH EDSA 8 (même ordre de graines) et entre 90 et 100% pour pH EDSA 9 (Fig.14). Donc plus le pH augmente plus l'enrobage est de qualité.

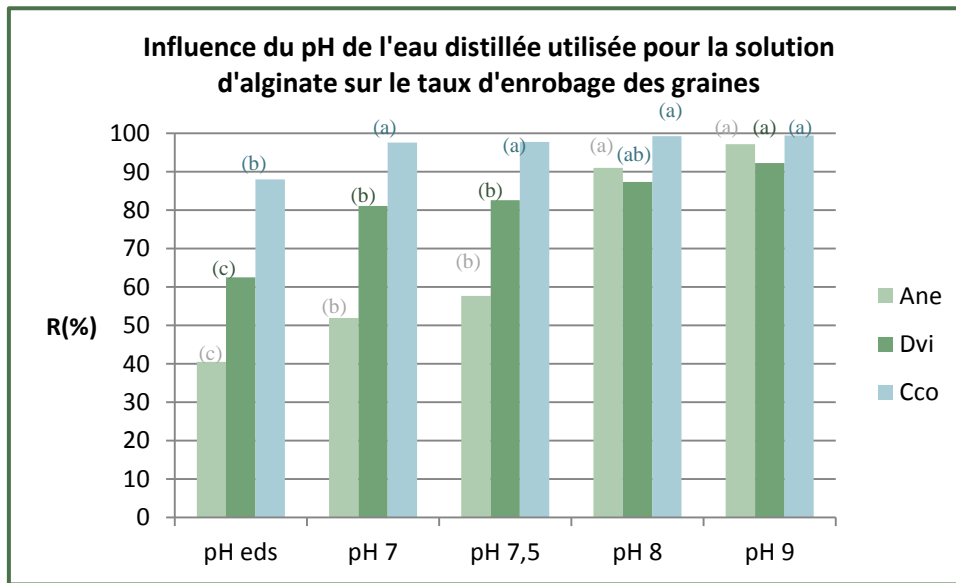


Figure 14 Influence du pH de l'eau distillée utilisée pour la solution d'alginate sur le taux d'enrobage R(%) d'A.neocaledonica (Ane), D.viscosa (Dvi) et C.comosa (Cco). Test LSD-Fisher

En effet, l'augmentation du pH de l'EDSA permet de contrer l'effet dépolymérisateur des processus de stérilisation de l'alginate, notamment l'autoclavage, qui entraîne une diminution de la viscosité de l'alginate et donc de la force du gel (Daigle & Cotty, 1997 ; Leo et al., 1990). Pour Cco l'enrobage est de très bonne qualité dès pH EDSA 7, cependant pour Ane et Dvi, il faut aller jusqu'à pH EDSA 8 ou 9 pour avoir un enrobage de qualité. Tout comme le résultat précédant, ce résultat est à corrélérer avec les résultats obtenus en termes de germination des graines (III.1.2) et des spores (III.1.3).

Influence de la méthode d'enrobage sur la qualité de cet enrobage

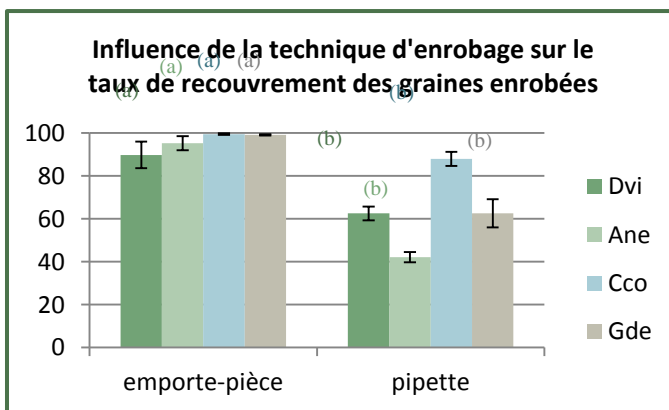


Figure 15 Influence de la technique d'enrobage utilisée sur le taux de recouvrement R(%) des graines enrobées pour chaque type de graine (Dvi, Ane, Cco)

40 et 90% selon les graines (Fig. 15).

Quel que soit le type de graine étudiée, on obtient une différence significative du taux de recouvrement des graines par l'enrobage (ANOVA ***) en faveur de la technique d'enrobage en gâteau. L'enrobage découpé à l'emporte-pièce, en plus d'être bien plus rapide et moins fastidieux pour le manipulateur que l'enrobage à la pipette, permet d'obtenir de meilleurs résultats avec un R(%) compris entre 90 et 100%, par rapport au témoin enrobage à la pipette 10g d'alginate /L d'EDS à pH6,4 dont le R(%) est compris entre

Bien évidemment ce type de manipulation étant à terme vouée à être mécanisée, ces résultats n'ont que peu de valeur, mais l'élaboration de cette nouvelle technique permet d'obtenir un pourcentage plus élevé d'enrobage de qualité. Ceci pourrait permettre, à l'avenir,

d'écarter le biais qu'un faible taux de recouvrement peut engendrer dans les suivis de germination, lorsque l'on teste différents paramètres physico-chimiques de l'enrobage (Zilliox, 2011), comme on le verra dans la partie III.1.2. Le biais pouvant maintenant aussi être écarté en augmentant la concentration et le pH de l'EDSA, cette technique reste intéressante pour l'étude de Gde, qui s'enrobe très mal avec la technique « micropipette ».

Bilan sur la qualité de l'enrobage

Tableau 3 Tableau des résultats des tests ANOVA de l'influence des différents paramètres sur le taux de recouvrement R(%) des graines pour *A.neocaledonica*(Ane), *D.viscosa* (Dvi), *C.comosa* (Cco) et *G.deplancheanum* (Gde)

	Ane	Dvi	Cco	Gde
Concentration de l'alginate	0.000156 ***	7.22e-06 ***	0.000153 ***	0.109
pH de la solution d'alginate	9.77e-11 ***	3.29e-05 ***	2.62e-07 ***	NA
Méthode d'enrobage	0.00293 **	0.0315 *	0.000458 ***	3.17e-05 ***

On remarque qu'il est assez facile d'améliorer la qualité de l'enrobage pour Dvi, Ane et Cco, en augmentant la concentration ou le pH de l'EDS utilisée pour la solution d'alginate, puisqu'ils donnent des

résultats très significatifs (Tab.3). Ceux-ci ayant été étudiés indépendamment les uns des autres, il serait intéressant de tester un enrobage à 12,5g/L d'alginate en utilisant un pH de l'eau distillée ajusté à 7, 8 ou 9. En ce qui concerne Gde, la technique d'enrobage à la pipette est peu adaptée mais un enrobage en gâteau donne des résultats très intéressants. Si cette technique ressemble plus à une recette de cuisine qu'à un vrai protocole d'enrobage, les résultats n'en sont pas moins satisfaisants. Bien sûr il ne faut pas perdre de vue l'objectif final d'enrobage mécanisé et évaluer les possibilités de mécanisation de chacune de ces méthodes. Il s'agit d'une étape qui nécessitera certainement quelques ajustements supplémentaires de la solution d'alginate. Par ailleurs, la décision d'utiliser tel ou tel pH, ou tel ou tel concentration, dépend de l'influence de ces paramètres sur la germination des graines et des spores.

III.1.2. Influence des différents paramètres sur la germination des graines

Quel que soit le type d'enrobage étudié aucune graine de Gde n'a germée (i.e. on a obtenu un taux de germination de 0% sur les modalités enrobées et seulement 12% sur la modalité témoin sans enrobage). Nous ne pourrions donc pas présenter de résultats de germination de cette graine.

Influence de la concentration de l'alginate sur la germination des graines

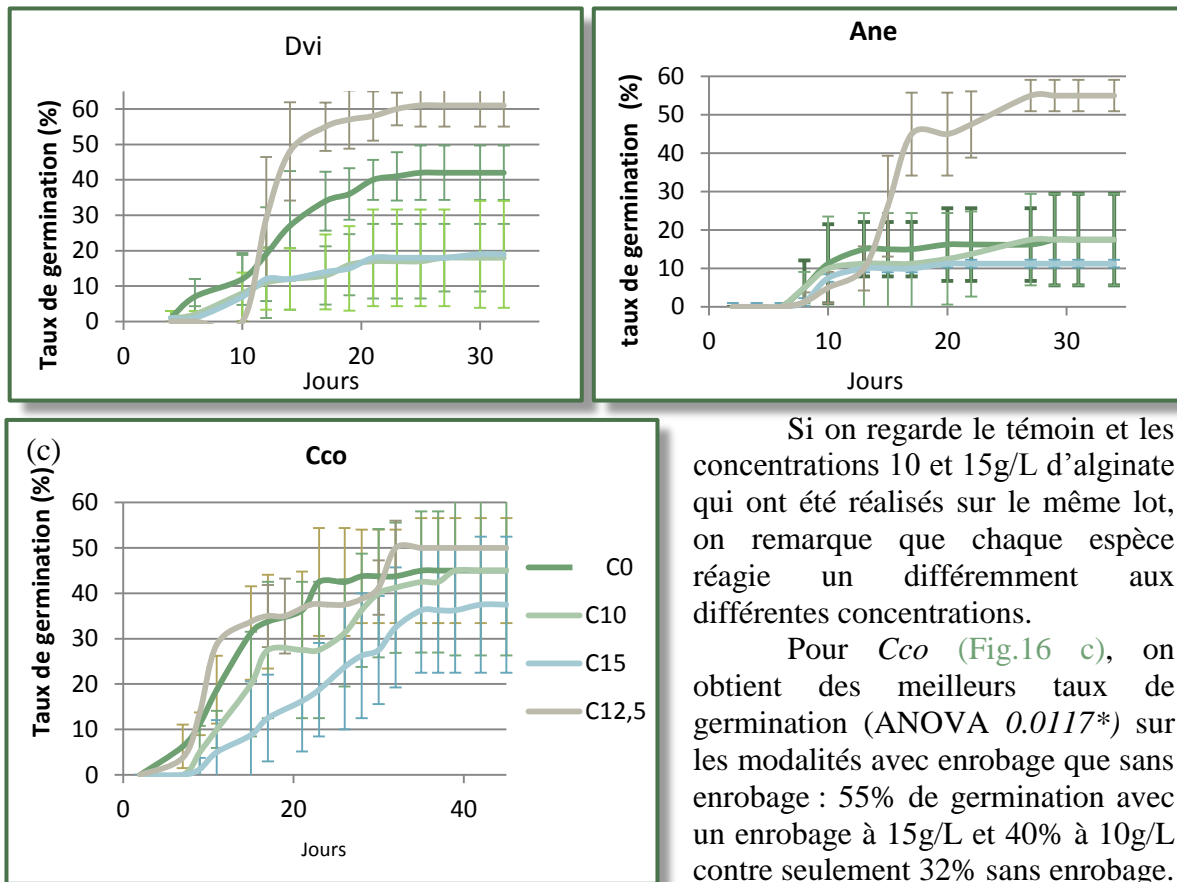


Figure 16 Influence de la concentration de l'enrobage en alginate (g/L) sur la germination (%) des graines *D.viscosa* (a), *A. neocaledonica* (b), *C. comosa* (c). La légende du graphique (c) vaut pour (a) et (b).

Si on regarde le témoin et les concentrations 10 et 15g/L d'alginate qui ont été réalisés sur le même lot, on remarque que chaque espèce réagit un différemment aux différentes concentrations.

Pour *Cco* (Fig.16 c), on obtient des meilleurs taux de germination (ANOVA 0.0117*) sur les modalités avec enrobage que sans enrobage : 55% de germination avec un enrobage à 15g/L et 40% à 10g/L contre seulement 32% sans enrobage. Il est probable que pour cette espèce, la présence de spores d'AMF favorise la germination des graines (Porrás-Alfaro & Bayman, 2007).

Pour *Dvi* (Fig.16 a), quelle que soit la concentration de l'enrobage testée, on observe une diminution significative (ANOVA, 0.0234 *) du taux de germination final par deux par rapport au témoin sans enrobage. On passe en effet de 40% de germination à 20%.

Enfin pour *Ane* (Fig.16 b), on obtient le cas de figure attendu. Plus la concentration de l'alginate est forte plus le taux de germination est faible. L'enrobage à 10g/L fait perdre 5% sur le taux de germination des graines et celui à 15g/L 10%. Aucune différence significative révélée par l'ANOVA du fait d'écart-type trop important.

Si l'on ajoute à cette analyse la courbe grise représentant le traitement 12,5g/L, on s'aperçoit que les taux de germination sont beaucoup plus élevés. Comme énoncé en II.1.1., les enrobages de cette concentration ont été réalisés plus tard, et sur un autre lot de graines (le précédent ayant été épuisé). Ainsi trois hypothèses permettraient d'expliquer ce phénomène : avec l'expérience des manipulations le taux de contamination des boîtes s'est réduit de beaucoup, ou bien le lot utilisé pour ce dernier paramètre était de meilleure qualité, ou encore la concentration 12,5g/L favorise la germination. La dernière hypothèse paraît la moins plausible puisque les concentrations 10 et 15 g/L d'alginate ont un effet contraire et l'alginate garde des propriétés physico-chimiques équivalentes pour de telles concentrations. Le taux de viabilité obtenu, plus fort sur le second lot quelles que soient les graines, confirme l'hypothèse d'un lot meilleur.

Tableau 4 Taux de germination (%) SIRAS , taux de germination obtenu (%) et taux de viabilité obtenu (%) des lots de graine d'*A.neocaledonica* (Ane), *G.deplancheanum* (Gde), *C.comosa* (Cco) et *D.viscosa* (Dvi).

Graine /lot	Date de récolte	Date du taux de germination	Taux de germination SIRAS (%)	Taux de germination témoin obtenu	Taux de viabilité %
Ane 1	28/02/12	02/06/12	0	18	50
Ane 2	-	-	-	-	78,75
Gde 1	-	-	-	0	41
Gde 2	-	-	21	0	62,5
Cco 1	21/02/12	21/02/12	63	33	90
Cco 2	17 /01/12	02/06/12	55,5	-	95
Dvi 1	24/06/10	06/12/12	30	42	62,5
Dvi 2	05/03/10	06/06/11	67,8	-	76,25

Le Tableau 4 montre bien l'importance des conditions de stockage des graines (IAC, 2010). En effet, il semble que l'enrobage affaiblit la graine, et d'autant plus si le taux de germination ou de viabilité d'origine du lot de graine est faible. C'est donc pour cette raison que l'on obtient les résultats les plus intéressants à 12,5 g/L d'alginate. Si l'on compare le taux de germination des graines à 12,5g/L et le taux de viabilité du lot utilisé, on remarque une faible diminution, 15 à 20%, pour Dvi et Cco. Cette diminution est légèrement plus importante pour Ane (23%).

Influence du pH de l'eau distillée stériles (EDS) utilisée pour la solution d'alginate sur la germination des graines

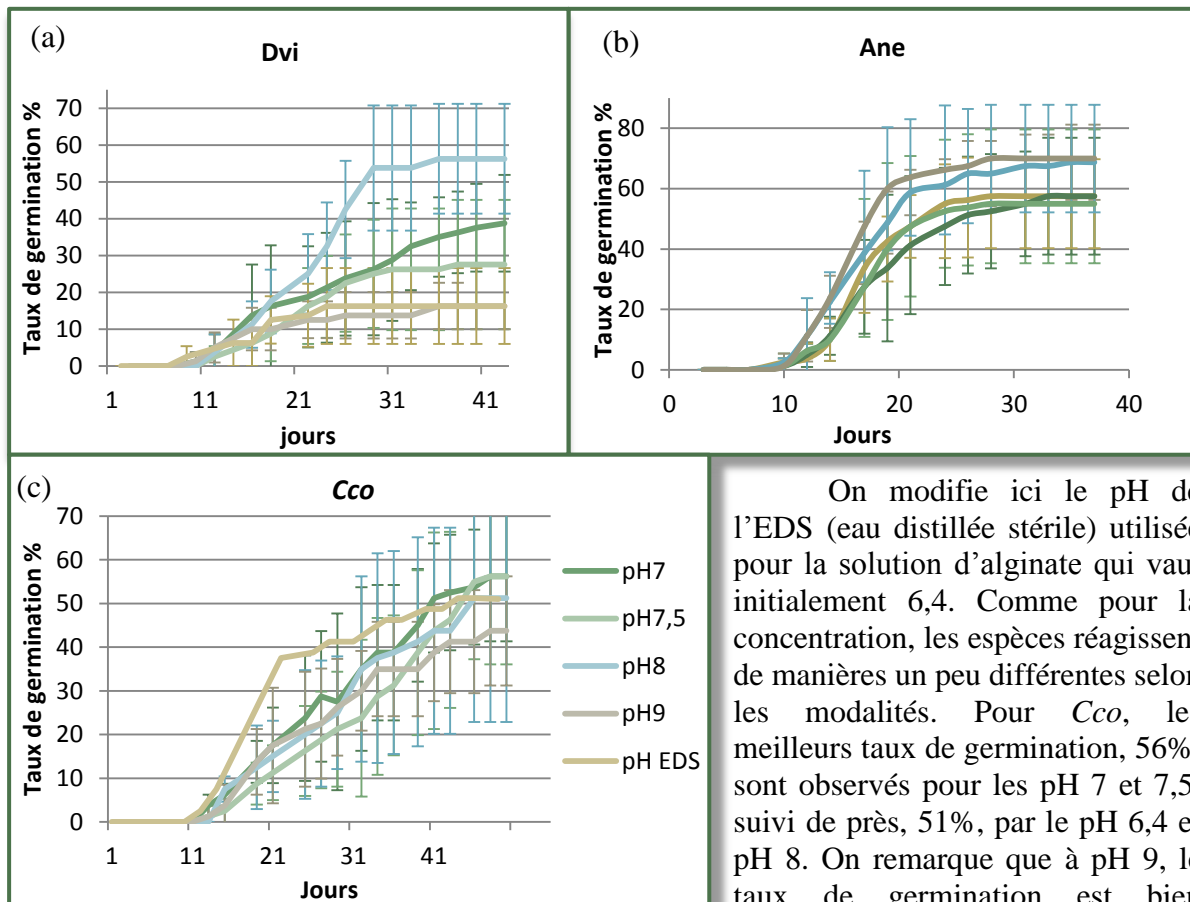


Figure 17 Influence du pH de l'EDSA sur le taux de germination (%) des graines de *D.viscosa* (a), *A. neocaledonica* (b) et *C.comosa* (c). La légende en (c) vaut pour (a) et (b).

On modifie ici le pH de l'EDS (eau distillée stérile) utilisée pour la solution d'alginate qui vaut initialement 6,4. Comme pour la concentration, les espèces réagissent de manière un peu différentes selon les modalités. Pour *Cco*, les meilleurs taux de germination, 56%, sont observés pour les pH 7 et 7,5, suivi de près, 51%, par le pH 6,4 et pH 8. On remarque que à pH 9, le taux de germination est bien moindre, 44% (Fig.17c). On peut donc dire qu'il n'est pas conseillé

d'utiliser des pH supérieurs à 8 pour l'enrobage : cela inhibe la germination.

Pour *Dvi*, on obtient un meilleur taux de germination à pH 8 : 56%. Pour les pH 6,4 et pH 9 les taux de germination sont très diminués et ne dépassent pas les 20%. A pH 7 et 7,5 les taux sont compris entre 30 et 40% (Fig.17a).

Contrairement aux deux autres graines, *Ane* présente le meilleur taux de germination à pH 9 et 8, 70%, tandis que les pH 7 et 7,5 donnent des résultats proches de l'enrobage à l'eau distillé : entre 55 et 60% (Fig.17b).

On obtient globalement les meilleurs taux de germination lorsque le pH a été ajusté à 8. Le pH 9 semble avoir un impact négatif sur la germination mais les résultats sur *Ane* ne confirment pas l'hypothèse. Cela montre que chaque espèce a sa propre physiologie qu'il est nécessaire de prendre en compte : on ne peut pas généraliser un pH pour toutes les espèces.

Par ailleurs on remarque que ces taux de germination sont meilleurs que ceux obtenus lors de l'expérience sur les concentrations de l'enrobage en alginate. Cela confirme l'hypothèse de la qualité médiocre du premier lot de graines fourni.

Influence de la méthode sur la germination des graines

Aucun suivi de germination n'a été effectué pour voir l'impact de la technique d'enrobage sur le taux de germination des graines. S'il est vrai que, selon la technique, l'enrobage est plus ou moins épais autour de la graine, ce phénomène n'a pas été quantifié ni qualifié. On peut juste observer que l'enrobage en « gâteau » permet d'obtenir un enrobage en forme de rondelle (ou d'une autre forme selon le découpage effectué mais plat) dont l'épaisseur peut être très proche de l'épaisseur de la graine ce qui pourrait alors réduire au maximum l'effet barrière physico-chimique de l'enrobage (Fig.18b). Avec la technique d'enrobage à la pipette, l'épaisseur de l'enrobage autour de la graine dépend énormément de la taille de coupe de l'embout, de la manipulation, de la viscosité de l'alginate et de la graine

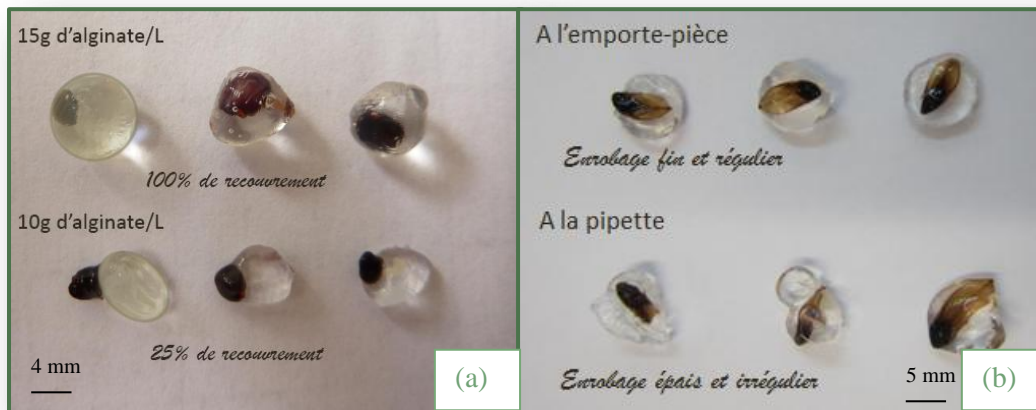


Figure 18 Photos de graines fraîchement enrobées. Comparaison de deux concentrations d'enrobage sur *D.viscosa* (a) et comparaison de deux techniques sur *G.deplancheanum* (b).

(poids, forme, densité, ...). Par exemple, si elle a tendance à couler dans l'alginate avant précipitation, la graine sera décentrée dans l'enrobage, comme on peut l'observer avec *Dvi* et si elle y stagne, la graine aura tendance à être plus centrée (Fig.18a). Bien que cela, varie évidemment d'une graine à l'autre selon la concentration utilisée et de la forme de la graine.

Bilan sur la germination des graines

L'augmentation du pH de l'EDSA entraîne une amélioration significative de la qualité de l'enrobage avec un R(%) maximal pour pH EDSA de 9. Cependant pour certaines graines (*Dvi* et *Cco*) des pH trop importants, respectivement 8 et 9 peuvent entraîner une baisse de la germination tandis que les autres pH de l'EDSA testés entraînent une augmentation du taux de germination par rapport au pH de l'EDS (6,4). Ce résultat peut s'expliquer par la

physiologie de la graine. Il est aussi possible que l'augmentation du pH de l'EDSA entraîne une résistivité mécanique plus importante de l'enrobage, entraînant une diminution du taux de germination (Zilliox, 2011)

III.1.3. Influence des différents paramètres sur la germination des spores

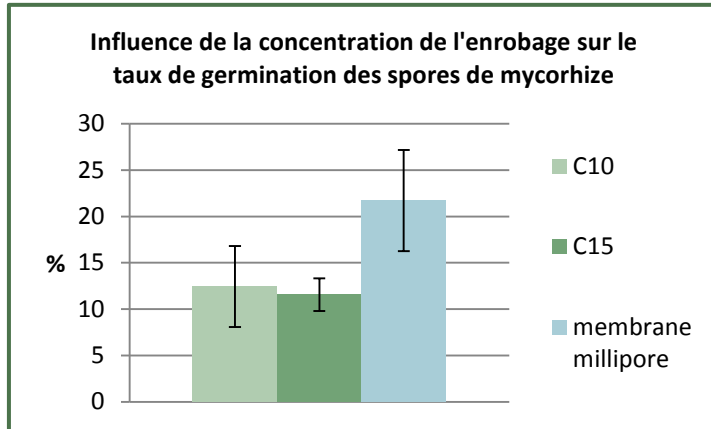


Figure 19 Influence de la concentration de l'enrobage sur le taux (%) de germination des spores d'AMF 25 jours après encapsulation et témoin sur membrane millipore.

Influence de la concentration sur la germination des spores

L'encapsulation des spores dans l'alginate entraîne une diminution presque par deux du taux de germination des spores d'AMF. On passe de 22% de germination à 12% (Fig.19). Cependant le taux de germination varie très peu entre l'enrobage à 15g/L et 10g/L. On en déduit que l'enrobage d'alginate a bien un impact négatif sur la germination des spores d'AMF, quelle que soit

la concentration de la solution. Le taux de germination des spores encapsulées dans une concentration de 12,5 g/L d'alginate n'a pu être mesuré, cependant on imagine aisément que le résultat devrait se trouver entre 10 et 15 %, une hypothèse à valider ultérieurement.

Influence du pH de l'eau distillée utilisée sur la germination des spores

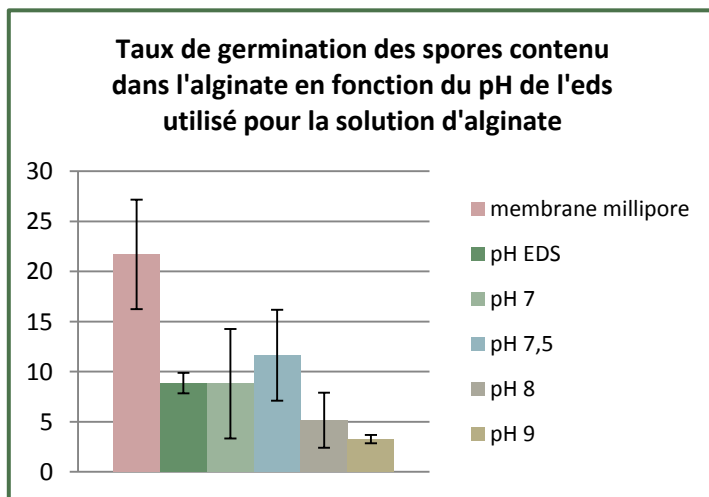


Figure 20 Influence du pH de l'EDSA sur le taux de germination (%) des spores d'AMF 25 jours après encapsulation et témoin sur membrane millipore.

Comme pour la concentration, l'enrobage entraîne une diminution de la germination des spores au moins de moitié, selon les pH étudiés, par rapport au témoin réalisé sur membrane millipore. On remarque que pour une encapsulation des spores dans une solution d'alginate réalisée avec de l'EDS à pH 6,4 et jusqu'à pH 7,5, le taux de germination des spores est autour de 9 - 12% (Fig.20). Au-delà de pH 7,5, il diminue fortement à 5 % pour pH 8 et 3% pour pH 9. On en déduit qu'à partir de 8, le pH de l'EDS utilisée pour la solution d'alginate

influe trop négativement sur les taux de germination des spores pour donner un enrobage intéressant. Le meilleur pH de l'EDS utilisée pour la solution d'alginate serait donc pH 7,5 pour l'encapsulation des spores.

Influence de la méthode sur la germination des spores

Le type d'enrobage ne jouant que sur l'épaisseur de l'enrobage, et en rien sur les propriétés physico-chimiques de celui-ci, il n'impacte que faiblement le taux de germination des spores. L'épaisseur de l'enrobage pourrait éventuellement influencer la rapidité de libération des spores du fait d'une dégradation plus lente (Mjahed, 2009). Cependant les spores d'AMF sont des bonnes structures de conservation et peuvent rester viables plusieurs années si les conditions sont optimales (Amir et Ducouso, 2010).

Bilan sur la germination des spores

Globalement l'encapsulation des spores dans l'alginate entraîne une diminution de la germination des spores par rapport au témoin sur membrane millipore. Cependant, l'augmentation de la concentration de la solution d'alginate ne semble pas entraîner une diminution plus forte de la germination des spores. Par ailleurs, pH 7,5 semble être le pH de l'EDS utilisé pour la solution d'alginate où le taux de germination des spores est le plus important.

Conclusion de l'étude des différents paramètres sur l'enrobage

Au vu des résultats de germination des graines et des spores on ne peut que conseiller d'utiliser de l'EDS à pH 7,5 pour la solution d'alginate. C'est en effet à ce pH que les taux de germination des spores et des graines sont globalement les meilleurs. De plus, à pH EDSA 7,5 les taux de recouvrement R(%) des graines sont satisfaisants et nettement améliorés par rapport à pH EDSA 6,4 sauf peut être légèrement insuffisant pour Ane dont la germination semble stimulée par des pH basiques (8 et 9). Par ailleurs, les résultats de taux de germination des graines étant peu concluants pour l'expérience sur les concentrations de l'enrobage (du fait d'un lot de graines probablement mal conservé), il est difficile de dire quelle concentration serait la plus intéressante. Cependant les résultats de germination des graines enrobées à une concentration C 12,5g/L d'alginate sont assez satisfaisants puisqu'on va jusqu'à 50% à 60% pour Dvi, Ane et Cco. Il faudrait reprendre l'expérience vérifiant l'influence de la concentration sur le taux de germination des graines pour être sûr de l'impact de ce facteur. En attendant, l'enrobage le plus satisfaisant et intéressant semble être un enrobage fait à la pipette avec une solution d'alginate concentrée à 12,5g/L préparée avec de l'EDS dont le pH aura préalablement été ajusté à 7,5.

Par ailleurs, il a été mis en évidence que la maturation des billes d'alginate dans le CaCl_2 est un processus lent qui atteint son équilibre au bout de 15h (Velings & Mestdagh, 1995). Or dans le protocole d'enrobage utilisé, l'alginate n'est en contact que 5min avec cette solution. Ce temps permet la gélification de l'alginate puisque les résultats obtenus sont très satisfaisants. Cependant, il serait intéressant d'étudier l'influence du temps de contact de l'alginate dans le CaCl_2 sur la qualité de l'enrobage et surtout sur sa résistivité mécanique. En effet, deux points restent à clarifier maintenant que le protocole d'enrobage, optimisé avec un pH d'EDSA de 7,5 et une concentration en Alginate de 12,5 g/L, permet un taux de recouvrement supérieur à 75% en moyenne. Tout d'abord l'enrobage résiste-t-il à l'action mécanique qu'exerce un hydroseedeur (ensemencement par propulsion hydraulique)? Ensuite, le second point concerne la solubilité de l'alginate. En effet, on sait que l'alginate n'est ni hydro- ni thermo-soluble cependant il se dissout par déplacement des ions Ca^{2+} en présence d'agent chélateur comme l'EDTA, de forte concentration en Na^+ et Mg^{2+} ou encore de tampon phosphate (Mjahed, 2009). Il est indispensable que le mélange mulch/amendement contenu dans la cuve de l'hydroseedeur ne dissolve pas l'enrobage. Il faudra aussi vérifier que

la concentration d'apport en P optimale pour la mycorhization déterminée par les expériences du LIVE soit compatible avec la technique d'enrobage des graines avec des spores d'AMF.

III.2. Efficacité de la technique d'enrobage avec spores d'AMF de graines par rapport à la technique d'inoculation classique.

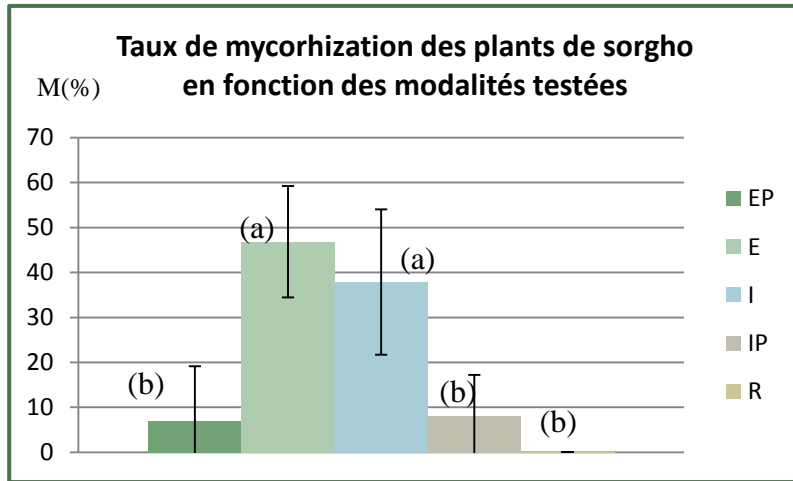


Figure 21 Taux de mycorhization M(%) des plants de sorgho enrobés avec spores d'AMF (E), inoculés avec spores d'AMF (I), enrobés avec ajout de phosphore dans le pot (EP), inoculés avec ajout de phosphore dans le pot (IP) et sans apport de Phosphore ni de spores (R témoin). Test LSD-Fisher

Travaillant sur du matériel végétal et du fait des contraintes de temps, cette expérience a été lancée en parallèle des expériences d'amélioration de l'enrobage. C'est pour cette raison que l'on a utilisé le protocole de base d'enrobage des graines (à l'alginate 10g/L d'EDS dont le pH n'a pas été modifié).

Les taux de mycorhization évalués sur chacune des modalités, révèlent une différence significative (ANOVA,

1.01e-05 ***) entre les modalités « ajout de Phosphore » et « pas d'ajout de Phosphore ». Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre les modalités « inoculation » et « enrobage ». En effet, un test LSD différencie deux groupes : a = (E,I) et b = (IP,EP,R). On observe un taux de mycorhization d'environ 40% pour le groupe a et compris entre 0 et 10% pour le groupe b (Fig.21).

Le fait que le taux de mycorhization soit faible dans les modalités « Ajout de phosphore » s'explique probablement par le fait que les sorghos ont été plantés dans de la terre du terrain de l'université dont la composition en P total s'élève à 771 mg/kg ; elle est mélangée à 20% avec de terreau comportant aussi du P. Ainsi, la plante s'approvisionnant suffisamment en P par voie directe, ne gagnerait rien à travers la symbiose avec les AMF, qui ne se développent donc pas ou peu (Amijee et al., 1989). Sur une période plus longue, il serait fort intéressant de réaliser cette même expérience sur des plantes de maquis minier utilisées en revégétalisation et dont l'enrobage est maintenant mieux maîtrisé sur de la terre rouge des terrains miniers, carencée en phosphore. En effet, d'autres expériences menées au laboratoire du LIVE visent à déterminer les apports en Phosphore pour optimiser le taux de mycorhization des plants (Lagrange, 2010), il serait donc encore plus intéressant de faire cette expérience sur les plantes déjà étudiées et dont on a trouvé les apports nécessaires optimaux pour la mycorhization.

On remarque, par ailleurs, que le taux moyen de mycorhization est légèrement supérieur dans la modalité « Enrobage » que dans la modalité « Inoculation » alors qu'on avait mis dans cette modalité deux fois plus de spores d'AMF pour contrer le phénomène de lessivage des spores par l'irrigation (Fig.21). Cela s'explique par la distance spores-racines plus importantes dans la modalité I par rapport à E. Ainsi l'intervalle de temps entre

l'inoculation, du moment où les conditions sont favorables à la germination des spores, et le délai avant l'apparition des racines colonisables par les mycorhizes ou la distance à parcourir par ces racines pour être mycorhizé, est très susceptible de réduire la capacité des AMF à établir la symbiose. Cette effet est variable en fonction des espèces de *Glomus* utilisées (*Estau et al., 2007*).

Il est déjà très satisfaisant de voir que les taux de mycorhization sont équivalents dans les modalités E et I, puisque cela prouve l'efficacité de la technique. Cependant, grâce aux améliorations apportées à la technique d'enrobage en III.1., il est peut être possible d'obtenir une différence significative entre ces deux modalités en faveur de l'enrobage. Bien évidemment il est indispensable de mesurer l'efficacité de cette technique *in situ* par hydroseeding. Si l'enrobage résiste mécaniquement à l'hydroseeding, il y a de grandes chances que les taux de mycorhization soient d'autant plus significatifs puisque l'inoculum sera directement sur la graine au moment de la germination (*Bashan and Gonzalez 1999, Bashan et al. 2002*)

Maintenant que la technique d'enrobage de graines avec des spores d'AMF donne des résultats intéressants et montre une certaine efficacité, on peut tenter d'étendre la technique à d'autres micro-organismes bénéfiques. En effet, *Bashan et al. (2002)* ont obtenu des résultats intéressants d'inoculation en appliquant la technique d'encapsulation à des bactéries PGPB et l'association bactéries-mycorhizes et encapsuler directement des spores d'AMF et des bactéries PGPB permettrait d'obtenir des résultats d'autant plus intéressants (*Vassilev et al., 2001*). Des travaux sont en effet en cours au LIVE sur les bactéries PGPR intervenant dans la dissolution du phosphore et leur association avec les AMF sont prometteuse. A plus long termes, la composition en strigolactones des exsudats racinaires des plantes est un des facteurs déterminant la préférence manifestée par certains champignons MA pour certaines plantes hôtes, ce sont des facteurs de stimulation symbiotique (*Yoneyama et al., 2008 ; Gomez-Roldan, 2008 ; Declerck et al., 1996*). Ainsi, en ajoutant ce type de flavonoïdes dans l'enrobage, on pourrait favoriser la symbiose et augmenter les taux de mycorhization, et l'adaptation des plantes de revégétalisation sur sols UMF.

Par ailleurs, il serait intéressant de comparer ces résultats à une autre technique d'enrobage qui se fait par production de microbilles d'alginate de 100 à 200 µm de diamètre encapsulant l'inoculum et collées à la graine par une solution d'alcool diluée à 1% dans de la lécithine ou avec du papier synthétique adhésif à 0.5% (Resistol) après obtention d'un poudre par séchage des microbilles (*Annexe XXII*) (*Bashan et al., 2002*).

III.3. Stockage des graines enrobées : premiers résultats

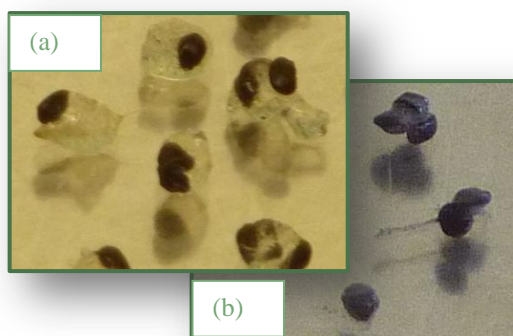


Figure 22 Photos d'enrobage frais (a) et sec (b) sur Dvi

Comme on a pu le voir en III.1.2., les méthodes de conservation des graines sont essentielles si l'on veut obtenir des taux de germination intéressants sur les chantiers de revégétalisation (comme en boîte de Pétri).

III.3.1. Séchage de l'enrobage

L'expérience réalisée en serre sur sorgho a montré que l'enrobage sèche autour de la graine si celle-ci ne trempe pas

dans l'eau et ceci sans gêner la germination de la graine ni la mycorhization du plan. Pour évaluer les possibilités de séchage de l'enrobage pour sa conservation (Fig.22ab) nous avons donc étudié l'impact de cette étape sur la germination des graines. Aucune différence significative (ANOVA) n'est observée entre la modalité enrobage frais (D) et la modalité enrobage sec (S) pour Ane, Cco et Dvi (Fig.23ab). Cependant, les écart-types étant assez grands (lot n°1 utilisé), une étude plus approfondie serait à faire. Les taux de germination sur Gde étant très faibles nous n'avons pas testé ce paramètre dessus.

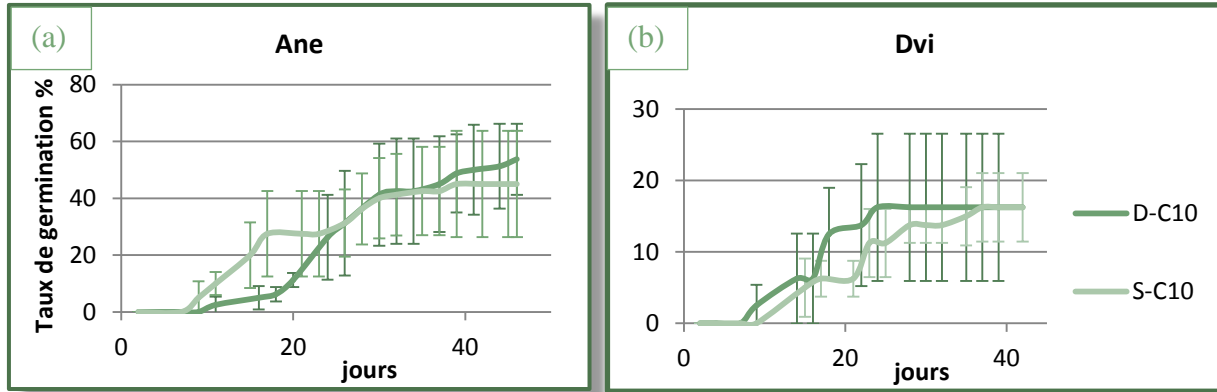


Figure 23 Suivi de l'influence du séchage de l'enrobage sur le taux de germination de *A. neocaledonica* (a) et *D. viscosa* (b). D= enrobage frais, S=enrobage sec. La légende de (b) est valable pour (a).

Néanmoins, ces résultats concordent avec ceux indiqués par *Bashan et al. (2002)* : les billes d'alginate pour l'encapsulation de microorganismes peuvent être utilisées fraîches ou sèches sans impact sur les micro-organismes encapsulés. Cette étape vérifiée, nous avons pu lancer les essais de conservation. En effet la manipulation et le conditionnement des graines ainsi enrobées est plus facile.

III.3.2. Conservation des graines enrobées

Conservation du potentiel germinatif des graines

Tableau 5 Influence du temps (mois) et des modalités de conservation (T° ambiante (T_{amb}), T° ambiante avec dessiccateur (D_{essic}) et froid sec $5^{\circ}C$ ($5^{\circ}C$)), sur la germination des graines de *D. viscosa* dont l'enrobage avec des spores d'AMF a été séché. $t_n = t_0+n$ (mois).

Taux de germination moyen final (%) et écart-type	t0	t1	t2	t3
Tamb	36	40	39	49
écart-type Tamb	2,5	8,2	4,8	8,5
Dessic	36	43	29	33
écart-type Dessic	2,5	12	14	13
5°C	36	36	33	31
écart-type 5°C	2,5	4,8	8,7	11

Aucune différence significative (ANOVA, P -value=0.469) n'est observée entre les taux de germination des graines de Dvi après un et deux mois et trois mois de conservation quelle que soit la modalité de conservation (Tab.5). Après deux mois de conservation les taux de germination des graines sont autour de 30 à 40%, donc très proche du taux de germination à t_0 .

Il semblerait, sans différence significative, que la conservation au froid sec et avec un dessiccateur entrainerait une diminution progressive du taux de germination de Dvi. Par ailleurs, à t_3 , on observe un taux de germination supérieur à t_0 : 49% pour la modalité TA. Il est possible que dans ces conditions la germination des spores d'AMF ait favorisé la germination des graines. Cette hypothèse reste à confirmer puisqu'aucune différence

significative n'est observée, cependant les taux de germination des spores (paragraphe suivant) semble aller dans ce sens.

Conservation du potentiel germinatif des spores

On remarque que la conservation des graines enrobées en présence d'un dessiccateur entraîne une diminution significative (ANOVA) du taux de germination des spores par rapport à la conservation à la température ambiante seul. Après conservation un mois au froid sec, on obtient un taux de germination moyen de 10%, équivalent à celui obtenu après conservation à température ambiante (Fig.24). Ce taux est très proche de celui observé à un T0 en III.1.3. Cependant l'écart-type de la modalité 5°C est énorme du fait, probablement, d'une surestimation ou sous-estimation du nombre de spores germées. En effet, la lecture habituellement délicate par la présence de résidus du sol et quelques contaminations, est particulièrement difficile à 5°C du fait

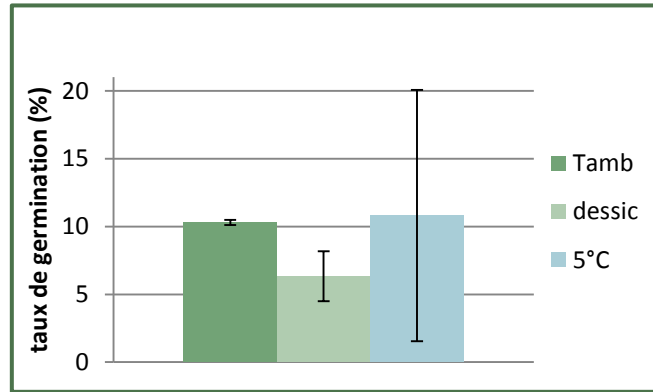


Figure 24 Influence des modalités de conservation (T° ambiante TA, T° ambiante avec dessiccateur dessic, froid sec 5°C) sur le taux de germination des spores (%) à TI : 1 mois de conservation 25 jours après mise à germination des graines.

d'un développement important de contaminations par des champignons saprophytiques. Cela est confirmé au temps T2, puisqu'il est absolument impossible de lire les lames dont l'enrobage a été conservé à 5°C tellement il y est contaminé par un autre champignon : *Rhizopus sp.* du groupe des *Mucorales* se colorant aussi en bleu lors de la coloration au bleu de trypan.

Pour la modalité Tamb, on obtient, au temps T2, un taux de germination des spores légèrement plus important qu'au temps T1 : 13%. Il est possible que les spores d'AMF aient commencées à germer lors de la conservation. Soit l'enrobage ne diminue pas le taux de germination mais ralentit seulement la germination du fait d'une libération progressive (Mjahed, 2009). Soit, comme expliqué pour la modalité 5°C les contaminations trop développées gênent la lecture. Il faudrait donc faire l'expérience sur des spores encapsulées dans des billes d'alginate sans les graines, qui sont, malgré la stérilisation, les premiers importateurs de contaminations (Zilliox, 2011). Il n'aura malheureusement pas été possible, dans le temps imparti par le stage, d'obtenir les résultats du temps T3. Il est donc trop tôt pour donner les conditions qui permettent une meilleure conservation, cependant il semble que la présence d'un dessiccateur puisse avoir un impact négatif sur la conservation des spores dans l'alginate.

Conclusion

Lors des différentes expériences réalisées, il a été mis en évidence qu'en augmentant le pH de l'EDS utilisée pour la solution d'alginate à 7,5, on obtient un enrobage de meilleure qualité et une augmentation légère du taux de germination des graines d'espèces étudiées. Il serait possible d'utiliser des pH supérieurs pour obtenir une qualité d'enrobage encore meilleure, mais il semble que certaines espèces végétales soient sensibles à ce paramètre. Ainsi, pour *A.neocaledonica* et *D.viscosa*, un pH de l'EDS utilisée pour la solution d'alginate à 8 donnerait un taux de germination encore plus intéressant, contrairement à *C.comosa*. De plus, le taux de germination des spores dans l'alginate est stable par rapport à la concentration de l'alginate mais semble diminuer sensiblement avec l'augmentation de pH à partir de pH 8. En terme de concentration en alginate, 10g/L est trop faible pour réaliser un enrobage de qualité (recouvrant suffisamment de la surface de la graine pour ne pas se détacher lors de l'étape d'ensemencement hydraulique). La concentration 12,5g/L donne de bons résultats de recouvrement et de germination des graines, cependant il est essentiel à ce stade de refaire un test pour la concentration en alginate de 15g/L avec un lot de graine de qualité.

Il serait bon à l'avenir, en plus d'étudier le taux de germination des graines et des spores dans l'alginate, d'étudier le développement des plantules sur sols ultramafiques et leur taux de mycorhization en fonction des enrobages. En effet, le taux de germination des spores étant un exercice lourd et difficile du fait des contaminations des gels d'alginate, ces mesures permettraient de mieux appréhender l'impact réel de la technique et les faibles taux de germination des graines peuvent être compensés par une meilleure résistance des plantules aux stress.

Par ailleurs, il a été prouvé que cette technique d'enrobage permet d'obtenir un taux de mycorhization égal à la technique d'inoculation lorsque celle-ci est effectuée avec une quantité d'inoculum deux fois supérieure. Avec les améliorations apportées, ce taux pourrait être bien supérieur, en particulier dans le cas de projection hydraulique (hydroseeding). De plus, il est tout à fait possible de conserver ces graines enrobées avec spores d'AMF lorsque l'enrobage est sec : cette étape ne diminue pas le taux de germination des graines cependant les conditions optimales de stockage restent encore à déterminer.

La technique d'enrobage ainsi améliorée présente un intérêt de taille malgré quelques mises au point encore nécessaires, notamment pour la mécanisation. Inclure à cet enrobage des bactéries PGPR et des flavonoïdes, facteurs de la stimulation symbiotique, permettrait d'obtenir des résultats probablement plus significatifs.

Cependant, le stockage des graines est une étape des plus importantes. En effet, on a pu remarquer l'absence de résultats pour *G.deplancheanum*, dont le taux de viabilité était trop faible, et des résultats variables selon le lot de graines. Cette étape est donc primordiale pour la réussite d'un chantier de revégétalisation et l'enrobage avec spores d'AMF ne permettra pas d'augmenter les taux de germination d'un lot mal conservé. Il est possible cependant que la technique permette une meilleure adaptabilité et résistance des plantules une fois germées puisque la mycorhization leur confère une meilleure résistance aux stress hydriques et métalliques en agissant sur les voies de captation et de stockage des métaux, très présent dans les sols des terrains miniers.

Bibliographie

- Alla P., Dhie F., Béligon O. (2007). Dossier Environnement minier 30 ans d'expertise. Fréquence Nickel, Le magazine de la SLN, 28, pp. 10-18.
- Amir H., Ducouso M. (2010). Les bactéries et les champignons du sol sur sols ultramafiques. In : Mines et environnement en Nouvelle-Calédonie : les milieux sur substrats ultramafiques et leur restauration. L'huillier et al., ed. IAC, Nouméa, Nouvelle-Calédonie, 412p.
- Amir H., Jourand P., Cavaloc Y., Ducouso M. (2010). Role of mycorrhizal fungi on the alleviation of heavy metal toxicity on plant. Non publié.
- Amir H., Lagrange A. (2008). Arbuscular mycorrhizal fungi from New Caledonian ultramafic soil improve the tolerance to nickel of endemic plant species. In: Sixth International Conference on Serpentine Ecology, 16-23 juin, Bar Harbor, USA.
- Amir H., Pineau R., Violette Z. (1997). Premiers résultats sur les endomycorhizes des plantes de maquis miniers de Nouvelle-Calédonie. In: The ecology of ultramafic and metalliferous areas, Jaffre T. ed., ORSTOM, Nouméa, New Caledonia, pp.79-85.
- Amir H., Perrier N., Rigault F., Jaffré T. (2007). Relationships between Ni-hyperaccumulation and mycorrhizal status of endemic plant species from New Caledonian ultramafic soils. *Plant Soil*, 293, pp.23-35.
- Amir H., Jasper D., Abbott L. (2008). Tolerance and induction of tolerance to Ni of arbuscular mycorrhizal fungi from New-Caledonian ultra-mafic soils. *Mycorrhiza*, 19, pp. 1-6.
- Amijee F., Tinker P.B., Stribley D.P. (1989). The development of endomycorrhizal root systems. *New Phytol.*, 111, pp. 435-446.
- Arcaaa Y., Arpab Ç., Ergenea A., Bayramoğlu G., Genç Ö. (2003). Ca-alginate as a support for Pb(II) and Zn(II) biosorption with immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *Carbohydrate Polymers*, 52, pp. 167–174.
- BARRIERE R., Dagostini G., Rigault F., Munzinger J. (2007). Caractérisation et cartographie de la végétation des milieux miniers de la côte Ouest de la Nouvelle-Calédonie. Rapport de Convention IRD/ DDEE Province Nord, 55p. + cartes en annexe.
- Bashan Y. (1986). Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. *Applied and environmental microbiology*, 51 (5), pp. 1089-1098.
- Bashan Y., Gonzalez L.E. (1999). Long-term survival of the plantgrowth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculant. *Appl Microbiol Biotechnol*, 51, pp. 262–266.
- Bashan Y., Hernandez J.-P., Leyva L., Bacilio M. (2002). Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biol Fertil Soils*, 35, pp. 359–368.
- Baskin J., Davis B., Baskin C., Gleason S.M., Cordell S. (2004). Physical dormancy in seeds of *Dodonea viscosa* (Sapindales, Sapindaceae) from Hawaii. *Seed Sci. Res.*, 14, pp.81-90.
- Bird E.C., Dubois J.P., Iltis J.A. (1984). The impact of opencast mining on the rivers and coast of New Caledonia. The United Nations University, Tokyo, 53 p.
- Bianciotto V., Lumini E., Anfranco 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.
- Borggaard O.K. (1983). The influence of iron oxides on phosphate adsorption by soil. *Journal of Soil Sci-ence*, 34, pp.333-341
- Bradshaw A. D. (1997). Restoration of mined lands – using natural processes. *Ecol. Eng.*, 8, p. 255-269.
- Brundrett M. (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, pp.37-77.
- Cavagnaro T., Smith F., Hay G., Carne-Cavagnaro V., Smith S. (2004). Inoculum type does not affect overall resistance of an arbuscular mycorrhiza-defective tomato mutant to colonization but

- inoculation does change competitive interactions with wild-type tomato. *New Phytol.*, 161, pp.485-94.
- Cherrier J.F. (1990). Reverdissement des terrains miniers en Nouvelle-Calédonie. *Bois et Forêts des Tropiques*, 226 (3), pp. 5-23.
- Cuenca G., Andrade de Z., Meneses E., Szaniszlo P. (2001). The presence of aluminium in arbuscular mycorrhizas of *Clusia multiflora* exposed to increased acidity. *Plant and soil*, 231, pp. 233-241.
- DAGOSTINI G., Veillon J.M., Jaffré T. (1997). Inventaire et caractérisation de la flore et des groupements végétaux du massif de la Tiébaghi. Rapport de convention ORSTOM/SLN. Nouméa 14 p + annexes.
- Daigle D., Cotty P. (1997). The Effect of Sterilization, pH, Filler and Spore Inoculum Concentration on the Preparation of Alginate. *Biocontrol Science and Technology*, 7, pp.3-10.
- Declerck S., Strullu D.G., Plenchette C., Guillemette T. (1996). Entrapment of in vitro produced spores of *Glomus versiforme* in alginate beads: in vitro and in vivo inoculum potentials. *Journal of Biotechnology*, 48, pp.51-57.
- Diop T. (2003). In vitro culture of arbuscular mycorrhizal fungi: advances and future prospects. *African Journal of Biotechnology*, 2 (12), pp. 692-697.
- Doherty J.H., Baoming J.I., Gasper B.B. (2008). Testing nickel tolerance of *Sorghastrum nutans* and its associated soil microbial community from serpentine and prairie soils. *Environ. Pollut.*, 151, pp.593-98.
- Doubková P., Suda J., Sudová R. (2012). The symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi contributes to plant tolerance to serpentine edaphic stress. *Soil Biology & Biochemistry*, 44, pp.56-64.
- Douds D., Nagahashi G., Pfeiffer P., Kayser W., Reider C.(2004). On-farm production and utilization of arbuscular mycorrhizal fungus inoculum. *Can. J. Plant Sci.*, pp.15-21.
- Draget K., Gaserod O., Aune I., Andersen P., Storbakken B., Stokke B., Smidsrod O. (2001). Effect of molecular weight elastic segment flexibility on syneresis in Ca-Alginate gels. *Food hydrocolloids*, 15, pp.485-490.
- Dupon J.F. (1986). Les effets de l'exploitation minière sur les îles hautes : le cas de l'extraction du minerai de nickel en Nouvelle-Calédonie. *Environnement étude de cas, Pacifique Sud N°1*, PROE, PNUE, CPS Nouméa.
- Duponnois R., Ouahmane L., Galiana A., Hafidi M., Prin Y., Dreyfus B. (2007). Valoriser et conserver les ressources forestières méditerranéennes: rôle potentiel des champignons mycorrhiziens associés à la strate arbustive pionnière. *Bois et Forêts des Tropiques*, 294, pp. 29-37.
- Enright N.J., Rigg L., Jaffré T. (2001). Environmental controls on species composition along a (maquis) shrubland to forest gradient on ultramafics at Mt Dore, New Caledonia. *South African J. of Sci.*, 97, pp.573-580.
- Estau V., Vicente S., Calvet C., Camprubi A., Busquets M. (2007). Integration of arbuscular mycorrhiza inoculation in hydroseeding technology: effects on plant growth and inter-species competition. *Land Degrad. Develop.*, 18, pp.621-630.
- Facelli E., Smith S.E., Facelli J., Christophersen H., Smith F.A. (2010). Underground friends or enemies: model plants help to unravel direct and indirect effects of arbuscular mycorrhizal fungi on plant competition. *New Phytol.*, 185, pp.1050-61.
- Fomina M., Hillier S., Charnock J., Melville K., Alexander J., Gadd G. (2005) Role of oxalic acid over excretion in transformation of toxic metal minerals by *Beauveria caledonica*. *Applied and environmental Microbiology*, 71, pp.371-381.
- Franco L., Maia R., Porto A., Messias A., Fukushima K., de Campos-Takaki G. (2004). Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, pp.243-247.
- Gaur A., Adholeya A. (2004). Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current science*, 86, pp.4.
- Gomez-Roldan Le M.-V. (2008). Rôle des Strigolactones dans la Symbiose Mycorrhizienne à Arbuscules. Doctorat en interaction plantes-microorganismes, Université Paul-Sabatier, Toulouse, 169p.
- Gonçalves S., Portugal A., Goncalves M., Vieira R., Martins-Loucao M., Freitas H. (2007). Genetic diversity and differential in vitro responses to Ni in *Cenococcum geophilum* isolates from serpentine soils in Portugal. *Mycorrhiza*, 17, pp.677-86.

- Goujon I. (2004). Les alginates : excipients d'origine marine utilisés dans l'industrie pharmaceutique – Application à la synthèse d'un gel chimique. Diplôme d'état de docteur en pharmacie, Université Henry-Poincaré, Nancy, 139p.
- Gustafson D., Casper B. (2004). Nutrient addition affects AM fungal performance and expression of plant/fungal feedback in three serpentine grasses. *Plant and Soil*, 259, pp.9-17.
- Häuselmann H., Fernandes R., Mok S., Schmid T., Block J., Aydelotte M., Kuettner K., Thonar E. (1994). Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *Journal of Cell Science*, 107, pp.17-27.
- HEQUET V., Le Corre M., Rigault F., Blanfort V. (2009). Les espèces exotiques envahissantes de nouvelle-calédonie. Rapport de convention Province Sud Nord IRD, 55p.
- Hildebrandt U., Regvar M., Bothe H. (2007). Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochem.*, 68, pp.139-46.
- Hinsinger P., Bengough A., Vetterlein D., Young I. (2009). Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant Soil*, 321, pp.117-152.
- Honnay O., Jacquemyn H. (2006). Susceptibility of common and rare plant species to the genetic consequences of habitat fragmentation. *Conserv. Biol.*, 21, pp.823-831.
- IAC (2010). Rapport d'activité 2009. Ed. IAC, juin 2010, 178 p.
- Idris A., Suzana W. (2006). Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*, 41, pp.1117-1123.
- JAFFRÉ T., Latham M. (1976). Recherches sur les possibilités d'implantation végétale sur déblais miniers. Rapport de convention ORSTOM/SLN. 16 p.
- Jaffré T., Latham M., Schmid M. (1977). Aspects de l'influence de l'extraction du minerai de nickel sur la végétation et les sols en Nouvelle-Calédonie. *Cah. ORSTOM (Biol.)*, 12 (4), pp.307-321.
- Jaffré T. (1980). Etude écologique du peuplement végétal des sols dérivés de roches ultrabasiqes en Nouvelle-Calédonie. Thèse, Univ. Paris-Sud (XI)-ORSTOM, Paris.
- Jaffré T., Gauthier D., Rigault F., MacCoy S. (1994a). Les Casuarinacées endémiques, caractéristiques écologiques et nutritionnelles. *Dossier Nouvelle-Calédonie : Bois et Forêts des Tropiques*, 242, pp.31- 43.
- Jaffré T., Morat P., Veillon J.M. (1994b). La flore, caractéristiques et composition floristique des principales formations végétales. *Dossier Nouvelle-Calédonie. Bois et Forêts des Tropiques*, 242, pp.7-30.
- JAFFRE T. (2003). Reconnaissance et caractérisation de la végétation et de la flore de la presqu'île de Vavouto. Rapport de consultance IRD/Falconbridge 20 p.
- JAFFRE T., Dagostini G., Rigault F., Coïc N. (2004). Inventaires floristiques des unités de végétation de la zone d'implantation des infrastructures minières et industrielles de Goro Nickel. Rapport de synthèse. Consultance IRD/Goro Nickel SA. 42 p. + annexes.
- Jaffré T., Rigault F., Dagostini G., Tinel J., Munzinger J. (2009a). Fichier écologique des plantes vasculaires autochtones de la Nouvelle-Calédonie. IRD, UMR AMAP. Laboratoire de Botanique et d'Ecologie Appliquée, Herbarium (NOU), Nouméa.
- Jaffré T., Rigault F., Dagostini G., Tinel-Fambart J., Wulff A., Munzinger J. (2009b). Input of the different vegetation units to the richness and endemism of the New Caledonian flora. In: *Proceedings of the 11th Pacific Sciences Inter Congress*, 2-6 march, Tahiti, French Polynesia.
- Jaffré T., Munzinger J., Lowry II P.P. (2010). Threats to the conifer species found on New-Caledonia's ultramafic massifs and proposals for urgently needed measure to improve their protection. *Biodivers. Conserv.*, 19, pp.1485-1502.
- Janick J., Kityo S., Kim Y.-H. (1989). Production of synthetic seed by desiccation and encapsulation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 25, pp.1167-1172.
- Jarstfer A.G., Farmer-Koppenol P., Sylvia D.M. (1998). Tissue magnesium and calcium affect arbuscular mycorrhiza development and fungal reproduction. *Mycorrhiza*, 7, pp.237-242.
- Jones M., Smith S. (2004). Exploring functional definitions of mycorrhizas: Are mycorrhizas always mutualisms? *Can. J. Bot.*, 82, pp.1089-1099.
- Johnson N., Graham J., Smith F. (1997). Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytol.*, 135, pp.575-86.

- 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, pp.238-249.
- Khade S., Adholeya A. (2007). Feasible bioremediation through arbuscular mycorrhizal fungi imparting heavy metal tolerance: a retrospective. *Bioremediat. J.*, 11, pp.33-43.
- Kormanik P.P., McGraw A.C. (1982). Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhiza in plant roots. In: Schenck, N.C. (Ed.), *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, pp.37– 45.
- L'huillier L., Jaffré T., Wulff A. (2010). Mines et environnement en Nouvelle-Calédonie : les milieux sur substrats ultramafiques et leur restauration. Edition IAC, Nouméa, Nouvelle-Calédonie, 412p.
- Lagrange A. (2010). Études écologiques et microbiologiques des espèces du genre *Costularia* (Cyperaceae), pionnières des sols ultramafiques en Nouvelle-Calédonie : perspectives d'application à la restauration écologique. Doctorat en écologie et microbiologie, Université de Nouvelle-Calédonie, Nouméa, 234p.
- Lambers H., Mougé C., Jaillard B., Hinsinger P. (2009). Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant Soil*, 321, pp.83-115.
- Laroche O. (2011). Revégétalisation de sites miniers et valorisation de boues de stations d'épuration : cas de la Nouvelle-Calédonie. Essai grade de maître en environnement, Centre Universitaire de Formation en Environnement. Sherbrooke, Québec, 117p.
- Latham M. (1975). Les sols d'un massif de roches ultrabasiques de la côte Ouest de la Nouvelle-Calédonie : Le Boulinda. Les sols à accumulation ferrugineuse relative. *Cah. ORSTOM, Ser., Pédologie*, 13, pp.159-172.
- Léonard M., Rastello de Boissesson M., Hubert P., Dellacherie E. (2002). Préparation et caractérisation de microparticules à base d'alginate associatifs. Application à l'encapsulation de protéines. *Matériaux*, pp.1-5.
- Lendzemo V., Kuyper T.W., Urban A., Vegvari G., Puschenreiter M., Schickmann S., Langer I., Steinkellner S., Vierheilig H. (2009). The arbuscular mycorrhizal host status of plants cannot be linked with the *Striga* seed-germination-activity of plant root exudates. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 116 (2), pp.86–89.
- Le Tacon F., Jung G., Michelot P., Mugnier M. (1983). Efficacité en pépinière forestière d'un inoculum de champignon ectomycorhizien produit en fermenteur et inclus dans une matrice de polymères. *Ann. Sci. For.*, 40(2), pp.165-176.
- Leo W. J., McLoughlin A. J., and Malone D. M. (1990). Effects of sterilization treatments on some properties of alginate solutions and gels. *Biotechnol. Progr.*, 6, pp.51–53.
- Ma Y., Dickinson N., Wong M. (2006). Beneficial effects of earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi on establishment of leguminous trees on Pb/Zn mine tailings. *Soil Biol. Biochem.*, 38, pp.1403-1412.
- Marschner H., Cakmak I. (1986). Mechanism of phosphorus-induced zinc deficiency in cotton. *Physiologia Plantarum*, 68, pp.491-96.
- Mathieu J-L. (2002). La Nouvelle-Calédonie. « Que sais-je ? » n°2515. PUF. 126p.
- Mazzeo F. (2004). Exploitation minière et valorisation du patrimoine floristique de Nouvelle-Calédonie. Mémoire de DESS botanique et écologie végétale appliquée, Université de la Réunion, St Denis de la Réunion, 124p.
- Merlin G., Di-Gioia L., Goddon C. (1999). Comparative study of the capacity of germination and of adhesion of various hydrocolloids used for revegetalization by hydroseeding. *Land degrad. Develop.*, 10, pp.21-34.
- Merryweather J., Fitter A. (1995). Phosphorus and carbon budgets: mycorrhizal contribution in the obligately mycorrhizal *Hyacinthoides non-scruta* (L.) Chouard ex Rothm. under natural conditions. *New Phytol.*, 129, pp.619-27.
- Miller R., Smith C., Jastrow J., Bever J. (1999). Mycorrhizal status of the genus *Carex* (Cyperaceae). *American Journal of Botany*, 86, pp.547-553
- Mjahed H. (2009). Caractérisation physico-chimique des films multicouches de polyelectrolytes à base de polysaccharides et de polypeptides en vue d'application dans le domaine des biomatériaux. Doctorat en Physique-Chimie, Université de Strasbourg, Strasbourg, 207p.

- Morat P., Jaffré T., Veillon J.M., Mac Kee H.S. (1981). Atlas de la Nouvelle-Calédonie et Dépendances. Végétation. Planche 15, carte et notice. ORSTOM, Paris.
- Morat P., Jaffré T., Veillon J.M. (1986). Affinités floristiques et considérations sur l'origine des maquis miniers de la Nouvelle-Calédonie, *Bull. Mus. natl. Hist. nat., Paris, sér. 9, section B, Adansonia*, 2, pp.133-182.
- Morat P., Jaffré T., Veillon J.M. (1999). Menace sur les taxons rares et endémiques de la Nouvelle-Calédonie, *Bull. Soc. Bota. du Centre Ouest*, 19, pp.129-144.
- Muthukumar T., Udaiyan K., Shanmughavel P. (2004). Mycorrhizae in sedges, an overview. *Mycorrhiza*, 14, pp.65-77.
- Myers N., Mittermeier R.A., Mittermeier C.G., da Fonseca G.A.B., Kent J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, pp.853-858.
- Newsham K., Fitter A., Watkinson A. (1995). Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. *Trends Ecol. Evol.*, 10, pp.407-411.
- Oostermeijer J.G.B., Luijten S.H., den Nijs J.C.M. (2003). Integrating demographic and genetic approaches in plant conservation. *Biol. Conserv.*, 113, pp.389-398.
- Ouwerx C., Velings N., Mestdagh M.M., Axelos M.A.V. (1998). Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations *Polymer Gels and Networks*, 6, pp.393-408.
- Parniske M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6, pp.763-75.
- Pawlowska T., Blaszkowski J., Ruhling A. (1996). The mycorrhiza status of plants colonizing a calamine spoil mound in southern Poland. *Mycorrhiza*, 6, pp.499-505.
- Pelletier, B., Esterle, M. (1995). Revegetation of nickel mines in New Caledonia. In : *Quelle recherche française en environnement dans le Pacifique Sud, Bilan et perspectives*, Paris, 28-31 mars 1995.
- Perrier N., Amir H., Collin F. (2006). Occurrence of Mycorrhizal symbiosis in the metal-rich laterite soils of the Koniambo massif, New-Caledonia. *Mycorrhiza*, 16, pp.446-458
- Plenchette C., Declerck S., Diop T.A., Strullu D.G. (1996). Infectivity of monoxenic subcultures of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* associated with Ri T-DNA transformed carrot root. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46, pp.545-548.
- Porras-Alfaro A., Bayman P. (2007). Mycorrhizal fungi of *Vanilla*: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. *Mycologia*, 99(4), pp. 510–525.
- Reeves R.D. (2003). Tropical hyperaccumulators of metals and their potential for phytoextraction. *Plant and Soil*, 249, pp.57-65.
- Regvar M., Groznik N., Goljevšček K., Gogala N. (2001). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi form various disturbed ecosystems in Slovenia. *Acta Biol. Slov.*, 44, pp.27-34.
- Sarrailh J-M. (2002). La revégétalisation des exploitations minières : l'exemple de la Nouvelle-Calédonie. Dossier : revégétalisation / restauration. *Bois et forêts des tropiques*, 272 (2), pp.21-31.
- Schüßler A., Schwarzott D., Walker C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 105, pp.1413-1421.
- Schützendübel A., Polle A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.*, 53, pp.1351-65.
- Shah A., Aebi M., Tuor U. (1998). Method to immobilize the aphid-pathogenic fungus *erynia neoaphidis* in an alginate matrix for biocontrol. *Applied and environmental microbiology*, 64(11), pp.4260–4263.
- Smith S.E. (1980). Mycorrhizas of autotrophic higher plants. *Biol. Rev.*, 55, pp.475-510.
- Smith S.E., Read D.J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. 3rd edition, Academic Press, London, 787p.
- 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, pp.511-24.
- Steinbach H.S., Benech-Arnold R., Sanchez R.A. (1997). Hormonal regulation of dormancy in developing sorghum seeds. *Plant Physiology*, 113, pp.149–154.
- Strullu D.G. (1991). *Les mycorrhizes des arbres et plantes cultivées*. Lavoisier, Tec et Doc, Paris, 250p.
- Trappe J. M. (1977). Selection of Fungi for Ectomycorrhizal Inoculation in Nurseries. *Annual Review of Phytopathology*, 15, pp.203-222.

- Tordoff G.M., Baker A.J.M., Willis A. J. (2000). Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous mine wastes. *Chemosphere*, 41, pp.219–228.
- Trouvelot A., Kough J., Gianinazzi-Pearson V. (1986). Estimation of VA mycorrhizal colonisation levels. Research for methods having a functional significance. In: Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. (Eds.), *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*. Service des Publications INRA, Versailles, pp.223–232.
- 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, pp.185-90.
- Van Kekerix L., and Kay, B. L. (1986). Revegetation of disturbed land in California: Anelement of mined–land reclamation. Sacramento, USA, California Department of Conservation, Sacramento, 105p.
- Vassilev N., Vassileva M., Azcon R., Medina A. (2001). Application of free and Ca-alginate-entrapped *Glomus deserticola* and *Yarrowia lipolytica* in a soil–plant system *Journal of Biotechnology*, 91, pp.237–242.
- Vavrek M., Colgan Wes. (2003). The use of a hydroseeder to revegetate oil brine spill sites. In: 10th Annual International Petroleum Environmental Conférence (Ipec). School of Biological Sciences Louisiana Tech University. Houston, TX- November, pp.11-14.
- Schroeder M.S., Janos D.P. (2004). Phosphorus and intraspecific density alter plant response to arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil*, 264, pp.335-48.
- Taqieddin E, Amiji M. (2004). Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules. *Biomaterials*, 25, pp.1937-1945.
- Velings N., Mestdagh M. (1995). Physico-Chemical Properties of Alginate Gel Beads. *Polymer Gels and Networks*, 3, pp.311-330.
- Vincent E. (2010). Les alginates et leurs applications en pharmacie et en ingénierie – Application à la construction d'un biomatériau. Doctorat en Pharmacie, Université Henry-Poincaré, Nancy, 135p.
- Viot R. (1956). La végétation canaque. Mémoire. Mus. Nat.Hist Nat Paris, sér. Bot., 8 Paris.
- Vivas A., Barea J., Azcon R. (2005). Interactive effect of *Brevibacillus brevis* and *Glomus mosseae*, both isolated from Cd contaminated soil, on plant growth, physiological mycorrhizal fungal characteristics and soil enzymatic activities in Cd polluted soil. *Environ. Pollut.*, 134, pp.257-66.
- VOGELSANG K., Bever J., Griswold M., Schultz P. The Use of Mycorrhizal Fungi in Erosion Control Applications. Bloomington (IN): Caltrans. 2004. 150p. Final Report No. 65A0070.
- Wild H., Wiltshire G. H. (1971). The problem of vegetation Rhodesian Mines dumps examined. *Chamber of Mines Journal, Rhodesia*, 13 (11), pp.26-30
- Williamson N.A., Johnson M.S., Bradshaw A. D. (1982). *Mine Wastes Reclamation*. London, UK, Mining Journal Books Ltd., 103 p.
- Whiting S., Reeves R., Richards D., Johnson M., Cooke J., Malaisse F., Paton A., Smith J., Angle J., Chaney R., Ginocchio R., Jaffré T., Johns R., McIntyre T., Purvis O., Salt D., Schat H., Zhao F., Baker A. (2004). Research priorities for conservation of metallophytes biodiversity and its sustainable uses in ecological restoration and site. *Restor. Ecol.*, 12(1), pp.106-116.
- Yoneyama K., Takeuchi, Y., Sekimoto H. (2007). Phosphorus deficiency in red clover promotes exudation of orobanchol, the signal for mycorrhizal symbionts and germination stimulant for root parasites. *Planta*, 225, pp.1031-1038.
- Zilliox C. (2011). Rôle des champignons mycorrhiziens à arbuscules dans l'adaptation des espèces végétales aux milieux ultramafiques en Nouvelle-Calédonie. Rapport de stage, FIF AgroparisTech, Paris, 53p.
- Zongo C. (2010). Données biologiques et physiologiques sur les semences de quelques espèces de milieux ultramafiques néo-calédoniens. Doctorat en biologie et physiologie végétale, Université Nouvelle-Calédonie, Nouméa, 340 p.

Sitiographie

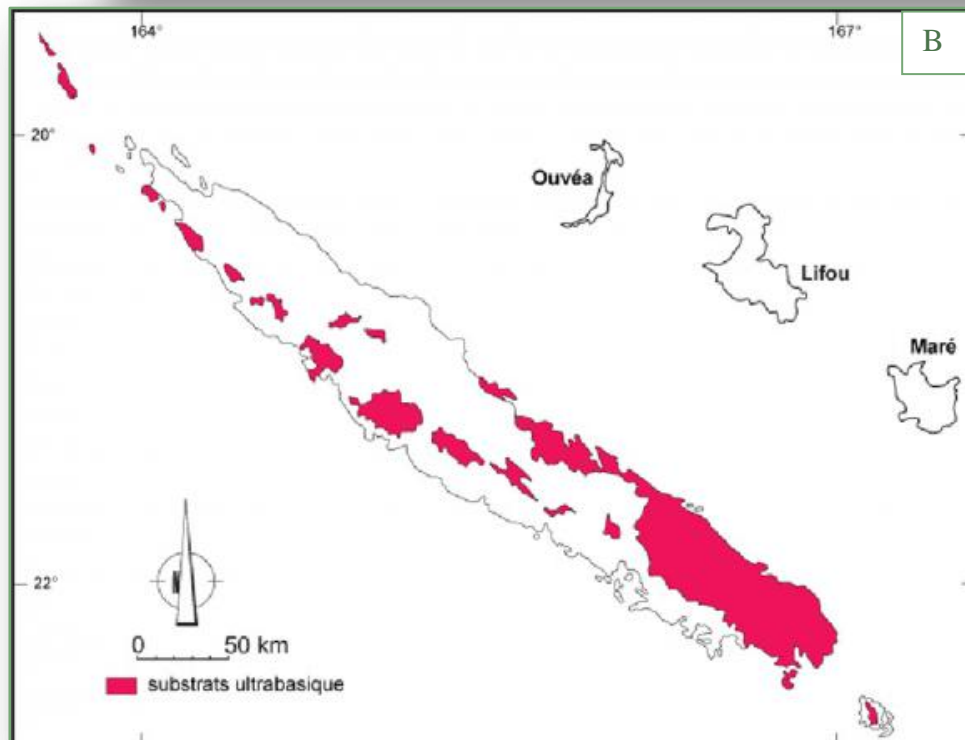
DIMENC (2005). Mines et carrières. In DIMENC, Mines et carrières, [En ligne]. http://dimenc.gouv.nc/portal/page/portal/dimenc/les_services/mines_carrieres/telechargement (Page consultée le 14/05/12).

SER (2004) The SER International Primer on ecological restoration, Version 2. Society for Ecological Restoration Sciences and Policy Working Group. <http://www.ser.org/resources/resources-detail-view/ser-international-primer-on-ecological-restoration> (Page consultée le 27/04/12).

Annexes

- Annexe I La Nouvelle-Calédonie : localisation et répartition de sols ultramafiques
- Annexe II Les vers à stériles latéritiques
- Annexe III Les cicatrices laissées par les exploitations minières dans le paysage
- Annexe IV Le climat de Nouvelle-Calédonie
- Annexe V Répartition des formations végétales de Nouvelle-Calédonie
- Annexe VI Extrait du code minier
- Annexe VII Les espèces invasives de Nouvelle-Calédonie suite à des essais de revégétalisation
- Annexe VIII L'hydroseeding
- Annexe IX Les champignons mycorhiziens
- Annexe X Les interactions champignons mycorhiziens et bactéries du sol
- Annexe XI Les algues brunes : des productrices d'alginate
- Annexe XII Structure et gélification de l'alginate de sodium
- Annexe XIII *Costularia comosa*
- Annexe XIV *Alphitonia neocaledonica*
- Annexe XV *Gymnostoma deplancheanum*
- Annexe XVI *Dodonea viscosa*
- Annexe XVII Le Sorgho
- Annexe XVIII Protocole d'extraction des spores du LIVE
- Annexe XIX Protocole d'enrobage de graines avec spores d'AMF à l'alginate du LIVE
- Annexe XX Protocole de coloration des spores de l'enrobage du LIVE
- Annexe XXI Répartition moyenne des enrobages dans les catégories 1 à 4 réalisée pour le taux de recouvrement selon les différents traitements
- Annexe XXII Technique d'inoculation à partir de poudre de microbilles d'alginate encapsulant un inoculum

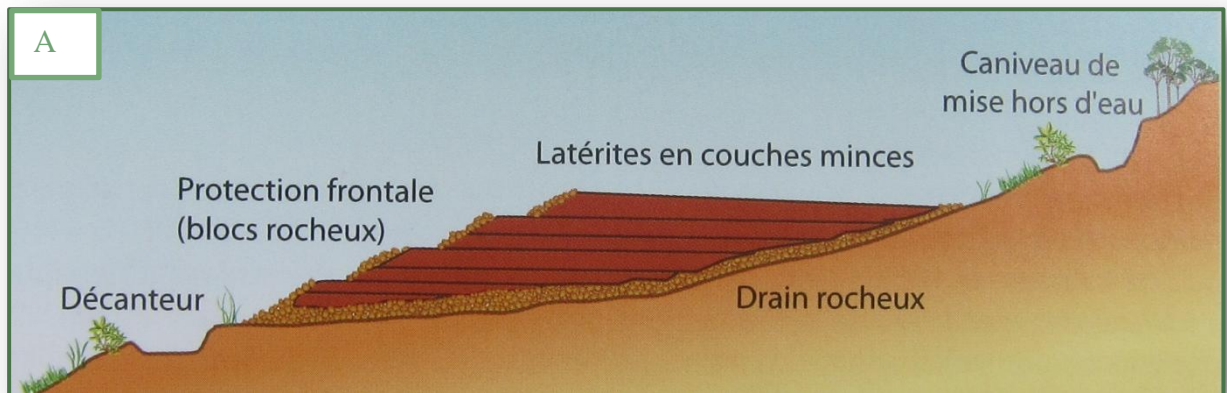
Annexe I : La Nouvelle-Calédonie : localisation et répartition des sols ultramafiques



A : Localisation de la NC (<http://planetantilles.com/index.php5?IdPage=1252236674>)

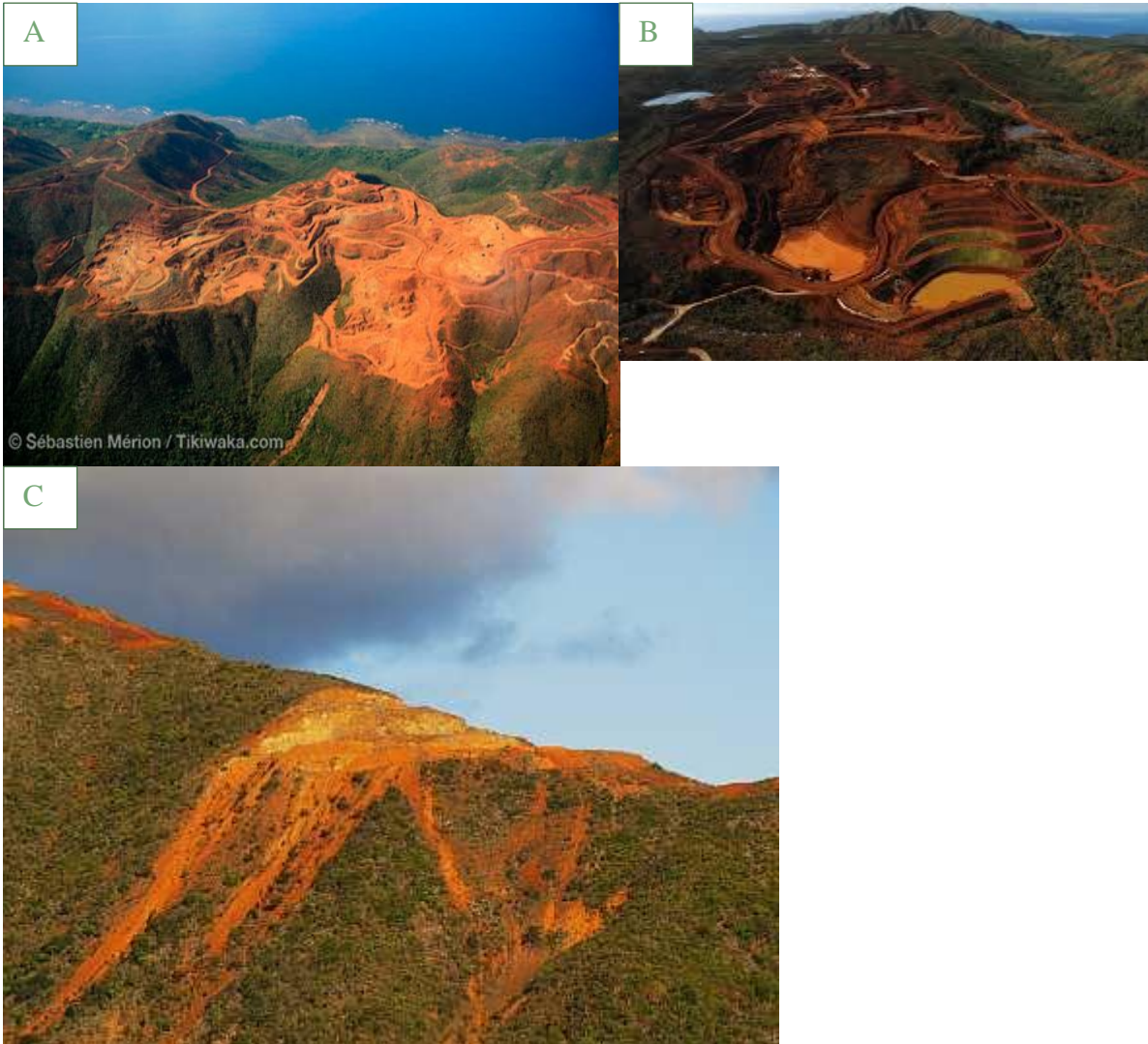
B : Répartition des substrats ultrabasiques en NC (<http://jso.revues.org/4052>)

Annexe II : Les verses à stériles latéritiques



A : Coupe d'une verse à stériles latéritiques (*L'huiller et al., 2010*)

Annexe III : Les cicatrices laissées par les exploitations minières dans le paysage



A Baie de Plum (Sebastien Mériion/ Tikikawa.com)

B Goro Nickel (photostp.free.fr)

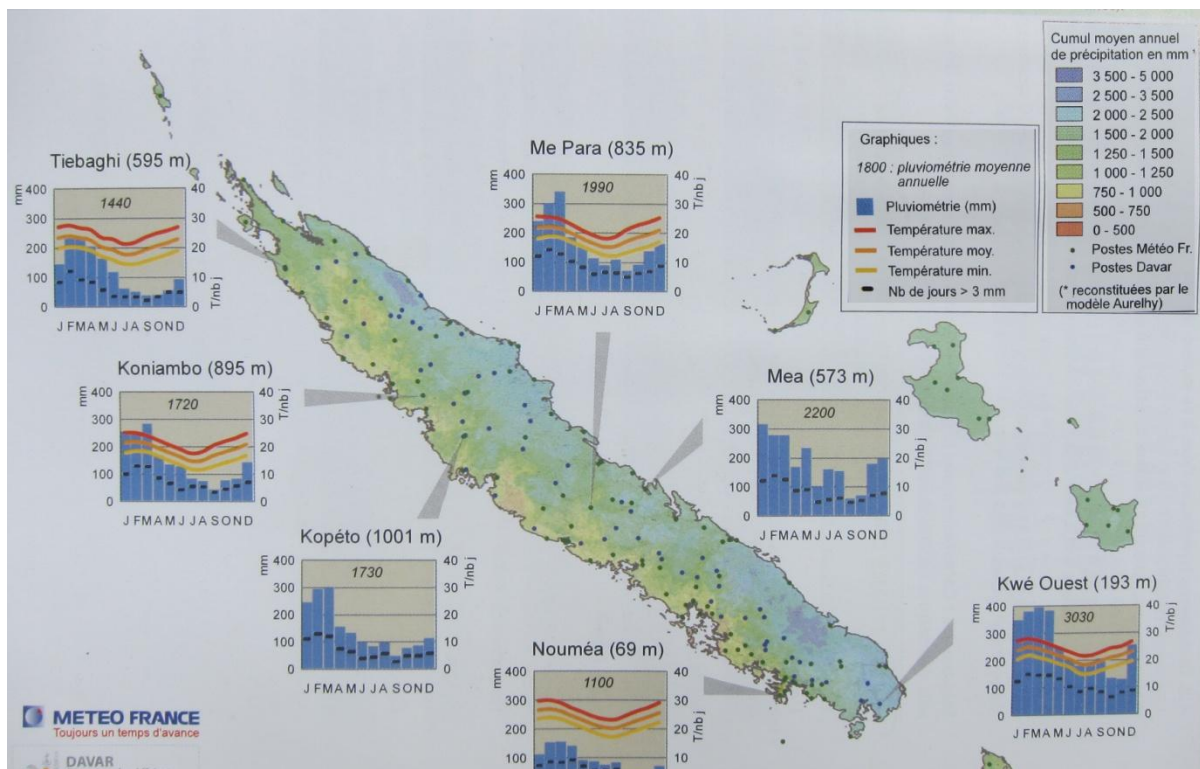
C Ancienne mine (eplp.asso.nc)

Annexe IV : Le climat de Nouvelle-Calédonie

La Nouvelle-Calédonie est située dans la zone intertropicale. Très isolée géographiquement et soumise au courant des alizés, elle bénéficie d'un climat relativement tempéré, que l'on peut qualifier de "tropical océanique". La variation annuelle de la position de la ceinture anticyclonique subtropicale et des basses pressions intertropicales détermine deux saisons principales séparées par deux intersaisons :

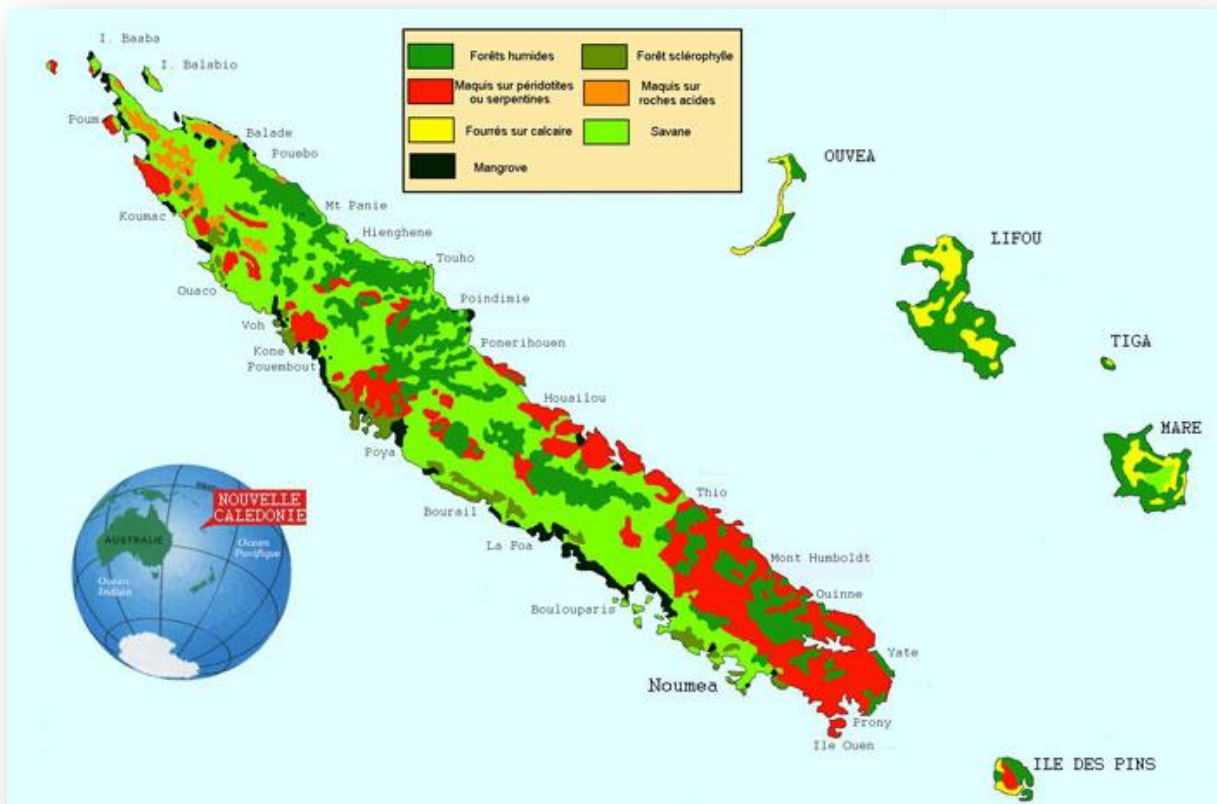
- la saison chaude et humide de mi-novembre à mi-avril : dite "saison des cyclones". Des dépressions se forment et évoluent parfois en cyclones tropicaux qui affectent fréquemment le territoire et conduisent à de fortes pluies.
- la saison de transition de mi-avril à mi-mai : les perturbations tropicales sont rares, la pluviosité diminue et la température décroît sensiblement.
- la saison fraîche de mi-mai à mi-septembre : la température de l'air passe par son minimum annuel.
- la saison sèche de mi-septembre à mi-novembre : la température de l'air augmente progressivement, tandis que la pluviosité est à son minimum annuel. L'alizé souffle en quasi permanence. C'est la période la plus belle de l'année, mais aussi la plus sèche.

Les irrégularités de climat peuvent être nombreuses et la pluviométrie est dépendante des pluies cycloniques et des dépressions tropicales qui varient d'une année sur l'autre, ainsi que des régimes ENSO (El Niño Southern Oscillation) (Mathieu, 2002).



Température et pluviométrie moyennes annuelles de Nouvelle-Calédonie (Météo France)

Annexe V : Répartition des formations végétales de Nouvelle-Calédonie



Les formations végétales de Nouvelle-Calédonie : en rouge les maquis miniers
(<http://www.sco.asso.nc/sco/geographie.php>)

Annexe VI : Extrait du code minier

La commission minière communale comprend :

- le maire de la commune ou son représentant, président ;
- le directeur de l'agence du développement rural et de l'aménagement foncier ou son représentant ;
- le président de l'aire coutumière concernée ou son représentant ;
- le ou les représentants des districts coutumiers concernés ;
- le directeur de l'environnement de la province compétente ou son représentant ;
- un représentant de chaque explorateur ou exploitant ayant une activité minière dans la commune, désigné par celui-ci, ainsi qu'un représentant élu du personnel employé par chacun d'eux ;
- le directeur de l'industrie, des mines et de l'énergie de la Nouvelle-Calédonie ou son représentant, secrétaire.

Article Lp. 112-18

La commission minière communale est réunie à la demande de son président.

La convocation est adressée par le directeur de l'industrie, des mines et de l'énergie de la Nouvelle-Calédonie au moins huit jours avant la date de la réunion. Elle est accompagnée, lorsque la nature et l'étendue des travaux l'exigent, d'un résumé non technique des sujets à l'ordre du jour, préparé par l'explorateur ou l'exploitant.

La commission minière communale ne peut siéger valablement que si la moitié des membres sont présents. En l'absence de quorum, son président propose le report de la réunion dans les quinze jours suivants. La commission siège alors valablement quel que soit le nombre de membres présents.

Elle émet un avis sur l'activité minière envisagée, notamment sur son impact sur l'aménagement de l'espace et sur l'environnement, au vu des informations portées à sa connaissance par l'explorateur ou l'exploitant, relatives aux modalités techniques des activités d'exploration, d'exploitation, de remise en état et de réhabilitation menées sur le territoire de la commune concernée.

Cet avis est émis à la majorité des membres présents. En cas de partage égal des voix, la voix du président de la commission minière communale est prépondérante.

Lorsqu'elle est consultée sur une demande d'autorisation de travaux de recherches ou d'exploitation, la commission minière communale dispose d'un délai d'un mois pour émettre son avis. Si elle ne se prononce pas avant la clôture de l'enquête publique, son avis est réputé favorable.

Le président de la commission minière communale peut inviter à participer aux réunions de cette commission tout représentant des associations de protection de l'environnement et tout expert technique ou

Extrait du code minier Article Lp. 112-18 (www.juridoc.gouv.nc)

Annexe VII : Les espèces invasives de Nouvelle-Calédonie suite à des essais de revégétalisation

Taxon	I-Rank score	Date d'introduction estimée	Gestion
<i>Arundo donax</i>	73	1883	Lutte biologique à étudier/lutte mécanique+chimique
<i>Lantana camara</i>	68	1863	Lutte mécanique dans les zones de conservation
<i>Pinus caribaea</i>	68	?	Au minimum : Stopper l'introduction de nouvelles souches. Contrôler de manière stricte les parcelles plantées en éliminant systématiquement les plantules hors parcelles.
<i>Eichhornia crassipes</i>	60	1911	Lutte biologique à étudier/mécanique sur les petites surfaces
<i>Salvinia molesta</i>	60	1956	Lutte biologique à étudier/mécanique sur les petites surfaces
<i>Leucaena leucocephala</i>	51	1855	Lutte /mécanique+chimique. Pratiques de « bonnes gestions » en zone d'élevage
<i>Melia azedarach</i>	51	1884	Lutte mécanique + chimique au moins dans les zones de conservation
<i>Macfadyena unguis-cati</i>	48	1950	Lutte biologique à étudier/lutte mécanique lorsque c'est possible/lutte chimique/contrôle dans les zones de conservation
<i>Miconia calvescens</i>	48	1970	Gestion en cours
<i>Psidium cattleianum</i>	48	1863	Lutte biologique à étudier/mécanique/chimique/contrôle dans les zones de conservation
<i>Cedrela odorata</i>	43	1978	Lutte mécanique/Lutte chimique/contrôle dans les zones de conservation
<i>Ipomoea indica</i>	43	?	Lutte mécanique/espèce à étudier
<i>Merremia peltata</i>	43	1888	Lutte mécanique/Lutte "biologique" : la plante ne résiste pas à l'ombrage, planter des espèces pionnières puis des espèces climax par simple appot de graine (source : GISD)
<i>Passiflora laurifolia</i>	43	?	Lutte mécanique/espèce à étudier
<i>Spathodea campanulata</i>	43	1952	Lutte mécanique/contrôle dans les zones de conservation
<i>Syzygium jambos</i>	43	1883	A étudier en priorité/lutte mécanique lorsque c'est possible/contrôle dans les zones de conservation
<i>Thunbergia grandiflora</i>	43	1889	Lutte mécanique/espèce à étudier
<i>Thunbergia laurifolia</i>	43	1950	Lutte mécanique/espèce à étudier
<i>Tecoma stans</i>	40	1904	Lutte biologique à étudier/ lutte chimique
<i>Egeria densa</i>	38	?	A étudier
<i>Falcataria moluccana</i>	38	1900	A éliminer puisqu'encore relativement localisé.
<i>Hydrilla verticillata</i>	28	1988	A étudier

<i>Phyllostachys flexuosa</i>	38	?	A éliminer mécaniquement lorsque c'est possible. Présente l'avantage d'avoir un très faible potentiel de dispersion à longue distance
<i>Typha domingensis</i>	35	1911	A étudier
<i>Furcraea foetida</i>	35	1870	Lutte mécanique + chimique
<i>Megathyrsus maximus</i>	35	1874	Lutte mécanique + chimique
<i>Melinis minutiflora</i>	35	1940	Lutte mécanique + chimique
<i>Neonotonia wightii</i>	35	?	Encore relativement cantonnée aux zones agricoles et urbaines. Sa gestion n'est pas prioritaire mais l'espèce est à surveiller.
<i>Pluchea odorata</i>	35	1979	En cours d'infestation mais déjà trop implantée pour envisager une lutte mécanique. La lutte biologique semblerait plus appropriée
<i>Rubus rosifolius</i>	35	1883	Lutte biologique
<i>Schinus terebinthifolius</i>	35	1882	Lutte biologique à étudier/lutte mécanique + chimique dans les zones de conservation
<i>Solanum mauritianum</i>	35	1870	A étudier/mécanique + chimique dans les zones de conservation. La gestion de cette espèce n'est toutefois pas prioritaire car elle forme rarement des populations très denses bien que déjà bien implantée sur le territoire
<i>Syzygium cumini</i>	35	1900	Lutte biologique à étudier
<i>Albizia saman</i>	30	1902	Encore relativement cantonnée aux zones agricoles et urbaines. Sa gestion n'est pas prioritaire mais l'espèce est à surveiller.
<i>Mimosa diplotricha</i>	30	1944	Lutte biologique à étudier/lutte mécanique + chimique. Espèce essentiellement située en zone agricole et urbaine. La gestion de cette espèce n'est toutefois pas prioritaire car elle forme rarement des populations très denses bien que déjà bien implantée sur le territoire
<i>Passiflora suberosa</i>	30	1909	Lutte mécanique/chimique. Cette espèce, déjà très fortement implantée sur le territoire, semble surtout problématique dans les milieux très dégradés (particulièrement les forêts sèches) où elle peut former des populations denses. Ailleurs ses taux de couverture restent relativement bas et n'en font pas une espèce prioritaire.
<i>Acanthocereus tetragonus</i>	27	1982	Lutte biologique à étudier/mécanique lorsque c'est possible. Présente l'avantage d'avoir un très faible potentiel de dispersion à longue distance
<i>Anredera cordifolia</i>	27	1883	Espèce encore localisée, à surveiller et à éliminer mécaniquement lorsqu'elle se présente.

<i>Brugmansia arborea/B. candida/B. suaveolens</i>	27	?	Lutte mécanique
<i>Cryptostegia grandiflora</i>	27	1950	Lutte mécanique/chimique/biologique à étudier
<i>Flemingia strobilifera</i>	27	1908	Lutte biologique à étudier/mécanique lorsque c'est possible/informer les populations et contrôler sa propagation
<i>Haematoxylum campechianum</i>	27	1924	Lutte mécanique/contrôle. Espèce encore très localisée dont l'éradication et/ou le contrôle doivent être assurés
<i>Paederia foetida</i>	27	?	A étudier/Lutte mécanique/contrôle. Cette espèce qui n'avait jamais été mentionnée pour la Calédonie jusqu'à présent est à étudier et à contrôler rapidement
<i>Pennisetum purpureum</i>	27	1925	Lutte mécanique+chimique
<i>Sanchezia parvibracteata</i>	27	1905	Lutte mécanique
<i>Thunbergia mysorensis</i>	27	1987	Lutte mécanique
<i>Bambusa vulgaris</i>	22	?	Lutte mécanique/chimique
<i>Caesalpinia decapetala</i>	22	1855	Lutte mécanique/chimique/biologique à étudier
<i>Centrosema pubescens</i>	22	1949	Lutte mécanique/chimique
<i>Grevillea robusta</i>	22	1902	Lutte mécanique/chimique
<i>Ipomoea ochracea</i>	22	1950	Lutte mécanique/chimique?
<i>Opuntia stricta</i>	22	1950	Lutte mécanique/chimique/biologique à étudier
<i>Pistia stratiotes</i>	22	1982	Lutte mécanique/biologique à étudier
<i>Pithecellobium dulce</i>	22	1885	Lutte mécanique/chimique
<i>Pluchea indica</i>	22	1987	Lutte mécanique/chimique
<i>Saritaea magnifica</i>	22	1985	Lutte mécanique/espèce essentiellement plantée comme ornementale, à étudier pour voir les caractéristiques de sa reproduction
<i>Sphagneticola trilobata</i>	22	1974	Lutte mécanique/chimique
<i>Tradescantia spathacea</i>	22	1883	Lutte mécanique/chimique
<i>Tradescantia zebrina</i>	22	1883	Lutte mécanique/chimique
<i>Tripsacum laxum</i>	22	1981	Lutte mécanique/chimique
<i>Urochloa mutica</i>	22	1894	Lutte chimique
<i>Bauhinia monandra</i>	18	1903	Lutte mécanique/chimique
<i>Cyperus alternifolius</i>	18	1912	Lutte mécanique
<i>Ricinus communis</i>	18	1853	Lutte mécanique/mécanique
<i>Sida cordifolia</i>	18	1928	Lutte mécanique/chimique
<i>Solanum torvum</i>	18	1900	Lutte mécanique/mécanique/chimique
<i>Triumfetta rhomboidea</i>	18	1855	Lutte mécanique/chimique
<i>Acacia farnesiana</i>	13	1880	Lutte mécanique/chimique
<i>Ageratum conyzoides</i>	13	1845	Lutte chimique
<i>Albizia lebeck</i>	13	1884	Lutte mécanique/chimique
<i>Ipomoea cairica</i>	13	1845	Lutte mécanique
<i>Psidium quajava</i>	13	1883	Lutte mécanique/chimique

<i>Stachytarpheta cayennensis</i>	13	1884	Lutte mécanique/chimique
<i>Argemone mexicana</i>	10	1900	Lutte mécanique/chimique
<i>Digitaria insularis</i>	10	?	Lutte mécanique/chimique
<i>Indigofera suffruticosa</i>	10	1880	Lutte mécanique
<i>Jatropha gossypifolia</i>	10	1900	Lutte mécanique/chimique
<i>Kalanchoe pinnata</i>	10	1883	Lutte mécanique/chimique
<i>Kyllinga elata</i>	10	?	Lutte mécanique/chimique
<i>Mikania micrantha</i>	10	?	Lutte mécanique/chimique
<i>Ocimum gratissimum</i>	10	1874	Lutte mécanique/chimique
<i>Pennisetum setaceum</i>	10	1984	Lutte mécanique
<i>Themeda quadrivalvis</i>	10	?	Lutte mécanique/chimique
<i>Tithonia diversifolia</i>	10	1951	Lutte mécanique
<i>Urena lobata</i>	10	1858	Lutte mécanique/chimique
<i>Macroptilium atropurpureum</i>	8	1983	Lutte chimique
<i>Acacia nilotica</i>	5	1930	Lutte mécanique/chimique/biologique
<i>Aristolochia elegans</i>	5	1925	Lutte mécanique
<i>Bothriochloa pertusa</i>	5	1925	Lutte mécanique/chimique
<i>Caesalpinia bonduc</i>	5	?	Lutte mécanique
<i>Hedychium coronarium</i>	5	1985	Lutte mécanique
<i>Heteropogon contortus</i>	5	?	Lutte mécanique/chimique
<i>Merremia tuberosa</i>	5	1880	Lutte mécanique
<i>Miscanthus floridulus</i>	5	?	Lutte mécanique
<i>Paspalum urvillei</i>	5	1940	
<i>Rivina humilis</i>	5	1900	Lutte mécanique
<i>Senna tora</i>	5	1984	Lutte mécanique/chimique/biologique
<i>Stylosanthes guianensis</i>	5	1983	Lutte mécanique
<i>Turnera ulmifolia</i>	5	1983	Lutte mécanique

Tableau récapitulatif montrant les taxons, leur rang d'impact, leur date estimée d'introduction ainsi que des notes concernant la gestion. Les espèces mentionnées en orange sont à considérer en priorité. Le I-Rank correspond au « rang d'impact », plus il est fort plus l'impact est fort (*Hequet et al., 2009*).

Annexe VIII : L'hydroseeding



A image publicitaire SIRAS. (www.SIRAS.nc vue le 24/05/12)

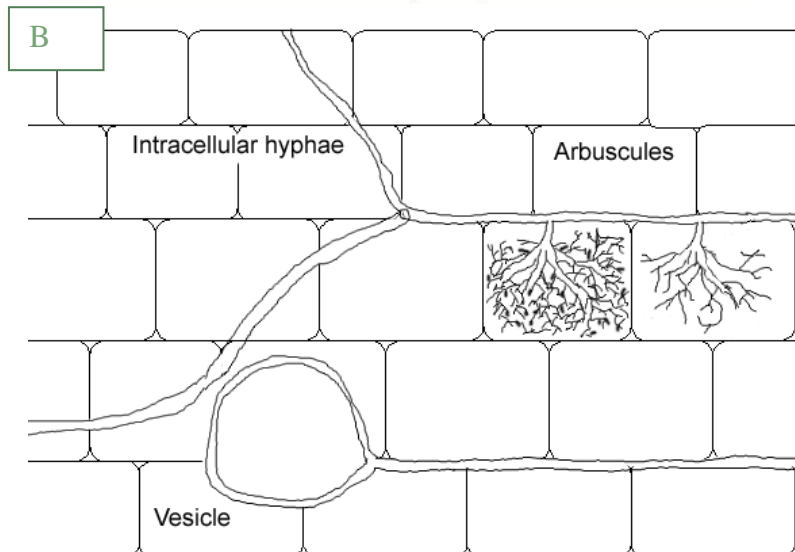
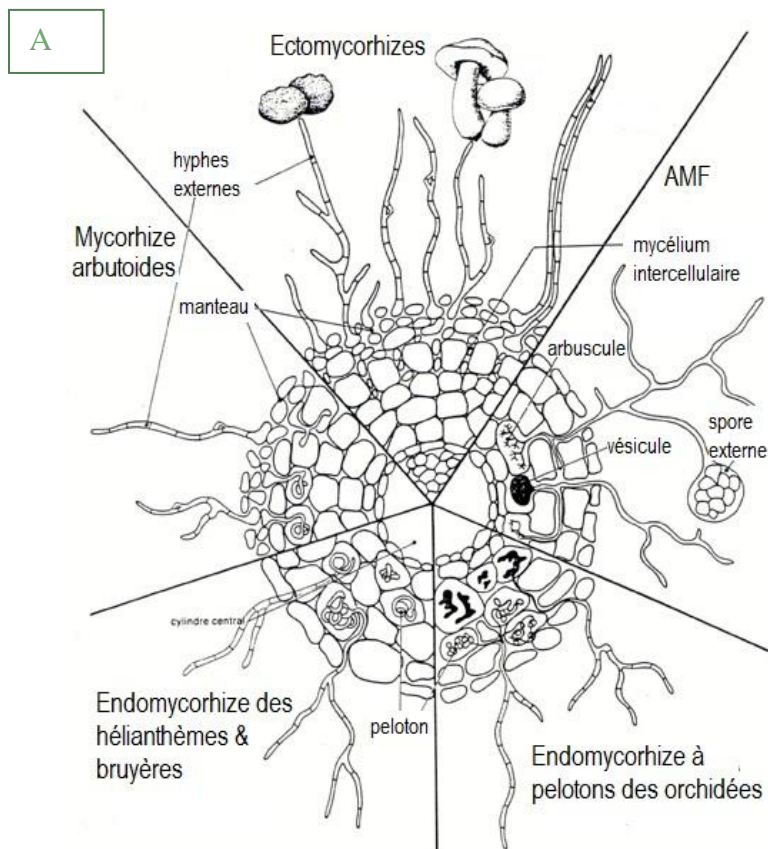
B Photo d'ensemencement hydraulique sur pente rude. (www.vegeland.com vue le 03/04/12)

Aujourd'hui, de nombreuses sociétés spécialisées (SIRAS, SATAR, HYDROGREEN) dans la revégétalisation utilisent le système d'ensemencement hydraulique encore appelé « hydroseeding ». Cette technique consiste à propulser sur le terrain à végétaliser un complexe composé d'eau, de graines, de fertilisation organique ou minérale et d'éléments structurants, à l'aide d'un hydrosemoir de plusieurs milliers de litres,

Cette technique est adaptée aussi bien :

- à la réalisation d'engazonnements et de pelouses
- à la stabilisation et à la protection contre l'érosion de talus

Annexe IX : Les champignons mycorhiziens

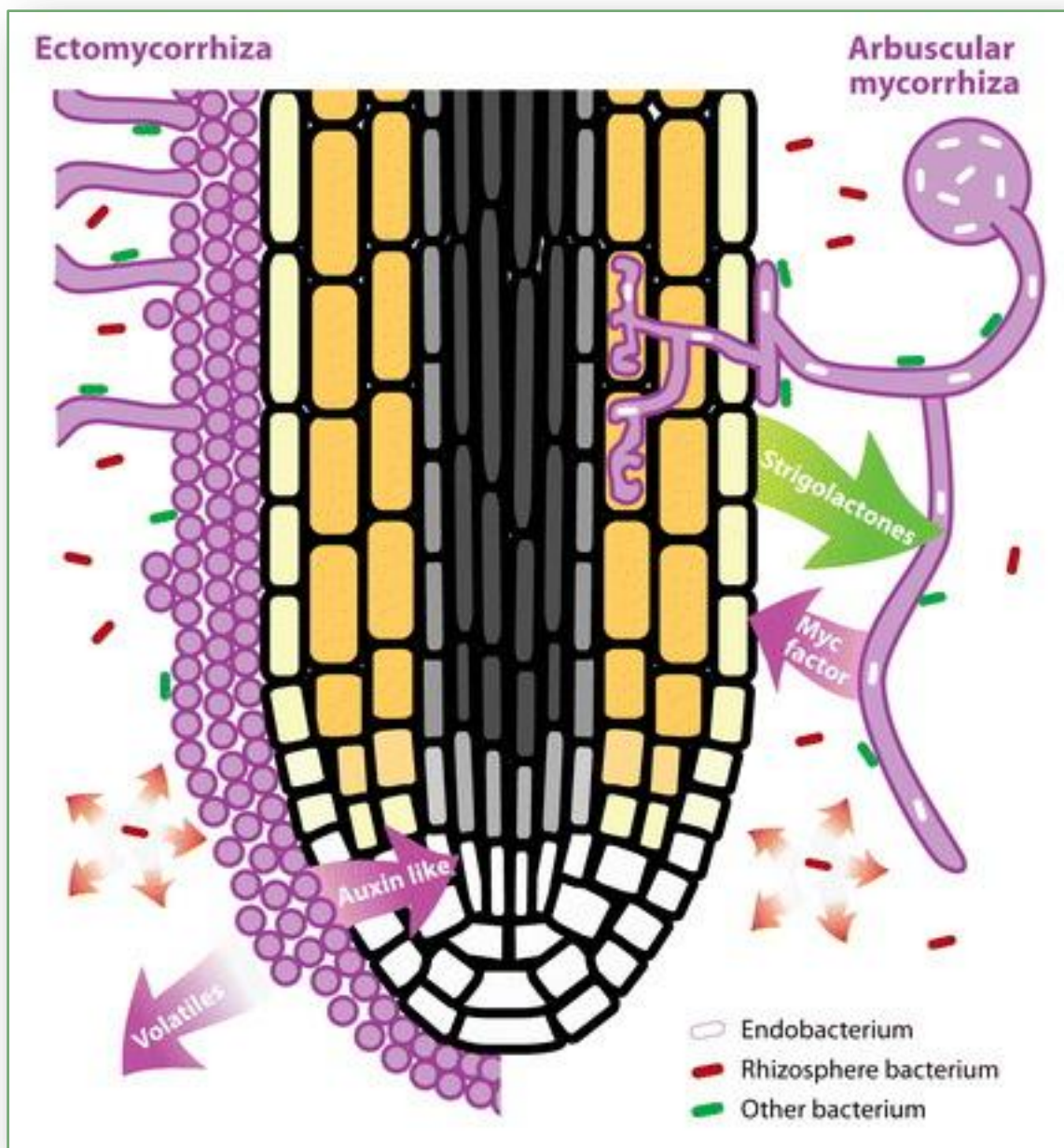


A : Les différents groupes de champignons mycorhiziens en fonction du type de relation avec la plante et des structures observés. Ce rapport concerne le groupe des AMF.

(<http://archimede.bibl.ulaval.ca/archimede/fichier/22964/22964002.jpg>)

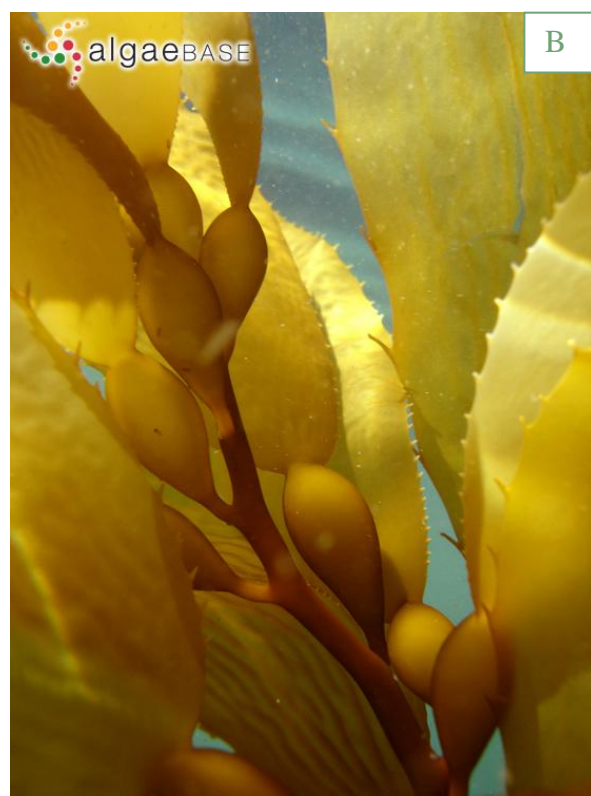
B : Les différentes structures d'AMF (Vogelsang et al., 2004)

Annexe X : Les interactions champignons mycorhiziens et bactéries du sol



Les bactéries de la rhizosphère, en particulier les bactéries PGPR, interagissent avec les mycorhizes qui sont elles-même en interaction avec les cellules de la racine des plantes. Cette association semble accentuer l'effet bénéfique qu'entraîne déjà la symbiose. (<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.micro.091208.073504?journalCode=micro>)

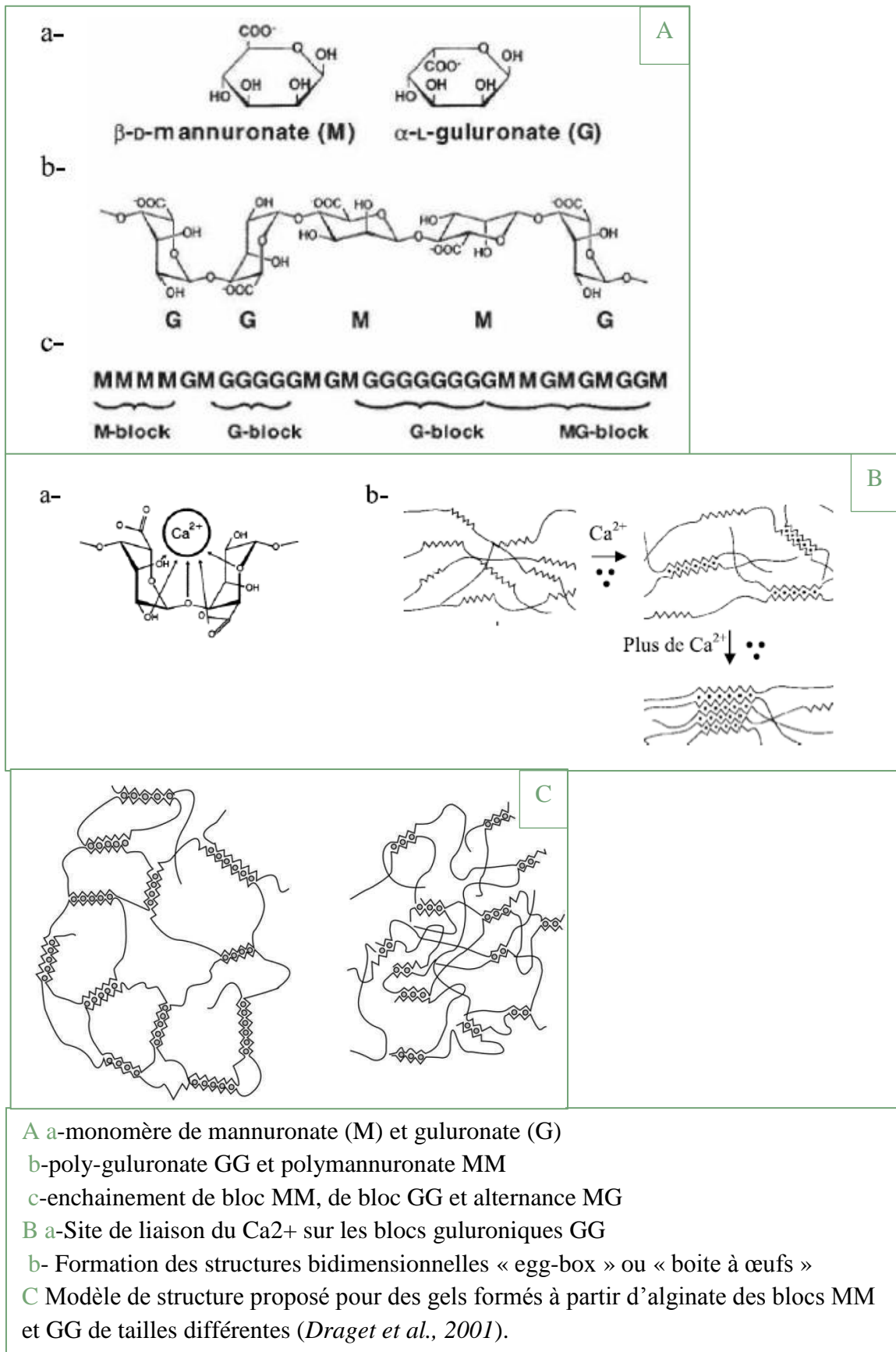
Annexe XI : Les algues brunes productrices d'Alginate



- A *Laminaria* (www.visoflora.com)
B *Macrocystis pyrifera* (algaebase.org)
C Production d'algue (algaebase.org)

Les principales productrices d'alginate sont les algues brunes du genre Laminaires, *Macrocystis* et *Fucus*.

Annexe XII : Structure et gélification ionotropique de l'alginate



Annexe XIII : *Costularia comosa*



Description Générale : Herbe.

Habitat : Du nord au sud : dans les maquis et les formations palustres ou marécageuses (MR)

Substrat : Sur sol ultra basique.

Feuille : Feuilles planes d'environ 1 cm de large à la base, très effilées au sommet. Présence d'une nervure centrale.

Fruits : Grands panicules pouvant dépasser 1 m de hauteur et portant beaucoup de graines. Les graines sont fines, allongées, légèrement cylindriques, de couleur claire.

Reproduction : floraison : septembre, octobre

Particularité : plante pionnière, recolonisant les sites dégradés.

Synonyme : *Schoenus comosus* C.B.Clarke

(endemia.nc)

Annexe XIV : *Alphitonia neocaledonica*



Taxonomie directe: Tracheophytes > Angiospermes > Dicotyledones > Rhamnaceae > Alphitonia > *Alphitonia neocaledonica*

nom vernaculaire: Alphitonia commun, kua (xârâcùù).

Description Générale : Arbuste caractéristique par la forte odeur d'onguent, camphrée, de l'écorce. Arbre mince et élancé, écorce blanche marbrée assez lisse, cime ronde, banches minces.

Répartition en Nouvelle-Calédonie : Principalement au sud de la Grande-Terre, absent des Loyauté.

Substrat : Terrains ultra ferrallitiques ou sédimentaires bien alimentés en eau.

Feuille : Feuilles alternes d'environ 10 cm de long.. Pétiole d'environ 1-3 cm. Le dessus des feuilles est vert foncé brillant, le revers est blanc ou roux, pubescent. Rameaux veloutés gris plomb, en zig-zag. Pousses de jeunesse fauves.

Phénologie (Fleur) : Petites grappes fauves à l'aisselle des feuilles terminales. 5 pétales en étoile charnus, de 4 mm de diamètre, veloutés à l'extérieur, lisse, blanc verdâtre à l'intérieur.

Fruits : Infrutescences en panicules. Les fruits renferment, à la manière des cerises de café, deux graines grossièrement hémisphériques assez grosses (1 - 1,5 cm de diamètre). Le fruit est noir à maturité.

Reproduction : De décembre à mai. Fructification de novembre à janvier.

Habitat : Forêts denses humides, forêt sèche ou forêt sclérophylle, maquis minier (FLM)

Synonyme : *Pomaderris neocaledonica* Schltr.

Particularité : L'architecture de cette espèce est conforme au Modèle d'Attims. Situation IUCN : LR

(endemia.nc)

Annexe XV : *Gymnostoma deplancheanum*



Taxonomie directe: Tracheophytes > Angiospermes > Dicotyledones > Casuarinaceae > *Gymnostoma* > *Gymnostoma deplancheanum*

Nom vernaculaire: Bois de fer du sud.

Répartition en Nouvelle-Calédonie : Il constitue des peuplements importants dans le Massif du Sud.

Substrat : Pousse sur des sols ferrallitiques acides, plus ou moins indurés.

Habitat : Les maquis miniers (M)

Phénologie (Fleur) : Des fleurs mâles et des fleurs femelles.

Synonyme : *Casuarina deplancheana* Miq.

Particularité : L'architecture de cette espèce est conforme au Modèle de Rauh.

(endemia.nc)

Annexe XVI : *Dodonea viscosa*



Taxonomie directe: Tracheophytes > Angiospermes > Dicotyledones > Sapindaceae >

Dodonaea > Dodonaea viscosa > Dodonaea viscosa ssp. viscosa

Description Générale : Arbuste ayant une teneur élevée en azote dans ses tissus foliaires.

Répartition en Nouvelle-Calédonie : Répandue sur l'ensemble du Territoire.

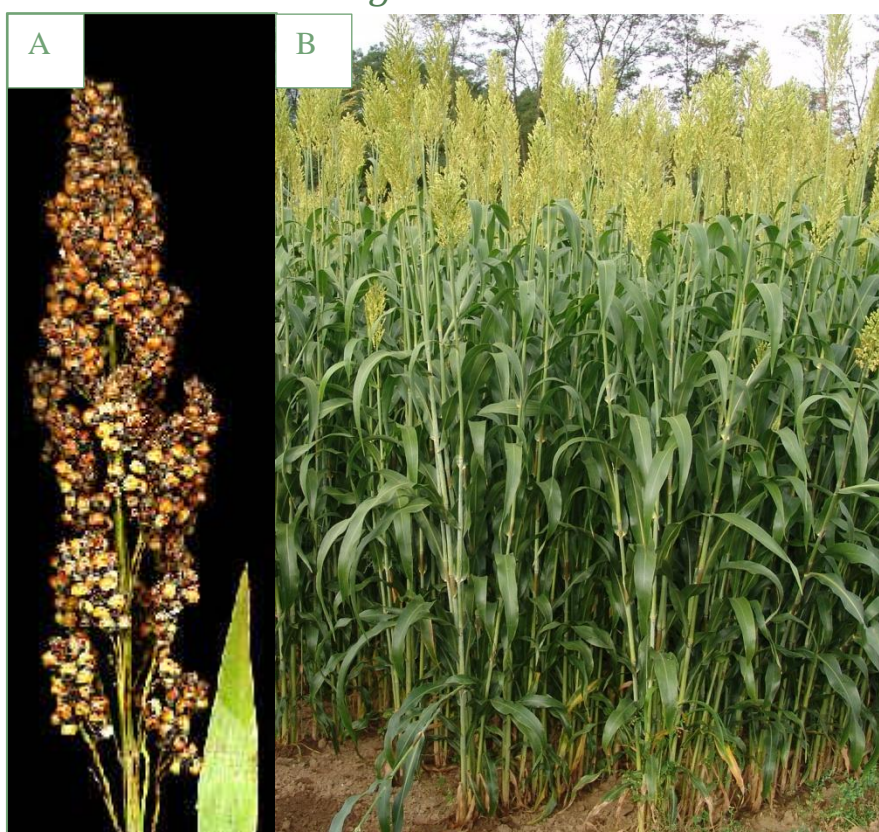
Substrat : Sur sols bruns hypermagnésiens ou sur terrains volcano-sédimentaires.

Habitat : Forêts sèches ou forêts sclérophylles, maquis miniers (LM)

Phénologie (Fleur) : Fleurs de couleur orangée.

Synonyme : *Ptelea viscosa* L.

(endemia.nc)

Annexe XVII : *Le Sorgho*

Cycle levée-floraison : 70 – 80 jours

Cycle levée – maturité : 100 - 115 jours

Photopériodisme : négatif

Port de la plante : Erigé

Tallage : Faible, le nombre de talles est de 1 à 2/pied

Hauteur de la plante : 1.40 à 1.80m suivant les sols et la saison

Couleur de la feuille : Vert foncé

Diamètre de la tige : 2 – 3cm environ

Feuille paniculaire : insertion à la base de la panicule

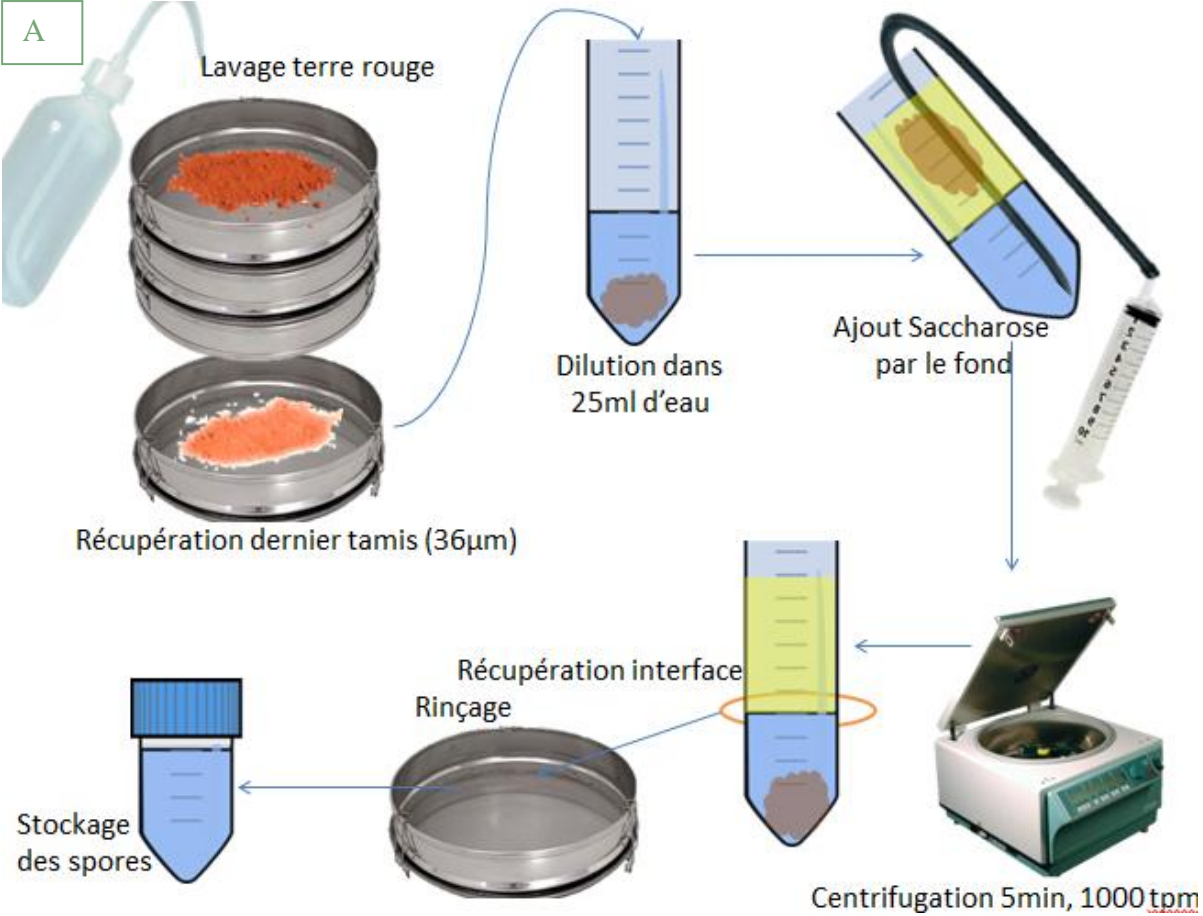
Forme de la panicule : dressée, arrondie, compacte

Forme et couleur du grain : rond sphérique, blanc

A Fructification du *Sorghum* (isaisons.free.fr)

B Plant de *Sorghum* (energygenetics.com)

Annexe XVIII : Protocole d'extraction des spores



B

PROTOCOLE D'EXTRACTION DE SPORES

- Mettre l'échantillon de sol (poids à préciser) dans un bécher, y ajouter de l'eau et homogénéiser le tout avec une spatule afin de bien mettre en suspension les spores.
- Laisser reposer un instant.
- Verser l'échantillon sur 3 tamis empilés dont le dernier sera de 50 μm , et bien rincer le bécher dans les tamis afin de ne pas perdre de spores.
- Rincer abondamment l'échantillon avec l'eau du robinet.
Faire attention à ce que le dernier tamis ne déborde pas sinon il n'y aura plus de spores.
- Une fois que le rinçage est fait, recueillir les spores sur le tamis de 50 μm à l'aide d'une pipette en plastique ou pasteur. Les mettre dans un tube à centrifuger de 50 ml.
Prendre toutes les spores et rajouter de l'eau s'il le faut jusqu'à 25 ml dans le tube à centrifuger.
- Ajouter doucement au fond du tube à centrifuger, 20 ml de saccharose à 50% (préalablement préparé), grâce à une seringue munie d'un embout en plastique souple.
La solution de saccharose à 50 % se fait en prenant 500 grammes de saccharose pour 500 ml d'eau distillée. Dissoudre le saccharose dans de l'eau distillée tiédie pour faciliter le procédé.
- Bien refermer le tube à centrifuger, et le mettre dans la centrifugeuse à 2000 rpm (Round Per Minute) pendant 5 minutes.
Attention ! Il faut bien équilibrer la centrifugeuse avant tout. Et vérifier les paramètres avant de centrifuger.
- Récupérer le tube à centrifuger et prendre les spores à l'aide d'une pipette en plastique ou pasteur, qui se trouvent à la limite des 2 phases que font l'eau et le saccharose.
Prendre soin de ne pas mélanger le tube.
- Rincer abondamment les spores dans un tamis de 36 μm , et récupérer les spores avec une pipette en plastique ou pasteur.
- Mettre ces spores soit dans une boîte de Pétri quadrillée afin de pouvoir les observer et les compter à la binoculaire, ou soit dans un autre tube à centrifuger pour une prochaine utilisation.
Les spores peuvent se conserver pendant 24h maximum dans de l'eau à la chambre froide. Mais il faut les utiliser au plus vite car les spores se détériorent rapidement et perdent de leur efficacité.

Annexe XIX : Protocole d'enrobage de graines avec spores d'AMF à l'alginate du LIVE

Novembre 2010

PROTOCOLE D'ENROBAGE DE GRAINES PAR L'ALGINATE DE SODIUM

L'essai d'enrobage des graines se fait grâce à une solution d'alginate de sodium combinée ou non à des spores de mycorhizes.

Deux espèces seront utilisées pour cette expérience :

- o *Alphitonia neocaledonica*
- o *Costularia comosa*

1. Extraction des spores de mycorhizes :

- Utiliser le protocole d'extraction des spores. On prendra ici les spores PSB1, choisies pour leur qualité et leur nombre.
- En fin d'extraction des mycorhizes, éliminer le plus possible le surageant.

2. Tri et Désinfection des semences :

- Faire un test de viabilité sur chaque lot de graines utilisé pour l'expérience (Cf. Test de Viabilité).
- Trier 400 graines de chaque espèce et les désinfecter (Cf. Protocole de désinfection).

3. Préparation des solutions d'alginate de sodium :

- Préparer une solution d'alginate de sodium de 20 g/L et une de 10 g/L.

Pour 20 g/L : Dissoudre 4 g d'alginate de sodium dans 200 ml d'eau distillée et porter la solution à ébullition au micro-onde. Homogénéiser à l'aide d'une baguette en verre.

Pour 10 g/L : Dissoudre 2 g d'alginate de sodium dans 200 ml d'eau distillée et porter la solution à ébullition au micro-onde. Homogénéiser à l'aide d'une baguette en verre.

- Stériliser les solutions en les passant à l'autoclave pendant 20 min à 121 °C.
- Après la stérilisation, sortir les solutions de l'autoclave et attendre qu'elles refroidissent un peu jusqu'à 50 °C environ.

4. Formation des billes d'alginate de sodium :

- Mettre 200 graines de chaque espèce dans 100 ml d'alginate de sodium de 20 g/L et bien homogénéiser.

Faire de même avec la solution de 10 g/L.

- Diviser le culot de spores de mycorhizes en 2.
- Transférer la première partie du culot de spores dans le mélange Alginate-Alphitonia à 20 g/L et l'autre dans celui à 10 g/L. Bien homogénéiser.

Ne pas mettre de spores dans le mélange Alginate-Costularia.



Nous suivons la nature à l'école de la mer.

- Mettre chaque mélange dans une seringue ou un embout de pipette, et verser goutte à goutte dans une solution de CaCl_2 à 0,1M préalablement préparée.

Couper l'embout de pipette ou l'extrémité de la seringue si les graines ne passent pas.

Préparation de la solution de CaCl_2 à 0,1M :

- Le poids moléculaire de CaCl_2 est de 111g, ce qui correspond au poids d'une mole.
 - Pour avoir 0,1M/L, il faut donc peser 11,1g de CaCl_2 pour 1L d'eau distillée.
 - Stériliser la solution à l'autoclave pendant 20 minutes à 121 °C.
 - Après stérilisation, sortir la solution et laisser refroidir.
- Mélanger lentement la solution de CaCl_2 contenant les graines pendant 10 minutes.
- Des billes d'alginate de sodium contenant les graines et spores devraient se former.
- Eliminer la solution de CaCl_2 en versant les billes sur un tamis stérile.

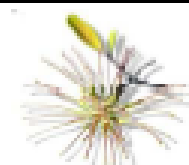
5. Le semis :

- Pour les billes de 20 g/L :
 - Placer 4*25 graines d'*Alphitonia neocaledonica* et 4*25 graines de *Costularia comosa* dans des boîtes de Pétri stériles à 25°C lumière.
 - Placer 4*25 graines d'*Alphitonia neocaledonica* et 4*25 graines de *Costularia comosa* dans des boîtes de Pétri stériles à 25°C obscurité.

Faire de même pour les billes de 10 g/L.

Matériel stérile nécessaire pour cette expérience :

- Des spores de mycorhizes de SFONL,
- Un lot de graines de *Costularia comosa* et *Alphitonia neocaledonica*,
- 32 boîtes de Pétri,
- Une pipette + des embouts de pipette ou seringue,
- Des béciers,
- Une baguette en verre,
- Un tamis désinfecté,
- De l'alginate de sodium,
- Du CaCl_2 ,
- De l'eau distillée,
- Une balance,
- Un agitateur,
- Un autoclave,
- Un micro-onde.



Annexe XX : Protocole de coloration des spores de l'enrobage du LIVE

Laboratoire
Insulaire
du **V**ivant
et de l'**E**nvironnement

Protocole LIVE
Physiologie végétale -Graines

Coloration des spores enrobées dans l'alginate de sodium

Matériel :

Pour la coloration de la bille : un scalpel, une pince, un verre de montre, du bleu Trypan, eau distillée et glycérol

Pour le montage de la lame : lame et lamelle, scalpel, glycérol.

Coloration de la bille :

Découper une portion de la bille d'alginate au scalpel (dans le cas d'un montage à la fin de l'expérience de germination, prélever la bille entière ne pose aucun problème au scalpel), et la placer dans le verre de montre. Verser deux à trois gouttes de bleu Trypan en fonction de la taille de l'échantillon prélevé. Attendre quelques minutes (5 à 10 minutes).

Montage de la lame :

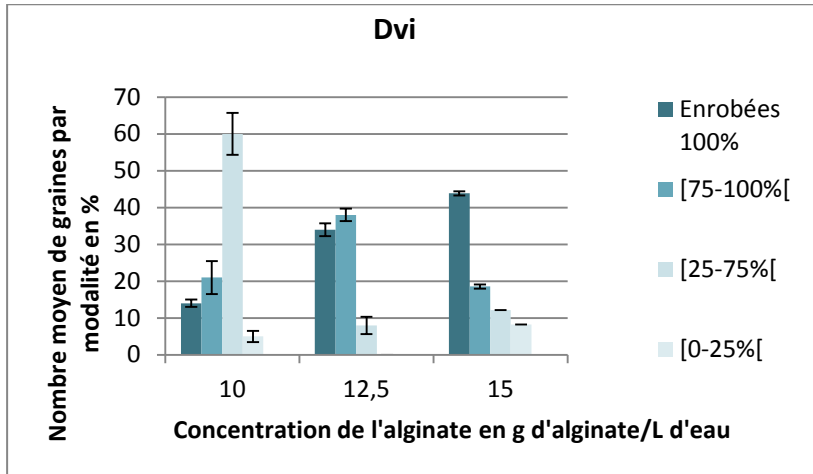
Prélever la bille colorée et la placer au centre de la lame. Avec le plat de la lame du scalpel, écraser la bille du mieux possible, l'émincer en quelque sorte. Une fois obtenus des débris homogènes d'aspect et de taille, rajouter un peu de glycérol pour la mise en place de la lamelle.

Observer directement permet de mieux voir l'alginate de sodium, mais il disparaît assez rapidement, laissant une lame claire et facilement lisible.

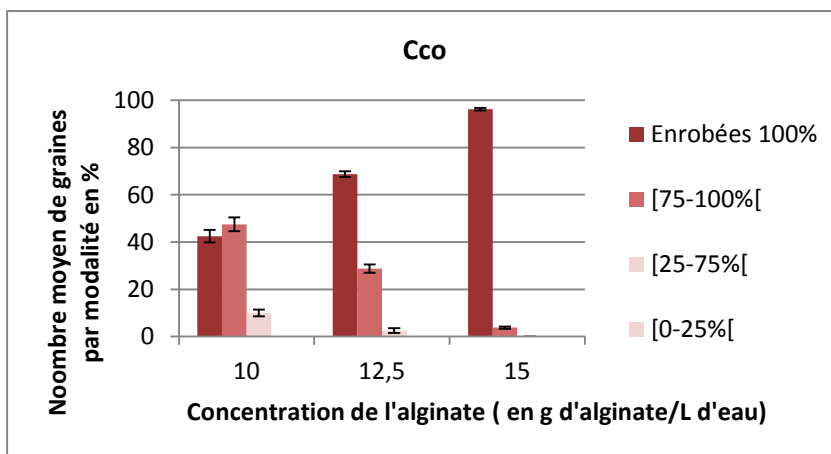
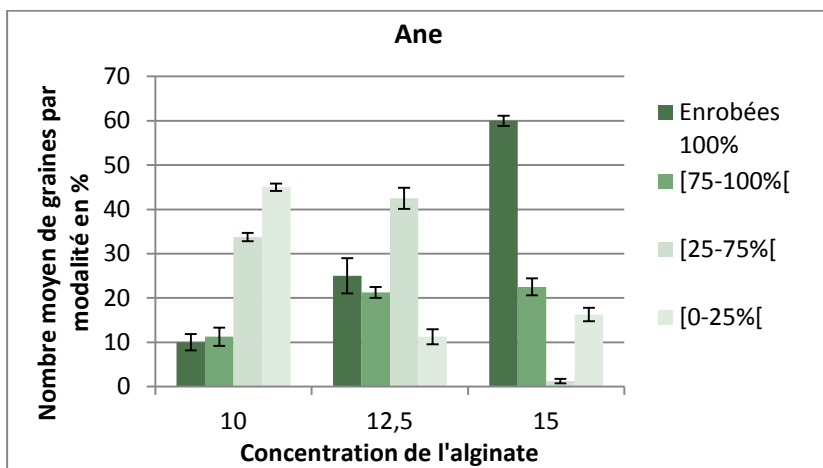
Publi de réf : -

Annexe XXI : Répartition moyenne des enrobages dans les catégories 1 à 4 réalisée pour le taux de recouvrement selon les différents traitements

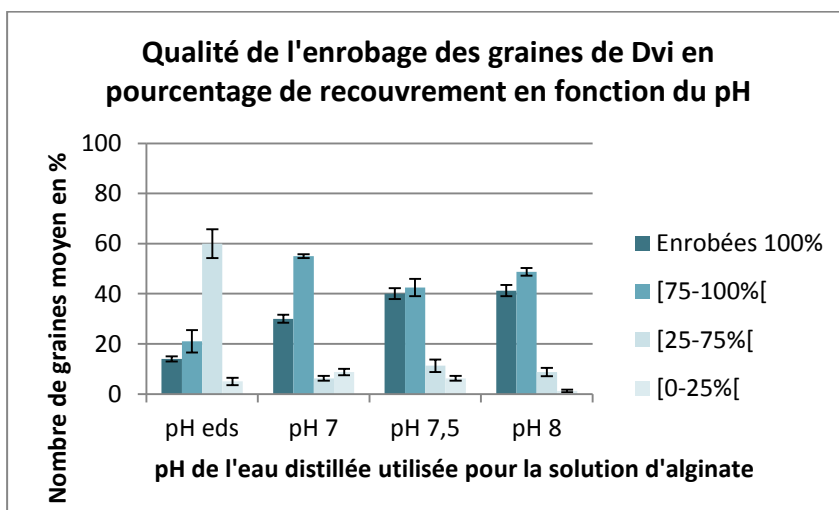
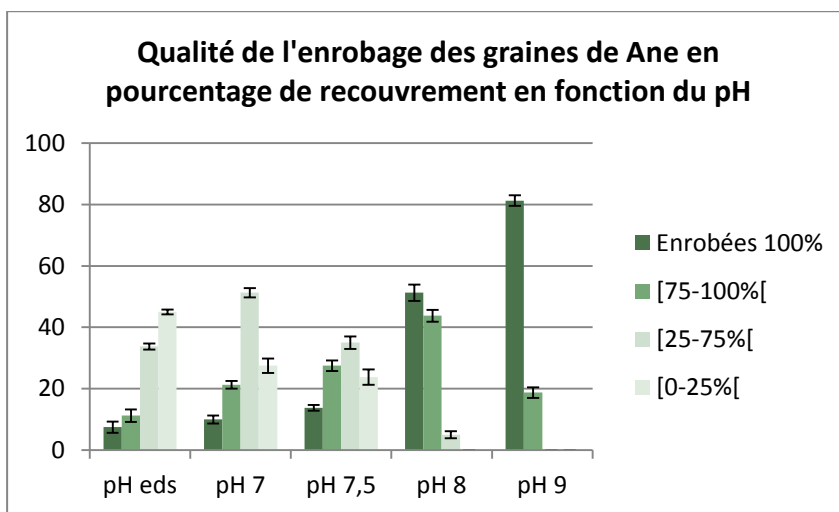
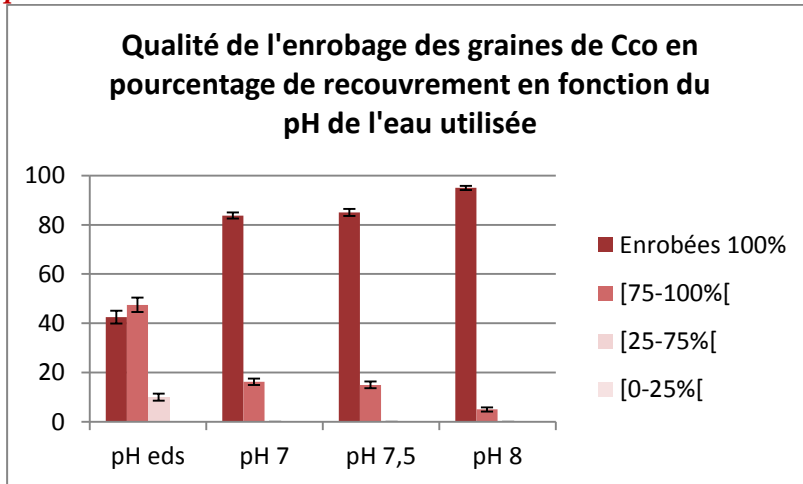
Influence de la concentration sur le pourcentage de recouvrement des graines



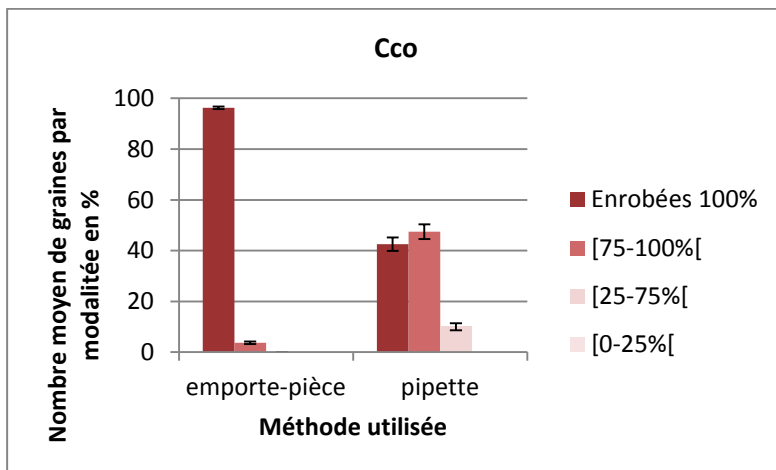
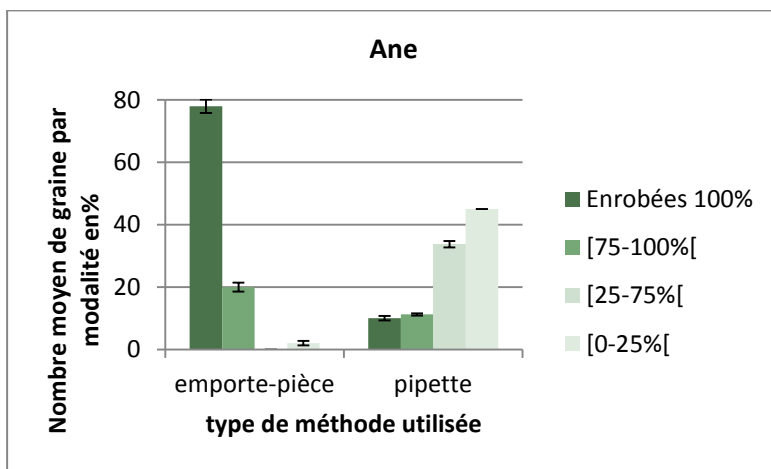
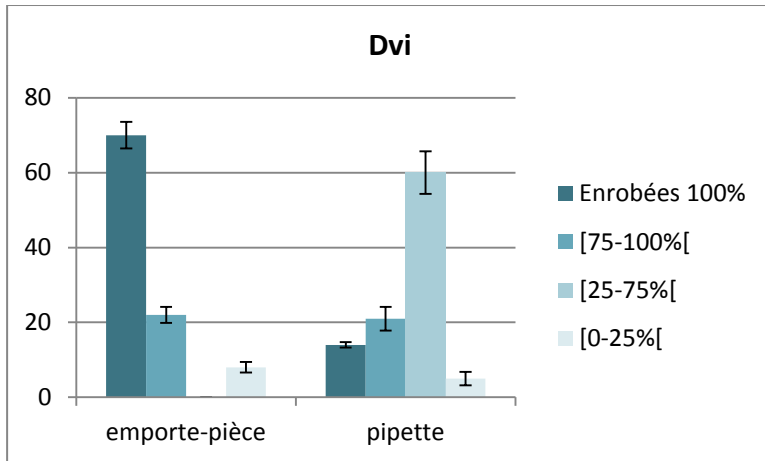
Il s'agit du nombre moyen (calculé sur 4 échantillons de 20 graines) de graines recouvertes de 0 à 25%, de 25 à 75%, de 75 à 100% exclus et à 100% pour chaque modalité.

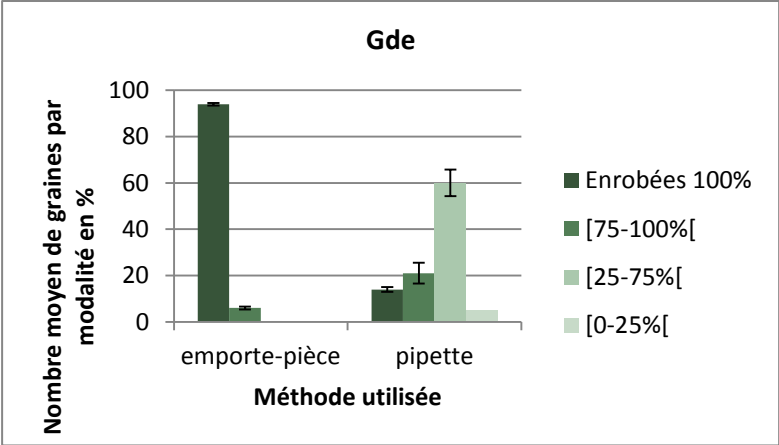


pH



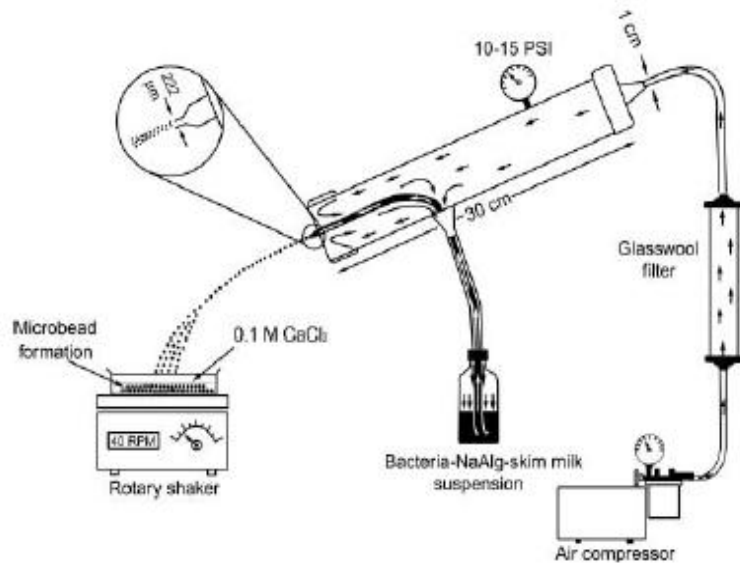
Influence de la méthode d'enrobage sur sa qualité






Annexe XXII : Technique d'inoculation à partir de poudre de microbilles d'alginate encapsulant un inoculum

Fig. 1 Equipment for the production of microbeads. The original drawing is reproduced from Carrillo and Bashan (1997), by permission of the publisher



La production de microbilles d'Alginat est réalisée par pulvérisation à basse pression d'une solution d'alginate mélangée avec une culture bactérienne liquide en suspension dans un milieu très riche dans du CaCl₂ avec une buse permettant d'obtenir un très petit diamètre de 100 à 200µm. Ces microbilles, une fois séchées par une procédure standard de lyophilisation, forment une poudre. Cette poudre est facilement fixée sur la surface sèche des semences par addition d'une solution d'alcool diluée à 1% avec de la lécithine ou du papier adhésif synthétique 0,5% de type Resistol (Bashan *et al*, 2002).

	Diplôme : Ingénieur AgrocampusOuest, Institut National d'Horticulture et du Paysage. Spécialité : Horticulture Spécialisation: Gestion Durable du végétal en Horticulture et aménagement paysager Enseignant référent : Armin Bischoff
Auteur : Nathanaëlle Leclerc Date de naissance : 27 Août 1987	Organisme d'accueil : LIVE Adresse : Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement
Nb pages : 85 Annexes : 22	Université de Nouvelle-Calédonie 145 Av. James Cook
Année de soutenance : 2012	98851 Nouméa CEDEX Maître de stage : Pr. Hamid Amir
Titre français : Amélioration de la technique d'enrobage de graines d'espèces endémiques avec des spores de champignons mycorhiziens pour la revégétalisation de site minier par hydroseeding Titre anglais : Coating seeds with spores of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) : improvement of the technic on endemic species seeds for mining land rehabilitation by hydroseeding.	
Résumé : Pour faciliter la réimplantation d'espèces végétales endémiques de la Nouvelle Calédonie sur des sols ayant été dégradés par l'exploitation minière lorsque la réutilisation de topsoils est impossible, l'utilisation de la symbiose mycorhizienne semble être une technique intéressante. En effet, ces micro-organismes confèrent aux plantes une capacité de résistivité aux stress hydrique et métallique. De manière à assurer la mycorhization des plants dès leurs germinations après hydroseeding, nous avons mis en place une technique d'enrobage des graines d'espèces endémiques à partir d'Alginate, concentré à 12,5g/L, dissout dans de l'eau distillée dont le pH a été ajusté à 7,5, contenant les spores de champignon mycorhizien. Si cette technique entraîne une diminution de moitié du taux de germination des spores pour un même temps de germination, elle permet tout de même un taux de mycorhization racinaire de 40% pour les plants dont les graines ont été enrobées par cette technique. Un taux à peine atteint par inoculation classique avec un inoculum deux fois plus riche en quantité. Cet enrobage peut par ailleurs être conservé une fois séché sans atténuer ces propriétés.	
Abstract : In order to make easier the reestablishment of New-Caledonia endemic species on degraded soils by Nickel mining exploitations when topsoil use is impossible, the use of mycorrhizal symbiosis seems to be a good opportunity. Indeed, those micro-organisms provide plants with the ability to resist to water and metallic stresses. To ensure plants mycorrhizis from their germination after hydroseeding, so for better performance in revegetation, we tested a mycorrhizal seed coating technic which appears to be the best with Alginate at 12,5g/L in distilled water which pH is taken to 7,5 containing mycorrhizal fungi spores. If this technic leads to the half the AMF spores germination, it permitted 40% of roots mycorhization, a rate barely reached by classic inoculation with double quantity of inoculant. By the way, this coating can also be stored once dry without mitigating these proprieties.	
Mots-clés : Enrobage, alginate, champignon mycorhizien à arbuscule (AMF), hydroseeding, revégétalisation de sites miniers Key Words: seed coating, alginate, AMF, hydroseeding, mine sites rehabilitation.	