CNRT "Nickel et son environnement"

Rapport scientifique

Edition 2015

ECOMINE BIOTOP

Tome Nickel et Environnement



Rapport Scientifique 2014

PROJET D'ETUDE

ECOMINE BIOTOP

RAPPORT FINAL



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

Décembre 2014

« Caractérisation et fonctionnement du système sol/ plante/ microorganismes dans les maquis miniers.

PERSPECTIVES D'APPLICATION À LA RESTAURATION ÉCOLOGIQUE »

Rapport Final

Décembre 2014

Auteurs

- Hamid Amir (responsable du projet) (UNC)
- Laurent L'Huillier (co-responsable du projet) (IAC),
- Bruno Fogliani (UNC/IAC),
- Yvon Cavaloc (UNC), Simon Gensous (UNC),
- Philippe Jourand (IRD, LSTM), Marc Ducousso (CIRAD, LSTM), Clarisse Majorel (IRD), Laure Hannibal (IRD, LSTM),
- Danielle Saintpierre (SIRAS Pacifique),
- Peggy Gunkel-Grillon (UNC), Pascal Pagand (UNC),
- Guillaume Echevarria (INRA/CNRS), Liane-Clarisse Mouchon (INRA/CNRS), Marie-Laure Bonis (INRA/CNRS), Emmanuelle Montarges-Pelletier (CNRS),
- Laurent Maggia (IAC-Cirad), Adrien Wulff (IAC/UNC)

Avec la contribution de :

- Audrey Laurent (UNC/IAC), Léa Hatteschweiler (UNC/IAC)
- Romain Matthieu, Casimir Véa (IAC), Géraldine Bidau (IAC), Marie-Laure Tiouchichine (IAC)
- Valérie Médevielle (UNC), Monika Lemestre (UNC), Sarah Gigante (UNC), Clément Pigot (UNC), Christophe Martins-Bernard (UNC), Antoine Deffay (UNC)
- Eliane Helly-Joly (SIRAS Pacifique)

RÉVISION DU DOCUMENT

Réf.	CSF…..			
Version	**Date**	**Rédacteur(s)**	**Qualité du rédacteur(s)**	**Révision pour CNRT**
Vx	xx/xx/xxxx	P. Nom P. Nom	Sigle	

CITATION DU DOCUMENT

Mots clés : Nouvelle-Calédonie; maquis miniers; topsoils; graines; mycorhizes; espèces végétales; métaux; matière organique; diversité génétique.

En bibliographie, ce rapport sera cité de la façon suivante :
Amir, H et al. (2014) – Caractérisation et fonctionnement du système sol/ plante/ microorganismes dans les maquis miniers. Perspectives d'application à la restauration écologique. Rapport Final – Projet ECOMINE BIOTOP - CNRT « Nickel & son environnement. 315 pages.

SOMMAIRE

1. Introduction générale 22

2. Matériels et méthodes généraux 24

2.1. Sites d'études et données météorologiques correspondantes 24

2.1.1. Site de Goro : 24
2.1.2. Site de Tontouta : 26

2.2. Caractérisation pédologique et floristique générale des deux sites d'étude principaux 27

2.2.1. Caractéristiques pédologiques : 27
2.2.2. Caractéristiques floristiques : 28

2.3. Etudes réalisées 29

2.3.1. Volet 1 : Caractérisation du topsoil et de son évolution pendant son stockage en mine. 30
2.3.2. Volet 2 : Connaissance et utilisation des champignons mycorhiziens. 31
2.3.3. Volet 3 : dynamique in situ des propriétés physico-chimiques des topsoils 31
2.3.4. Volet 4 : diversité génétique de quelques espèces de Tristaniopsis et Scaevola dans une perspective de conservation et de restauration des milieux 32

3. Volet 1 « Caractérisation du topsoil et de son évolution pendant son stockage en mine» 33

3.1. Objectifs, organisation et description des travaux 33

3.1.1. Objectifs et démarche générale 33
3.1.2. Mise en place des expérimentations sur terrains 33
3.1.3. Tâche 1 : Caractérisation de la banque de graine des topsoils, de leur potentiel séminal, de leur diversité et de leur évolution sur les parcelles expérimentales, en conditions naturelles comparées aux différentes conditions de stockage 37
3.1.4. Tâche 2 : Approche descriptive et fonctionnelle 40
3.1.5. Tâche 3 et 4 : Suivi du potentiel mycorhizogène et de l'activité microbienne des topsoils 42

3.2. Travaux réalisés et résultats obtenus 43

3.2.1. Tâche 1 : Caractérisation et conservation de la banque de graines des topsoils 43
3.2.2. Tâche 2 : Approche descriptive et fonctionnelle in et ex situ : suivi de topsoils en place sur différents sites 59
3.2.3. Tâche 3 et 4 : Suivi du potentiel mycorhizogène et de l'activité microbienne des topsoils 65

3.3. Références citées : 72

3.4. Publications, communications et mémoires liées au volet 1 : 73

3.4.1. Publications réalisées dans le cadre du projet ou directement liées au sujet abordé dans ce projet: 73
3.4.2. Communications dans la cadre du programme Ecomine BioTop ou relié au sujet abordé dans ce programme: 73
3.4.3. Mémoires, rapports : 74

4. Volet 2 « Connaissance et utilisation des champignons mycorhiziens » 75

4.1. Objectifs, organisation et description des travaux 75

4.1.1. Tâche 1 : Diversité des champignons mycorhiziens et adaptation au milieu ultramafique ... 76
4.1.2. Tâche 2 : Expériences de mycorhization en serre ... 78
4.1.3. Tâche 3 : Expérimentation sur le terrain : essai d'inoculation contrôlée de deux espèces végétales avec des champignons ectomycorhiziens et mycorhiziens à arbuscules, sur un topsoil replacé après exploitation minière et amendé ou non en boue de station d'épuration ... 80
4.2. Travaux réalisés et résultats obtenus ... 85
4.2.1. Tâche 1 : Diversité des champignons mycorhiziens et adaptation au milieu ultramafique ... 85
4.2.2. Tâche 2 : Expériences de mycorhization en serre ... 97
4.2.3. Tâche 3 : Expérimentation sur le terrain : essai d'inoculation contrôlée de deux espèces végétales avec des champignons ectomycorhiziens et mycorhiziens à arbuscules, sur un topsoil replacé après exploitation minière et amendé ou non en boue de station d'épuration ... 105
4.3. Conclusion pour le volet 2 ... 128
4.4. Références citées ... 130
4.5. Publications, communications et mémoires de l'équipe, liées au volet 2 : ... 132
4.5.1. Publications réalisées dans le cadre du projet ou directement liées au sujet abordé dans ce projet: ... 132
4.5.2. Communications ... 133
4.5.3. Thèse de doctorat (partie): ... 135
4.5.4. Mémoires de Master 1 et 2 dans le cadre du projet: ... 135
5. Volet 3 « Dynamique des métaux et de la matière organique in situ» ... 136
5.1. Objectifs, organisation et description des travaux ... 136
5.1.1. Tâche 2-1 : Distribution des éléments métalliques ; variation du potentiel redox, du pH et de la conductivité électrique au cours du stockage du topsoil. ... 136
5.1.2. Tâche 2-2 : Fonctionnement géochimique des topsoils ... 138
5.2. Travaux réalisés et résultats obtenus ... 144
5.2.1. Tâche 2-1 : Dynamique des éléments métalliques au cours du stockage du topsoil ... 144
5.2.2. Tâche 2-2 : Fonctionnement géochimique des topsoils ... 153
5.3. Références du volet 3 ... 172
5.4. Bilan quantitatif (publications, communications, formation) ... 173
5.4.1. Mémoires, thèse ... 173
6. Volet 4 « Etude de la diversité génétique de quelques espèces de *Tristaniopsis* et *Scaevola* dans une perspective de conservation et de restauration des milieux » ... 175
6.1. Objectifs, organisation, et description des travaux ... 175
6.2. Travaux réalisés et résultats obtenus ... 177
6.2.1. Tâche 1 : Etude de la diversité génétique des populations de Tristaniopsis et de Scaevola ... 177
6.2.2. Tâche 2 et 3 : Identification des distances de pollinisation et de dissémination des graines ... 186
6.2.3. Tâche 4 : Outil moléculaire d'identification des différentes espèces de Tristaniopsis néo-calédoniennes ... 202
6.2.4. Conclusions et recommandations pour le volet 4 ... 207
6.3. - Références bibliographiques citées ... 208
6.4. Bilan quantitatif (publications, communications, formation, etc.) ... 210

7. Conclusions générales et recommandations 211

7.1. Volet 1 : Caractérisation du topsoil et de son évolution pendant son stockage en mine 211

7.2. Volet 2 : Connaissance et utilisation des champignons mycorhiziens 213

7.3. Volet 3 : Dynamique des métaux et de la matière organique *in situ* 214

7.4. Volet 4 : Etude de la diversité génétique de quelques espèces de *Tristaniopsis* et *Scaevola* dans une perspective de conservation et de restauration des milieux 215

8. Annexes 221

8.1. pour la partie « matériels et méthodes généraux 221

8.2. volet 2 : articles scientifiques publiés correspondants à des parties traitées dans ce volet. 222

8.3. Volet 3 : Distribution des éléments métalliques ; variation du potentiel redox du pH et de la conductivité électrique au cours du stockage du topsoil. 304

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Vue aérienne situant le site d'expérimentation à Goro (site de VALE.NC) 24

Figure 2 : Précipitations moyennes à Goro (site de VALE.NC) sur les 4 années de l'étude 25

Figure 3 : Températures mensuelles moyennes à Goro (site de VALE.NC) sur les 4 années de l'étude 25

Figure 4 : Humidités relatives moyennes à Goro (site de VALE.NC) sur 2 ans (les années 2013 et 2014 montrent des valeurs similaires). 26

Figure 5 : Vue aérienne montrant le site d'expérimentation à Tontouta (Mine Vulcain). 26

Figure 6 : Pluviométrie et températures moyennes mensuelles sur le massif de Tontouta. 27

Figure 7 : Vues des maquis paraforestier de Goro (A) et ligno-herbacé de Tontouta (B). 29

Figure 8 : Schéma des expérimentations sur terrain mise en place à Goro (site VALE.NC). 29

Figure 9 : Maquis paraforestier de Goro 34

Figure 10 : Récupération du topsoil après décapage 34

Figure 11 : Chargement dans le camion 34

Figure 12 : Déchargement du camion 35

Figure 13 : Topsoil en andain de 2 m 35

Figure 14 : Topsoil étalé (50 cm d'épaisseur environ) 36

Figure 15 : Mise en place du topsoil stocké en andain sur la mine de vulcain à Tontouta (août 2011) 36

Figure 16 : Andain de topsoil (2 m de haut environ) stocké sur la mine de vulcain à Tontouta (mise en place août 2011). 36

Figure 17 : Topsoil stocké étalé (environ 50 cm de haut) sur la mine de vulcain à Tontouta (mise en place août 2011) 37

Figure 18 : Topsoils mis en terrine sous serre de l'IAC avec arrosage automatique. 38

Figure 19 : Photos illustrant la mise en place de l'essai d'enfouissement d'*A. neocaledonica* et *G. deplancheanum* sur la zone de Goro. 40

Figure 20 : Vues (dans l'ordre de haut en bas) des maquis paraforestier, arbustif et ligno-herbacé de Goro. A droite, vues des litières associées. 41

Figure 21 : Vues (dans l'ordre de haut en bas) des maquis paraforestier, arbustif et ligno-herbacé de Tontouta. A droite, vues des litières associées. 41

Figure 22 :Nombre d'espèces identifiées à partir des germinations (émergences) obtenues à partir des topsoils, après 36 mois d'observations (site de Goro). 43

Figure 23 : Densité de germination (émergences) en fonction de la durée de stockage du topsoil, après 12 mois de suivi en serre (moyenne de 20 terrines par date, toute épaisseur confondue) (site de Goro). 45

Figure 24 : Densité de germination en fonction du temps de stockage du topsoil, et selon le type de semences (non dormantes / dormantes) (site de Goro) (nombre d'émergences après 12 mois de suivi en serre, moyenne de 20 terrines par date, toute épaisseur confondue). 46

Figure 25 : Germinations (émergences) des différentes espèces (celles identifiées) en fonction de la durée de stockage du topsoil (en mois). Résultats après 12 mois de suivi en serre, toute épaisseur confondue (site de Goro). 47

Figure 26 : Nombre cumulé d'émergences en fonction de la profondeur de prélèvement (épaisseur) du topsoil stocké, et en fonction de la durée de stockage. Résultats de 12 mois de suivi en serre (moyenne de 5 terrines par date et pour chaque épaisseur). 48

Figure 27 : Photos des graines/semences entières retenues pour cette étude 49

Figure 28 : Pourcentages maximums de germination obtenus au cours du temps après 30 mois de suivi pour des graines d'*A. neocaledonica* (bleu) et *G. deplancheanum* (vert) et après 18 mois de suivi pour des graines de *M. deplanchei* (rouge) après conservation dans des conditions de température et d'humidité relative différentes. Dans le titre des graphiques : T°= Température de conservation, RH : Humidité relative de conservation. 51

Figure 29 : Taux de viabilité des graines de M. deplanchei obtenus au cours du temps après conservation dans des conditions de température et d'humidité relative différentes. Dans le titre des graphiques : RH : Humidité relative de conservation. 52

Figure 30 : Taux de viabilité des graines de *S. cylindrica* obtenus au cours du temps après conservation dans des conditions de température et d'humidité relative différentes. Dans le titre des graphiques : RH : Humidité relative de conservation. 52

Figure 31 : Pourcentages de germination maximums obtenus pour les graines de *G. deplancheanum*, d'*A. neocaledonica* et de *M. deplanchei* exposées pendant un temps plus ou moins long à un vieillissement accéléré (45°C, 100HR). 53

Figure 32 : Pourcentages de germination maximums (pour 100 fruits) et taux moyen de viabilité obtenus pour les graines de *S. cylindrica* exposées pendant un temps plus ou moins long à un vieillissement accéléré (45°C, 100HR). 54

Figure 33 : Germination cumulée à 25°C sous lumière continue et coupe longitudinale de graines de *G. deplancheanum* (Teg : Tégument ; Emb : Embryon). 54

Figure 34 : Germination cumulée à 25°C sous lumière continue de graines scarifiées (■) ou non (♦) et coupe longitudinale de graines d'*A. neocaledonica* (Teg : Tégument ; Emb : Embryon ; End : Albumen). 55

Figure 35 : Pourcentages de germination maximums (en haut) et de levées (en bas) obtenus pour les graines d'*A. neocaledonica* enfouies en fonction du temps à différentes profondeurs. Représentation de la température minimale et maximale entre août 2011 et mai 2013 (données VALENC). 56

Figure 36 : Pourcentages de germination maximums obtenus pour les graines de *M. deplanchei* enfouies en fonction du temps à différentes profondeurs dans un topsoil. 57

Figure 37 : Taux de viabilité des graines de *S. cylindrica* enfouies en fonction du temps à différentes profondeurs dans un topsoil. (T0 +21 mois : viabilité du lot de graines placées en germination à T0 et évalué après 21 mois en culture) 57

Figure 38 : Pourcentage de graines germées de *S. cylindrica* dans les sachets récupérés enfouies après un certain temps à différentes profondeurs dans un topsoil. 58

Figure 39 : Densités de germinations issues des différents topsoils. Suivi réalisé sur 20 mois, sur 10 échantillons de topsoils placés en serre pour chaque formation végétale des deux sites d'étude (prélevés sur des parcelles de 100 m^2). Des lettrines différentes indiquent une différence significative entre les formations végétales. 60

Figure 40 : Densités de germinations des espèces de Cypéracées identifiées à partir des différents topsoils. Suivi réalisé sur 20 mois, sur 10 échantillons de topsoils placés en serre pour chaque formation végétale des deux sites d'étude (prélevés sur des parcelles de 100 m^2). 61

Figure 41 : Densités de germinations des espèces de Dicotylédones identifiées à partir des différents topsoils. Suivi réalisé sur 20 mois, sur 10 échantillons de topsoils placés en serre pour chaque formation végétale des deux sites d'étude (prélevés sur des parcelles de 100 m^2). 61

Figure 42 : Densités de germinations des banques de graines des topsoils prélevés sur plusieurs épaisseurs. Prélèvements réalisés sur maquis arbustifs de Goro, sur 5 parcelles (5 échantillons par épaisseur), prélevés soigneusement à l'aide d'une plaque métallique pour empêcher tout mélange entre couche. Suivi sur 20 mois en serre. 62

Figure 43 : ACP intégrant le nombre de germinations, la richesse spécifique des formations végétales et la richesse spécifique en Cyperaceae des formations végétales en place. 77,58 % de la variabilité est représentée sur les axes F1 et F2. 63

Figure 44 : Densité de germinations (émergences) sur les topsoils des deux formations étudiées, en fonction de la date de prélèvement des topsoils. Prélèvements réalisés sur maquis paraforestier (MPF) et maquis ligno-herbacés (MLH) de Tontouta, sur 5 parcelles (5 répétitions) par maquis, suivis sur 9 mois en serre. 63

Figure 45 : Diversité spécifique observée à partir des germinations (émergences) sur les topsoils des deux formations étudiées, en fonction de la date de prélèvement des topsoils. Prélèvements réalisés sur maquis paraforestier (MPF) et maquis ligno-herbacés (MLH) de Tontouta, sur 5 parcelles (5 répétitions) par maquis, suivis sur 9 mois en serre. 64

Figure 46 : Evolution du nombre de spores AMF viables dans les topsoils stockés 0 à 36 mois à Goro, en andain, à différentes profondeurs 65

Figure 47 : Evolution du nombre de spores AMF viables dans les topsoils stockés 0 à 36 mois à Goro, étalés (50cm). **66**

Figure 48 : Evolution du potentiel mycorhizogène du topsoil stocké en andain (TSA) ou étal (TSE) à Goro, en fonction du temps à différentes profondeurs. Détail des intensités de mycorhization (M en %), avec leurs écarts-types. **67**

Figure 49 : Intensité (M %) et fréquence (F %) de mycorhization des plants de sorgho développés sur le topsoil de Goro à l'état naturel (Goro paraforestier), ou stocké 24 mois. L'intensité traduit la surface racinaire colonisée par les AMF, tandis que la fréquence traduit le nombre de racines plus ou moins colonisées par les AMF. **68**

Figure 50 : Evolution sur 36 mois de la densité de la microflore bactérienne hétérotrophe aérobie (utilisée comme indicateur) dans les topsoils stockés en andain (TSA) ou étalé (TSE), à différentes profondeurs, à Goro. T0 = topsoil en début de stockage. **69**

Figure 51 : Evolution du nombre de spores AMF viables dans les topsoils stockés en andain (TSA) ou étalé (TSE) de 0 à 24 mois à Tontouta, à différentes profondeurs. Au temps zéro, la valeur unique donnée ici représente une moyenne puisqu'au départ, il n'y a pas de différence entre les différents niveaux de profondeurs. **70**

Figure 52 : Intensité (M %) et fréquence (F %) de mycorhization des plants de sorgho développés sur le topsoil de Tontouta non stocké, ou stocké 18 mois. L'intensité traduit la surface racinaire colonisée par les AMF, tandis que la fréquence traduit le nombre de racines plus ou moins colonisés par les AMF. **70**

Figure 53 : Evolution de la densité de la microflore bactérienne hétérotrophe aérobie dans le topsoil de Tontouta stockés en andain (TSA) ou étalé (TSE) en fonction du temps et de la profondeur. La valeur notée « maquis ligno-herbacé » représente la densité bactérienne dans le sol correspondant au milieu naturel, **71**

Figure 54 : Localisation des amorces utilisées pour l'amplification de l'ADNr 18S Le gène de l'ADNr (18S – ITS1 – 5,8S – ITS2 -28S) est représenté ici. Les amorces AML1/AML2 utilisées pour la première amplification et les amorces AM1/NS31 utilisées pour la seconde PCR sont indiquées. Le produit final contient 550 pb. **76**

Figure 55 : Aspects des graines des 4 espèces végétales testées pour l'enrobage des graines avec des AMF. **79**

Figure 56 : Graines d'*A. neocaledonica* enrobées avec des spores inclues dans de l'alginate. **80**

Figure 57 : Dispositif de l'expérimentation au champ sur l'influence de la mycorhization et des boues de station d'épuration (combinées ou non) sur la croissance des plants de *Carpolepis laurifolia* et *Tristaniopsis glauca*. **82**

Figure 58 : Détail d'une parcelle (25 plants) du dispositif expérimental précédent. **82**

Figure 59 : Vue du terrain et des parcelles (délimitées avec des cordons) au moment de la mise en place de l'expérimentation. **83**

Figure 60 : Plants sacrifiés le 10 octobre 2013. Exemples de *Tristaniopsis glauca* (à gauche) et de *Carpolepis laurifolia* (à droite) issus de parcelle témoin (sans boue et sans mycorhization). 84

Figure 61 : Méthode pour l'estimation de la surface foliaire. A : feuille étalées sur feuille A4 ; B : transformation en image bicolore par ImageJ ; calcul du nombre de pixels de chaque couleur par ImageJ. 85

Figure 62 : Mycorhization des plants étudiés sur topsoil étalé en andain et dans la parcelle témoin. Pour chaque espèce analysée la fréquence (F%) et l'intensité globale (M%) de mycorhization sont indiquées par des barres jointes. La première représente la fréquence et la seconde (en plus clair) indique l'intensité. PB= terrain contenant le topsoil étalé (dite parcelle B) à en andain, BS6= parcelle BS6 témoin. 86

Figure 63 : Arbre phylogénétique des séquences d'AMF observées sur les 2 parcelles d'étude 88

Figure 64 : Nouvelles espèces de champignons décrites (A) *Podoserpula miranda* and (B) *Cantharellus garnier*i. 91

Figure 65 : Illustration du champignon *Pisolithus albus* isolé en Nouvelle-Calédonie sur sol ultramafique (A) ou volcano-sédimentaire (B), avec une coupe transversale du carpophore (C) et une image illustrant les spores de ce champignon (D). 92

Figure 66 : Phylogénie moléculaire basée sur le séquençage de l'ADN ITS des isolats de *Pisolithus albus* provenant de Nouvelle-Calédonie en comparaison à ceux des autres continents. 93

Figure 67 : analyse AFLP (A) et analyse statistique de cette AFLP en composante principale (B). 94

Figure 68 : Analyse du transcriptome de *Pisolithus albus* en présence du nickel. 95

Figure 69 : Expression de gènes marqueurs de la tolérance au nickel. Les graphes représentant l'expression comparée entre isolats tolérants ou sensibles au nickel. Les taux d'induction des gènes par le nickel sont indiqués au dessus des barres. 96

Figure 70 : Taux de mycorhization moyen des plants d'*Acacia* et d'*Eucalyptus* inoculés par des souches de *Pisolithus albus* provenant de sols ultramafiques. Les contrôles (control) sont des plants témoins non inoculés. Les barres représentent des moyennes et les barres d'erreur représentent les déviations standard des moyennes (n = 15) de 3 répétitions indépendantes. Les lettres différentes au dessus des barres indiquent les différences significatives selon le test de Tukey (P < 0.05). 97

Figure 71 : Plants *Acacia spirorbis* and *Eucalyptus globulus* après 12 mois de croissance sur substrat ultramfique. Les biomasses respectivse de leurs parties aériennes (shoot) et racinaires (root) a été mesurée par mesures des poids secs des tissus exprimés en mg. Les contrôles (control) sont des plants témoins non inoculés. Les barres représentent des moyennes et les barres d'erreur représentent les déviations standard des moyennes (n = 15) de 3 répétitions indépendantes. Les lettres différentes au dessus des barres indiquent les différences significatives selon le test de Tukey (P < 0.05). 98

Figure 72 : analyses minérales des tissus des parties aériennes des plants d'*Acacia* et d'*Eucalyptus* cultivés sur substrats ultramafique et inoculés avec des

isolats de champignons *Pisolithus albus* exceptés pour le contrôle. Abréviations : N : azote ; P : phosphore ; K : potassium ; Ca : calcium ; Mg : magnésium). Les contrôles (control) sont des plants témoins non inoculés. Les barres représentent des moyennes et les barres d'erreur représentent les déviations standard des moyennes (n = 15) de 3 répétitions indépendantes. Les lettres différentes au dessus des barres indiquent les différences significatives selon le test de Tukey (P < 0.05). 99

Figure 73 : Analyses minérales métalliques des tissus des parties aériennes des plants d'*Acacia* et d'*Eucalyptus* cultivés sur substrats ultramafique et inoculés avec des isolats de champignons *Pisolithus albus* exceptés pour le contrôle. Les contrôles (control) sont des plants témoins non inoculés. Les barres représentent des moyennes et les barres d'erreur représentent les déviations standard des moyennes (n = 15) de 3 répétitions indépendantes. Les lettres différentes au dessus des barres indiquent les différences significatives selon le test de Tukey (P < 0.05). Abréviations : Fe : fer ; Cr : chrome ; Co : cobalt ; Mn : manganèse ; Ni : nickel. 100

Figure 74 : Intensité de mycorhization (M en %) des 3 espèces testées, après 1 an de culture en pot, dans un sol ultramafique fertilisé avec des doses croissantes de P. 101

Figure 75 : Influence de la mycorhization sur la biomasse sèche (g) des plants des 3 espèces testées, après 1 an de culture en pot, sur sol fertilisé avec des doses croissantes de P. 102

Figure 76 : Influence de la mycorhization sur les ratios Ca/Mg des parties aériennes des plants des 3 espèces testées, après 1 an de culture en pot, sur sol fertilisé avec des doses croissantes de P. 102

Figure 77 : Influence de la concentration de l'alginate sur le taux de germination des spores AMF enrobage des graines ou par dépôt de spores sur racines (C10 = 10g/L d'alginate ; C15 = 15g/L d'alginate ; témoin : 0g/L d'alginate). 103

Figure 78 : Intensité de mycorhization (M %) de plants de sorgho inoculés par enrobage des graines avec des spores AMF ou par dépôt de spores sur racines. 104

Figure 79 : Taux de germination des graines de *C. comosa* selon leurs traitements en fonction du nombre de jours. La courbe Cco correspond au test de germination effectué à la réception des graines. 104

Figure 80 : Plan des parcelles d'expérimentation montrant les zones qui ont été inondées de temps en temps (voir plan complet initial au parag. 2-a, tâche 3). 105

Figure 81 : Influence de l'inoculation en AMF (endo) et des boues de station d'épuration (boues), et leur combinaison, sur l'évolution de la croissance en hauteur de *C. laurofolia*. 106

Figure 82 : Influence de l'inoculation en ECM (ecto) ou en AMF (endo) et des boues de station d'épuration (boues), et leurs combinaisons, sur l'évolution de la croissance en hauteur de *Tristaniopsis glauca*. 107

Figure 83 : Influence de l'inoculation en AMF et des boues de station d'épuration (Boue) sur la croissance (poids de la partie aérienne et gain en hauteur des plants depuis la plantation) et la mycorhization (M) de *Carpolepis laurofolia* sur le topsoil dégradé (valeurs mesurées 18 mois après plantation) 107

Figure 84 : Racine de *Carpolepis laurifolia* fortement colonisée par les AMF dans une parcelle dont les plants ont été inoculés en AMF à Goro. 108

Figure 85 : Aspects comparés des plants de *Carpolepis laurofolia* correspondants aux 4 traitements différents : témoins non inoculé (Témoin) , inoculation en AMF (AMF), boues de STEP (Boues) et inoculation en AMF combinée à l'apport de boues de STEP (Boues + AMF). 109

Figure 86 : Variation des teneurs en eau des plants de *Carpolepis laurifolia* en fonction des traitements testés. 109

Figure 87 : Teneurs en phosphore des feuilles et tiges de *Carpolepis laurifolia* soumis à un amendement en boue de STEP (boue), inoculée en AMF (endo) ou à la combinaison des deux traitements. 110

Figure 88 : Influence des boues de STEP (témoin+boues) ; des AMF (endo) et de leur combinaison (Endo+boues) sur le ratio Ca/Mg dans les différents organes de *Carpolepis laurifolia*, en fin d'expérience. 111

Figure 89 : Influence de l'inoculation en AMF (endomycorhizés) et des boues de station d'épuration (Boues) sur la croissance (poids de la partie aérienne et gain en hauteur des plants depuis la plantation) et la mycorhization par les AMF (M %) de *Tristaniopsis glauca* sur le topsoil dégradé. 114

Figure 90 : Pourcentage de mycorhization des plants de *Tristaniopsis glauca* inoculé avec la souche 336 de *Pisolithus Albus*. Ici seuls les plants inoculés en ECM ont été mesurés : ECM 1 à 4 = plants inoculés des 4 parcelles MNOP ; ECM+ boue = plants des 2 parcelles inoculées et amendées en boue de STEP. 115

Figure 91 : Teneurs en phosphore des feuilles et tiges de *Tristaniopsis glauca* soumis à un amendement en boue de STEP (boue), inoculée en AMF (endo), ou en ECM (ecto) ou à la combinaison de 2 traitements (endo + boues ou ecto+ boues). 116

Figure 92 : représentation linéaire de la croissance de *Carpolepis laurifolia* dans les différents traitements 119

Figure 93 : évolution des croissances moyennes de *Tristaniopsis glauca* et leur représentation selon un modèle de croissance Chapman-Richard 120

Figure 94 : courbe d'estimation de la biomasse d'un individu *C. laurifolia* en fonction de sa hauteur 121

Figure 95 : surface foliaire moyenne par plants de *Carpolepis laurifolia* 122

Figure 96 : surface foliaire moyenne par plants de *Tristaniopsis glauca* 122

Figure 97 : quantité d'azote et de phosphore moyen dans les plants de *C. laurifolia* et *T. glauca* 123

Figure 98 : rapport N/P dans les différentes parties des plants de *C. laurifolia* et *T. glauca* 124

Figure 99 (sur deux pages) : Arbre phylogénétique des séquences d'AMF observées dans les racines de *Carpolepis laurifolia* 125

Figure 100 : Présentation des sols étudiés dans la tâche 2. 139

Figure 101 : Pose des bougies poreuses sur la pile expérimentale de TOPSOIL le 10 août 2011 **140**

Figure 102 : valeurs du pH et du potentiel d'oxydoréduction E exprimé en mV mesurés pour les topsoils stockés de Goro (t=0 à t=36 mois, n=42) et de Tontouta (t=0 à t= 24 mois, n=32), toutes valeurs confondues quelques soit le mode de stockage. **144**

Figure 103 : valeurs du pH et de conductivité électrique, CE (en µS/cm) mesurés pour les topsoils stockés de Goro (t=0 à t=36 mois, n=42) et de Tontouta (t=0 à t= 24 mois, n=32), toutes valeurs confondues quelques soit le mode de stockage.* indique que le sol est stocké étalé. **145**

Figure 104 : Distribution des éléments métalliques dans les fractions du topsoil de Goro stocké en Andain et stocké étalé (d=-50°). Le protocole BCR isole 4 fractions les métaux : étape 1= métaux localisés dans l'eau du sol, liés aux carbonates et échangeables ; étape 2= liés aux oxydes-hydroxydes de manganèse et de fer ; étape 3=liés à la matière organique et étape 4= résiduels. **148**

Figure 105 : Distribution des éléments métalliques dans les fractions du topsoil de Tontouta stocké en Andain et stocké étalé (d=-50°). Le protocole BCR isole4 fractions : étape 1=métaux, localisés dans l'eau du sol, liés aux carbonates et échangeables ; étape 2= liés aux oxydes-hydroxydes de manganèse et de fer ; étape 3= liés à la matière organique et étape 4= résiduels. **149**

Figure 106 : valeurs du pH et de concentration en nickel extrait à l'eau exprimée ng/g pour les topsoils stockés de Goro (t=0 à t=36 mois, n=42) et de Tontouta (t=0 à t= 24 mois, n=32), toutes valeurs confondues quelques soit le mode de stockage.* indique que le sol est stocké étalé. **150**

Figure 107 : valeurs du pH et de concentration en cobalt extrait à l'eau exprimée ng/g pour les topsoils stockés de Goro (t=0 à t=36 mois, n=42) et de Tontouta (t=0 à t= 24 mois, n=32), toutes valeurs confondues quelques soit le mode de stockage.* indique que le sol est stocké étalé. **151**

Figure 108 : concentration en chrome hexavalent extrait à l'eau dans le topsoil stocké de Goro. * indique le sol stocké étalé. **152**

Figure 109 : valeurs du pH et de concentration en chrome hexavalent extrait à l'eau exprimée ng/g pour les topsoils stockés de Goro (t=0 à t=36 mois, n=42) et de Tontouta (t=0 à t= 24 mois, n=32), toutes valeurs confondues quelques soit le mode de stockage.* indique que le sol est stocké étalé. **152**

Figure 110 : Evolution de la CEC avec la profondeur dans la pile de Topsoil de Goro après 24 mois **158**

Figure 111 : Spectres DRX de l'horizon B du Ferralsol colluvial (120 cm) et du topsoil TOP **159**

Figure 112 : Identification des minéraux par microscopie électronique à transmission et détermination de la composition des particules par sonde EDX : Particules d'hématite et de chromite dans l'horizon TOP A. **161**

Figure 113 : Pourcentage de carbone organique et rapport C/N dans les différents échantillons de terre **163**

Figure 114 : Séparation de phases solides distinctes après centrifugation lors de la séparation de la fraction F2 **164**

Figure 115 : Pourcentages de C organique et rapports C/N de la fraction totale (bulk) et des différentes fractions densimétriques des deux horizons du Leptosol d'origine (à gauche l'horizon A_1, à droite, l'horizon A_1/C) 165

Figure 116 : Pourcentages de C organique et rapports C/N de la fraction totale (bulk) et des différentes fractions densimétriques du Topsoil après décapage (TOP T0). 165

Figure 117 : Spectres Infra-Rouge à transformée de Fourrier effectués sur les différents échantillons de topsoil depuis le Leptosol en place jusqu'au topsoil stocké 24 mois. 166

Figure 118 : Représentation des individus et vecteurs propres des paramètres (pH, éléments, TOC, TIC) dans le plan composé des axes F1 et F2 pour l'extraction à $NaNO_3$ (0,01 M). Les individus sont numérotés de I1 à I18. De I1 à I9, le pH a été ajusté à 4 en début d'incubation, de I10 à I18, il a été ajusté à 6. Les échantillons sont toujours dans le même ordre : TOP A, TOP B, TOP T0, TOP T+12 0cm, TOP T+24 de 0 à 150 cm, SFFC 2 (de 1 à 9 et de 10 à 18). 168

Figure 119 : Représentation des individus et vecteurs propres des paramètres (pH, éléments, TOC, TIC) dans le plan composé des axes F1 et F2 pour l'extraction au Citrate (0,01 M). Les individus sont numérotés de I1 à I18. De I1 à I9, le pH a été ajusté à 4 en début d'incubation, de I10 à I18, il a été ajusté à 6. Les échantillons sont toujours dans le même ordre : TOP A, TOP B, TOP T0, TOP T+12 0cm, TOP T+24 de 0 à 150 cm, SFFC 2 (de 1 à 9 et de 10 à 18). 170

Figure 120 : Représentation des individus et vecteurs propres des paramètres (pH, éléments, TOC, TIC) dans le plan composé des axes F1 et F2 pour l'extraction à l'EDTA (0,01 M). Les individus sont numérotés de I1 à I18. De I1 à I9, le pH a été ajusté à 4 en début d'incubation, de I10 à I18, il a été ajusté à 6. Les échantillons sont toujours dans le même ordre : TOP A, TOP B, TOP T0, TOP T+12 0cm, TOP T+24 de 0 à 150 cm, SFFC 2 (de 1 à 9 et de 10 à 18). 171

Figure 121 : structuration des populations de *S. montana* 180

Figure 122 : Carte des récoltes de *Tristaniopsis calobuxus* pour l'étude de diversité génétique 182

Figure 123 : Richesse allélique par locus 183

Figure 124 : Richesse allélique pondérée par populations 183

Figure 125 : Représentation de l'appartenance de chaque population aux groupes génétiques proposés par la démarche bayésienne 184

Figure 126 : Visiteur des fleurs de *S. montana*, *Apis mellifera* (Apidae) 187

Figure 127 : Fruits et endocarpes de *Scaevola montana* 188

Figure 128 Récoltes des individus (pieds-mère, adultes et juvéniles) de la parcelle du Col de Mouirange 189

Figure 129 : Répartition des potentiels reproducteurs intégrés à l'étude 190

Figure 130 : Les fréquences alléliques par locus de tous les individus 192

Figure 131 : étude de structuration de la population de *T.calobuxus* de la parcelle du col de Mouirange **193**

Figure 132 : Répartition des pères potentiels présents hors de la parcelle d'étude **194**

Figure 133 : Exemple de distances géographiques de pollinisation par pieds-mère **195**

Figure 134 : Pourcentage par pieds-mères des descendants assignés à des pères potentiels hors ou dans la parcelle. **196**

Figure 135 : Populations de *Tristaniopsis calobuxus* les plus proches de la parcelle. **197**

Figure 136 : Populations de *Tristaniopsis calobuxus* les plus proches de la parcelle. **197**

Figure 137 : Distribution à l'échelle de la parcelle de la dissémination des graines **198**

Figure 138 : carte de positionnement Tontouta-Houailou **199**

Figure 139 : Répartition des parcelles de 9 m² de *Tristaniopsis calobuxus* en fonction des milieux. **200**

Figure 140 : Evolution de la densité de *T. calobuxus* en fonction de la taille et du milieu **202**

Figure 141 : Répartition des individus de *Tristaniopsis* récoltés pour l'étude de "code-barre ADN" **206**

Figure 142 : Répartition des sous-taxons de *Tristaniopsis guillainii* identifiés par code-barres et répartition des variétés de *T. guillainii* selon la flore calédonienne **206**

Tableau 1 : Analyses physico-chimiques des deux topsoils étudiés (Goro et Tontouta). 28

Tableau 2 : Comparaison entre l'inventaire floristique et la dynamique germinative des topsoils. 44

Tableau 3 : Caractéristiques morphologiques et physiologiques des graines retenues pour l'étude CNRT-Biotop 49

Tableau 4 : Quelques caratéristiques physico-chimiques des boues utilisées 83

Tableau 5 : Diversité en AMF observée sur topsoil stocké en andain et dans la parcelle témoin (BS6) 87

Tableau 6 : Diversité des AMF isolés des racines de plantes sur topsoil en andain et dans la parcelle témoin (BS6). Le nombre de séquences d'AMF identifiées dans les racines des plantes étudiées pour chaque genre est indiqué. Le ligne « indéfini » correspond à des séquences situées à la racine des Glomeraceae et qu'il est donc difficile de placer de manière certaine. 89

Tableau 7 : Teneurs totales en éléments N, K et Ca dans les racines et les feuilles de *Carpolepis laurifolia* en fin d'expérience. 111

Tableau 8 : Teneurs totales en métaux dans les racines et les feuilles de *Carpolepis laurifolia* en fin d'expérience. 112

Tableau 9 : Teneurs en métaux extractibles au DTPA dans les sols rhizosphériques entourant les racines des plants de *Carpolepis laurifolia* soumis à différents traitements, en comparaiosn avec le sol non rhizosphérique (hors influence des racines). 113

Tableau 10 : Teneurs totales en éléments N et Ca (K n'a pas pu être déterminé ici) dans les racines et les feuilles de *Tristaniopsis glauca* en fin d'expérience. 116

Tableau 11 : Teneurs totales en métaux dans les feuilles et les racines de *Carpolepis laurifolia* en fin d'expérience. 117

Tableau 12 : listes des paramètres obtenus pour les relations de Chapman-Richard pour *Tristaniopsis glauca* (SigmaPlot). 120

Tableau 13 : Diversité en AMF associés aux racines de *Carpolepis laurifolia* 11 mois après le début de l'expérimentation 125

Tableau 14 : Diversité des AMF dans les racines de Carpolepis. Pour chaque modalité (NI= Non Inoculé, I= Inoculé, NIB= Non Inoculé + Boue, IB= Inoculé + Boue), le nombre de séquences obtenues pour chaque genre d'AMF est indiqué. 127

Tableau 15 : Paramètres d'acquisition des courbes intensité-potentiel pour le dosage du nickel, du cobalt et du chrome hexavalent dans les lixiviats eau du sol. 138

Tableau 16 : Détail et dénomination des différents échantillons de terre étudiés dans le volet provenant du site de Goro pour les leptosols (ferralsols plinthiques) et sols en place et des autres sites pour les sols de référence naturels. 141

Tableau 17 : gammes de concentrations pseudo-totales en éléments métalliques mesurées pour les sols stockés étalés et en andain de Goro (t=0 à t=18 mois ; n=26) et Tontouta (t=0 à t=12 mois ; n=21). 146

Tableau 18 : Composition des horizons des sols en places en éléments majeurs (en %) 154

Tableau 19 : Composition des horizons des sols en places en Co, Cr et Ni 154

Tableau 20 : Evolution de la composition du topsoil en éléments majeurs entre 0 et 24 mois (en %) 155

Tableau 21 : Evolution de la composition du topsoil en Co, Cr et Ni entre 0 et 24 mois 155

Tableau 22 : Capacité d'échange cationique mesurée par la cobaltihexamine des horizons des différents sols 156

Tableau 23 : Calcul du taux de saturation de la CEC pour les sols étudiés. 157

Tableau 24 : Présence des différentes phases cristallines dans les horizons de sols (DRX) (+/+++ : abondance relative) 160

Tableau 25 : Pourcentages massiques d'azote, carbone et soufre dans les échantillons. Les teneurs en soufre sont données à titre indicatif, mais ne seront pas interprétées. 162

Tableau 26 : Valeurs de pH, teneurs en $mg.kg^{-1}$ de sol en éléments, concentrations en carbone organique et inorganique total en solution dans les suspensions de $NaNO_3$ (0,01M) après 24 h d'agitation. 167

Tableau 27 : Valeurs de pH, teneurs en $mg.kg^{-1}$ de sol en éléments, concentrations en carbone organique et inorganique total en solution dans les suspensions de citrate (0,01M) après 24 h d'agitation. 169

Tableau 28 : Valeurs de pH, teneurs en $mg.kg^{-1}$ de sol en éléments, concentrations en carbone organique et inorganique total en solution dans les suspensions d'EDTA (0,01M) après 24 h d'agitation. 169

Tableau 29 : Liste des loci microsatellites utilisés pour l'étude de diversité génétique et de flux de gène de *Tristaniopsis calobuxus* 181

Tableau 30 : Récapitulatif du nombre d'allèles par locus 192

Tableau 31 : Les allèles rares par locus 192

Tableau 32: Récapitulatif des résultats de l'étude de descendance 194

Tableau 33 : Distances de pollinisation moyenne par pieds-mères 195

Tableau 34 : Pourcentage par pieds-mères des descendants assignés à des pères potentiels 196

Tableau 35 : Résultat de l'analyse de parenté 198

Tableau 36 : Distance moyenne de dissémination des graines des individus locaux 199

Tableau 37 : Résumé littérature sur la germination de *Tristaniopsis calobuxus* 201

Tableau 38 : Résultats de l'inventaire des *T. calobuxus* en fonction de leur taille et de leur milieu 201

Tableau 39 : Survie des jeunes plants de 25 cm 202

Tableau 40 : Liste des marqueurs moléculaires utilisés pour l'étude "code-barre ADN" du genre *Tristaniopsis* 208

Remerciements

Au terme de ces quatre années de travaux fructueux, nous tenons à remercier l'ensemble des personnes qui ont œuvré de près ou de loin à la réussite de ce projet, en particulier :

- La société VALE-NC, notamment Stéphane Mc Coy et son équipe, qui nous ont mis à disposition des parcelles pour notre expérimentation, nous ont accueillis régulièrement pour le suivi de ces parcelles, et nous ont apporté leur aide chaque fois que c'était nécessaire.

- La société SMGM, en particulier Denis Fayard de la mine Vulcain et son équipe pour nous avoir octroyé un terrain pour une expérimentation sur le topsoil et pour l'aide régulière qui nous a été apportée, notamment avec un engin lourd pour nos prélèvements.

Le projet Ecomine BioTop ne pourrait évidemment pas avancer sans cette collaboration volontaire et régulière de nos partenaires des entreprises minières, partenariat que nous estimons absolument essentiel pour l'avancement des recherches sur la restauration écologique des terrains miniers.

- Audrey Laurent et Léa Hatteschweiler (VCAT et Ingénieure contractuelle UNC/IAC dans le cadre du projet) qui ont porté à bout de bras une grande partie des aspects techniques du projet, en particulier le suivi des expérimentations sur le terrain; ainsi que Valérie Médevielle (UNC) et Casimir Véa (IAC) qui sont fréquemment intervenus dans ce projet.

AMF	Champignons mycorhiziens à arbuscules
Boues de STEP	boues de station d'épuration
CEC	capacité d'échange cationique
CNRT	Centre National de Recherche Technologique « Nickel et son Environnement »
DTPA	acide diéthylène triamine pentaacétique
ECM	Ectomycorhizes
IAC	Institut Agronomique néoCaédonien
IRD	Institut de recherche pour le développement
MPF	maquis paraforestier
MA	maquis arbustif
MLH	maquis ligno-herbacé
OTU	unités taxonomiques opérationnelles (sigle utilisé en biologie moléculaire pour des séquences d'ADN traduisant des taxons élémentaires).
UNC	Université de la Nouvelle-Calédonie

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

En Nouvelle-Calédonie, la restauration des sites miniers après extraction du nickel est rendue difficile par le caractère relativement extrême des milieux serpentiniques. Différents travaux de recherche ont été réalisés, surtout à partir des années 1980, en vue de maîtriser la revégétalisation de ces sites. Après quelques essais avec des espèces végétales compétitives et à croissance relativement rapide, mais peu adaptées aux substrats ultramafiques, les travaux ont été focalisés essentiellement sur le choix d'espèces indigènes pionnières, pour la revégétalisation, et la maîtrise de leur culture (Jaffré et Pelletier 1992). L'intérêt ne s'est porté de façon claire sur le substrat et sa microflore qu'en 2003 avec le colloque sur la restauration écologique qui s'est tenu à Nouméa et qui a notamment préconisé l'utilisation systématique du topsoil lorsque c'est possible (Amir et al. 2003). Le nouveau code minier a dynamisé ces recherches en introduisant une réglementation plus contraignante de la revégétalisation des sites miniers. Des avancées significatives ont été ainsi obtenues depuis quelques années et une revégétalisation dans l'optique d'une restauration écologique, avec une diversité minimale d'espèces natives est désormais pratiquée dans la majorité des opérations de réhabilitation.

Toutefois un certain nombre de difficultés persistent et des améliorations importantes peuvent encore être apportées, à condition d'approfondir nos connaissances sur les différents déterminismes qui conditionnent le développement, l'adaptation et la diversité des plantes en milieu ultramafique. Quatre aspects nécessitent en particulier des recherches précises pour mettre au point une véritable technologie de la restauration écologique des terrains miniers :

- Une meilleure connaissance des processus de germination et de la phase post-germinative, notamment dans les conditions naturelles, ainsi que des conditions de conservation des graines, pour les diverses espèces utilisées en revégétalisation
- Une bonne connaissance des topsoils, de leurs potentialités physico-chimiques et microbiologiques (notamment symbiotes), ainsi que des conditions de conservation de ces potentialités.
- Une bonne maîtrise des amendements organiques et minéraux du sol.
- Une connaissance minimale de la diversité génétique des espèces végétales utilisées.

Le projet Ecomine BioTop est conçu en réponse à ces problématiques ; il est structuré en 4 volets : le premier concerne le topsoil et sa gestion ; le deuxième traite des symbioses mycorhiziennes et leur optimisation en relation avec des amendements minéraux et organique des sols ; le troisième étudie le fonctionnement géochimique des topsoils, notamment spéciation des métaux et la matière organique; enfin le quatrième volet concerne une étude sur la diversité génétique d'espèces endémiques pouvant servir de modèle pour des études ultérieures plus systématiques.

Les espèces végétales utilisées dans les différentes expérimentations sont les suivantes : *Costularia comosa* et *Machaerina deplanchei* (Cyperaceae), *Alphitonia neocaledonica* (Rhamnaceae), *Tristaniopsis* spp. et *Carpolepis laurofolia* (Myrtaceae), *Scaevola* spp. (Goodeniaceae), *Dodonea viscosa* (Sapindaceae) et *Gymnostoma* spp. (Casuarinaceae).

Ecomine BioTop fait intervenir cinq équipes différentes ; c'est un projet non seulement pluridisciplinaire, mais où la pluridisciplinarité est mise au service du traitement de problèmes pratiques précis en vue d'apporter des réponses claires en termes de technologies de restauration écologique des milieux miniers. Ainsi, par exemple, le topsoil est traité sous ses diverses facettes : aspects physico-chimiques (composition précise, dynamique des métaux, matière organique, etc.), banque de graines et conservation des différents types de graines au

sein du sol, symbiotes mycorhiziens ectotrophes et endotrophes, activité microbienne générale. L'amélioration de la croissance des espèces végétales par amendement organique et inoculation avec des symbiotes, ainsi que la diversité génétique des plantes sont également traités.

Ce projet, qui a démarré début 2010, a subi du retard, essentiellement pour les raisons suivantes :

- des difficultés administratives pour le transfert des budgets aux divers groupes faisant partie du projet, puis pour l'envoi d'échantillons de sols aux chercheurs métropolitains.
- des difficultés pour obtenir les parcelles expérimentales sur mine et mettre en place les expérimentations correspondantes.
- la lenteur de croissance des plantes pour les travaux sur terrain ou encore de germination des graines à très forte dormance.

C'est pourquoi, nous avons demandé à étaler le projet sur 4 ans, afin de pouvoir terminer les programmes tels qu'ils étaient prévus.

Malgré ces quelques difficultés, la quasi-totalité des objectifs attendus a été atteinte et des avancées significatives ont été réalisées et seront traduites en termes de recommandations et de fiches techniques.

Le plan du rapport suit globalement celui qui avait été préconisé pour le texte du projet. Toutefois, afin de réduire les redondances entre les quatre volets du projet, la partie « influence des boues de station d'épuration sur la croissance des plantes », qui est couplée avec les effets de la mycorhization dans une même expérimentation sur terrain, a été transférée du volet 3 au volet 2.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES GÉNÉRAUX

Ce chapitre vise à brosser un tableau général des études réalisées dans le cadre du projet, ainsi qu'une description sommaire des approches adoptées pour chaque étude. Des précisions sont apportées ensuite dans chacun des quatre volets concernés.

2.1. SITES D'ÉTUDES ET DONNÉES MÉTÉOROLOGIQUES CORRESPONDANTES

La majorité des études réalisées sur terrain est concentrée sur deux sites : un site en plaine et en milieu humide à Goro (terrain de VALE.NC) et un site en altitude, mais beaucoup moins humide à Tontouta (mine de SMGM). Le choix de ces deux zones a été fait afin de comparer les résultats obtenus dans deux conditions climatiques et édaphiques différentes :

2.1.1. SITE DE GORO :

La Figure 1 montre la position des parcelles d'expérimentation à Goro :

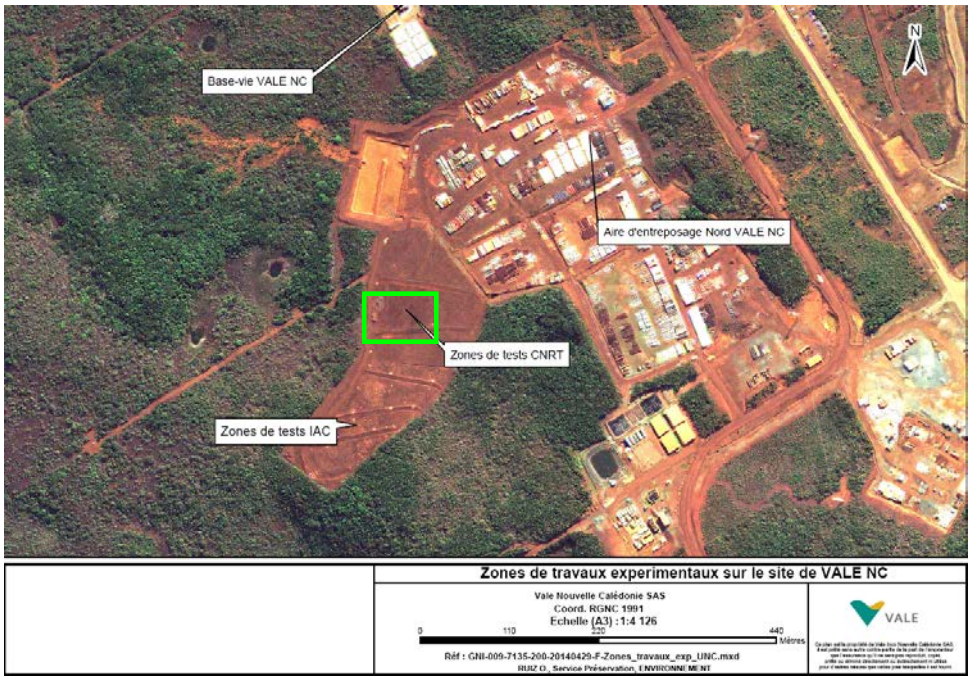


Figure 1 : Vue aérienne situant le site d'expérimentation à Goro (site de VALE.NC)

Ce site est situé à une altitude de 180 m environ. C'est sur ce site que sont réalisées le plus d'expérimentations, en raison de la surface disponible plus importante : environ 3000 m^2. La topographie est relativement plane et régulière, avec une pente très légère. Le terrain comporte un topsoil nu vieux de plusieurs années, condition nécessaire pour l'expérimentation sur l'inoculation de plants avec des champignons mycorhiziens.

Des données météorologiques relativement précises ont pu être obtenues pour ce site :

- La pluviomètrie (Fig. 2) donne une moyenne de plus de de 3400 mm/an avec généralement une plus forte pluviosité de janvier à avril et une plus faible pluviosité entre juin et octobre, mais qui reste élevée. Le sol est donc fréquemment humide et ce facteur est relativement peu limitant sur ce site. Le détail des pluviométries des 4 années de l'expérimentation est donné en annexe des « matériels et méthodes généraux ».

Les températures mensuelles fluctuent entre 16°C et 28°C (Fig. 3), avec une période un peu plus fraiche entre mai et septembre, les écarts moyens journaliers étant de l'ordre de 5 °C.

Nous donnons également en figure 4 les humidités relatives moyennes sur la période de l'étude, montrant qu'il s'agit d'un site à forte humidité relative, avec peu de fluctuations au cours de l'année.

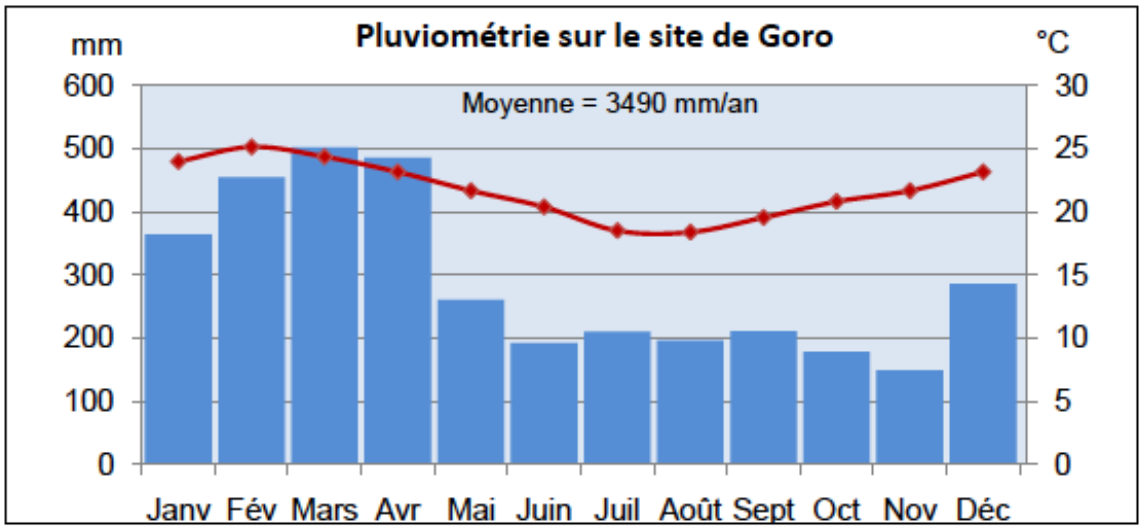


Figure 2 : Précipitations moyennes à Goro (site de VALE.NC) sur les 4 années de l'étude

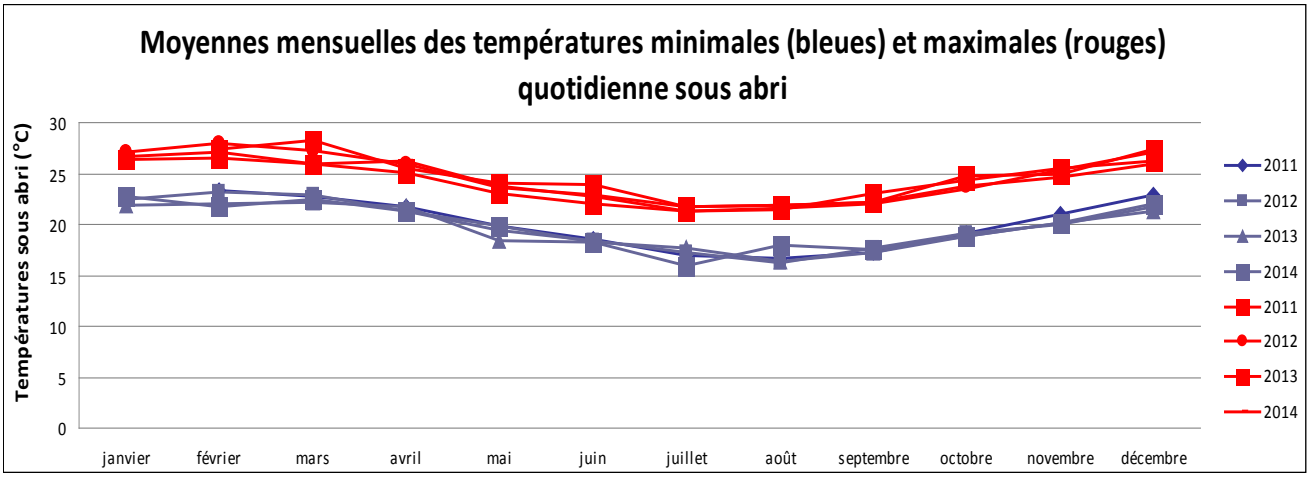


Figure 3 : Températures mensuelles moyennes à Goro (site de VALE.NC) sur les 4 années de l'étude

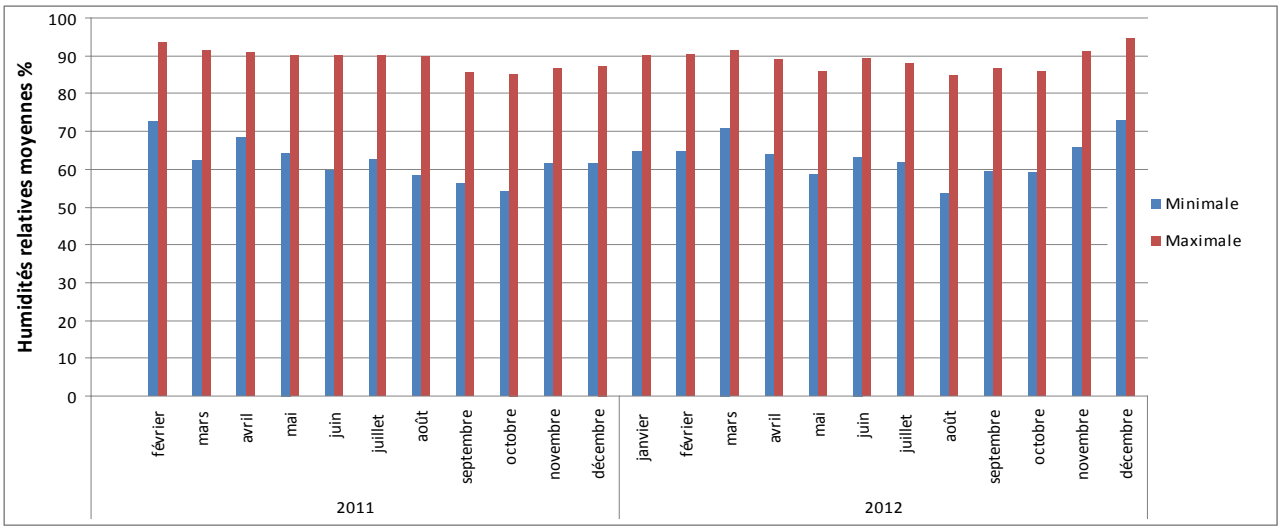


Figure 4 : Humidités relatives moyennes à Goro (site de VALE.NC) sur 2 ans (les années 2013 et 2014 montrent des valeurs similaires).

2.1.2. SITE DE TONTOUTA :

La figure 5 montre la position des parcelles d'expérimentation à Tontouta :



Figure 5 : Vue aérienne montrant le site d'expérimentation à Tontouta (Mine Vulcain).

L'altitude du site est d'environ 750 m. La surface obtenue est faible : environ 300 m^2 (terrain plat au-dessus d'une verse) de sorte qu'une seule expérimentation y est mise en place (stockage du topsoil).

Pour ce site, nous n'avons pas pu obtenir de données climatiques précises,.

On peut cependant constater (Fig. 6) qu'il s'agit d'une zone plus sèche. Elle reçoit en moyenne environ 1350 mm de pluie par an. Les températures mensuelles moyennes varient globalement entre 16 °C et 23 °C.

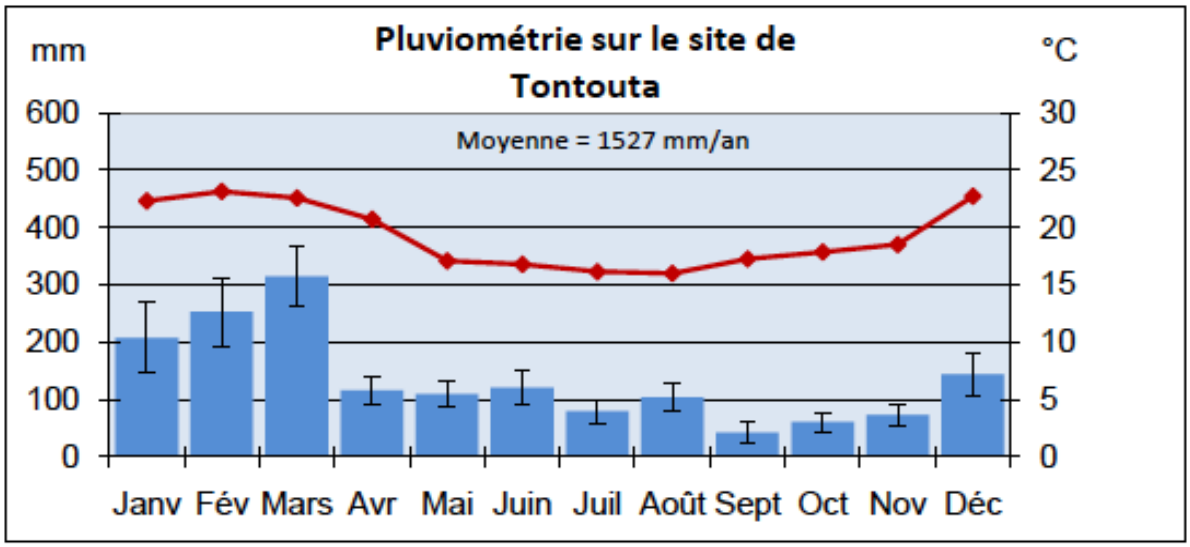


Figure 6 : Pluviométrie et températures moyennes mensuelles sur le massif de Tontouta.

Les Moyennes mensuelles ± S.E ont été réalisées à partir des données de l'Observatoire de la ressource en eau de la DAVAR des années 2000 à 2008. Les températures mensuelles moyennes ont été relevées par l'IAC pour l'année 2009.

2.2. CARACTÉRISATION PÉDOLOGIQUE ET FLORISTIQUE GÉNÉRALE DES DEUX SITES D'ÉTUDE PRINCIPAUX

2.2.1. CARACTÉRISTIQUES PÉDOLOGIQUES :

Les topsoils étudiés ont été analysés au départ (t0), le tableau suivant présente les principales caractéristiques (paramètres habituellement analysés en pédologie).

Les deux topsoils sont des **Ferralsols** (selon la classification de la Base de Référence Mondiale, BRM 2014, de la FAO), définis comme sols très évolués, de couleur rouge ou jaunâtre due à leur forte teneur en oxydes et hydroxydes fer (autres dénominations : sols ferralitiques en France, Oxisols aux USA, …).

Le Ferralsol de Goro se distingue par une évolution (ou altération) encore plus poussée, distinguée en particulier par un pH plus bas, et des teneurs en Si et Ni plus faibles que celui de Tontouta. Sa dénomination selon la BRM est un **Ferralsol plintique** (c'est à dire avec un horizon riche en fer, à blocs de cuirasse). Le Ferralsol de Tontouta est un **Ferralsol gérique** selon la BRM (matériau minéral qui a une capacité d'échange cationique effective très faible, en général correspondant aux sols ferralitiques érodés de pente).

Il n'est pas possible à ce stade de distinguer si un des deux topsoils est de meilleure qualité qu'un autre en matière de banque de graines et de microorganismes, les CEC (Capacité d'échange cationique) étant proches, bien que les teneurs en matière organique du sol de Goro soit plus élevée.

Tableau 1 : Analyses physico-chimiques des deux topsoils étudiés (Goro et Tontouta).

	Ferralsol de Goro		Ferralsol de Tontouta	
	Moyenne	(SE)	Moyenne	(SE)
pH (H_2O)	4,95	(0,20)	5,87	(0,07)
Matière organique :				
Azote Kjel. (mg/g)	2,56	(0,34)	0,35	(0,03)
Carbone organique (mg/g)	62,77	(13,72)	10,52	(0,49)
C/N	24,54	/	29,88	/
CEC (mEq/100g)	10,00	(1,87)	10,60	/
Eléments extractibles :				
Ni (KCl) (mg/kg)	2,97	(1,24)	0,93	(0,10)
Mn (KCl) (mg/kg)	55,31	(30,17)	0,98	(0,30)
Ni (DTPA) (mg/kg)	10,21	(4,50)	7,73	(1,51)
Mn (DTPA) (mg/kg)	81,65	(50,06)	76,46	(25,97)
Eléments totaux :				
SiO_2 (%)	0,54	(0,09)	5,20	
Fe_2O_3 (%)	57,06	(4,63)	65,99	/
MnO (%)	0,14	(0,02)	0,47	
Ni (%)	0,16	(0,02)	1,2	/
Cr (%)	4,35	(0,52)	2,11	
Co (%)	0,02	(0,00)	0,09	
Granulométrie :				
Argiles (%)	13,60	(3,29)	17,90	(5,46)
Limons fins (%)	7,60	(1,80)	29,58	(6,49)
Limons grossiers (%)	3,74	(1,18)	6,28	(1,51)
Sables fins (%)	9,56	(1,73)	8,32	(3,34)
Sables grossiers (%)	53,02	(7,71)	35,14	(6,86)

2.2.2. CARACTÉRISTIQUES FLORISTIQUES :

Le site de Goro sur lequel le topsoil a été prélevé était recouvert par un maquis paraforestier, couramment considéré comme une formation de transition entre le maquis arbustif et la forêt dense humide, (L'Huillier et al 2010), et caractérisé dans le Grand Sud par une strate d'arbres dominée par *Gymnostoma deplancheanum* pouvant atteindre 15 m de haut (Fig. 7). La strate arbustive varie, quant à elle, entre 2 et 8 m de haut. Ce type de formation végétale ne présente pas ou peu de strate cypéracéenne, et possède une litière épaisse variant de 5 à 10 cm. On le retrouve sur sol ferralitique ferritique cuirassé (Ferralsol plinthique), remarquable par la prépondérance de blocs de cuirasse pouvant mesurer 50 cm à plus d'un mètre.

Le site de Tontouta sur lequel le topsoil a été prélevé est un maquis ligno-herbacée, particulièrement dépourvu en dicotylédones, celles présentes étant relativement communes, mais avec une strate cyperacéenne fortement développée. On retrouve cette formation sur pente assez forte, sur sols remaniés par l'érosion laissant apparaitre de nombreux blocs de peridotites. La litière y est irrégulière, peu épaisse et ne dépasse pas 2 cm d'épaisseur.

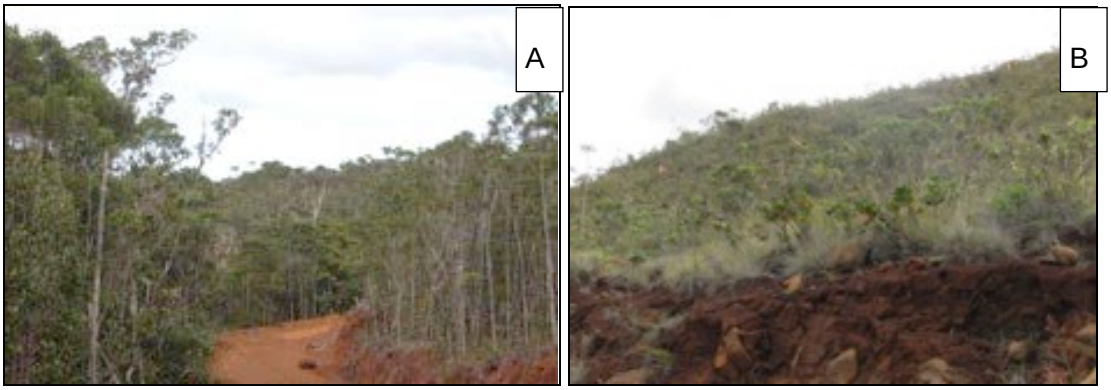


Figure 7 : Vues des maquis paraforestier de Goro (A) et ligno-herbacé de Tontouta (B).

2.3. ETUDES RÉALISÉES

Comme précisé en introduction, le projet comporte de nombreuses études, en laboratoires, en serre et sur le terrain.

Trois types d'expérimentations sur terrains, intéressant plusieurs volets du projet, ont été réalisées : un suivi de topsoil stocké en andain ou étalé, des enfouissements de graines afin d'étudier la variation de leur viabilité au cours du temps et une expérimentation sur la mycorhization des plantes et les effets des boues de station d'épuration (parcelles plantées). La figure 8 montre le plan sur le site de Goro (les plans expérimentaux détaillés sont décrits dans les parties correspondantes).

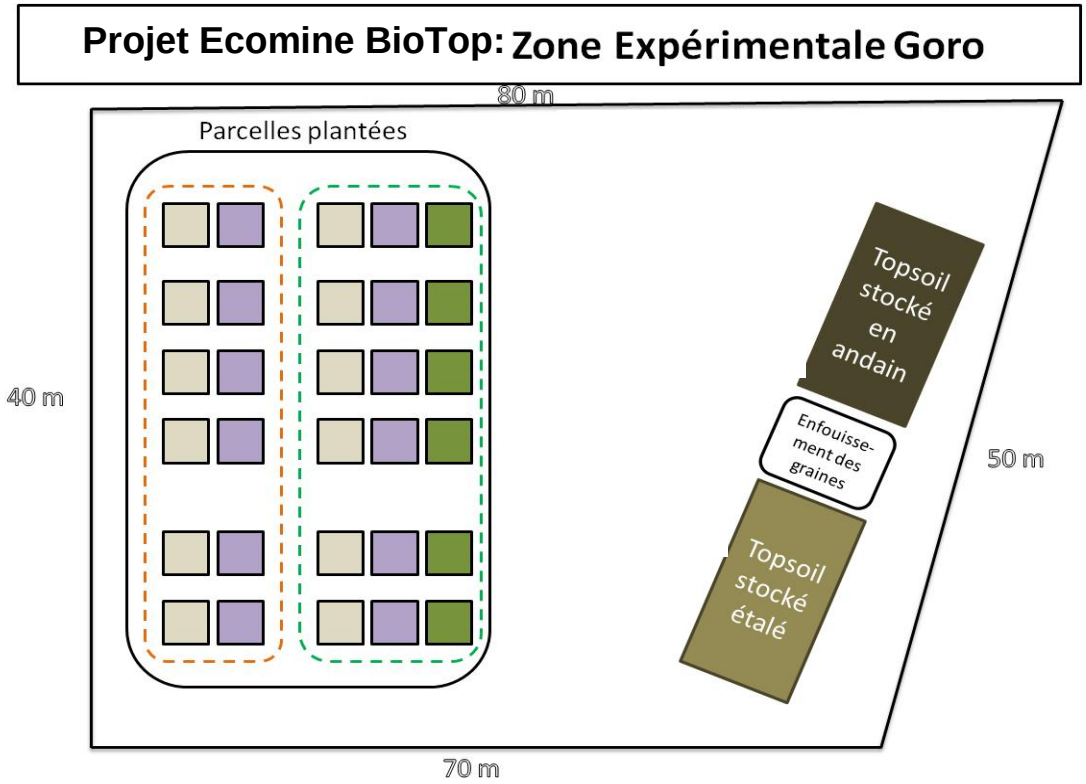


Figure 8 : Schéma des expérimentations sur terrain mise en place à Goro (site VALE.NC).

Sur le site de Tontouta, seul l'expérimentation sur le stockage du topsoil a été mise en place, ainsi que l'enfouissement des graines, en raison de la faible surface du terrain octroyé.

Retard dans la mise en place des expérimentations sur terrain :

Le problème de la mise en place des parcelles d'expérimentation sur mine a été une des causes principales du retard pris dans le projet et de la décision de le prolonger d'une année.

La mise en place et le suivi de ces expérimentations ont posé des difficultés à 2 niveaux :

- Un retard important au niveau de l'obtention et de la préparation des terrains :
  - A Goro (avec VALE-NC) le terrain a été obtenu courant 2010. L'obtention du topsoil, après décapage par VALE-NC d'un maquis paraforestier a été possible peu de temps après. Malheureusement, un incident de nature non identifiée (vol du topsoil pour un

autre usage?) a rendu nécessaire un deuxième apport de topsoil d'une qualité moindre, ajoutant encore quelques semaines de retard ; l'expérimentation de stockage du topsoil à Goro a donc démarré fin 2010.

  - A Tontouta (avec la société SMGM), pour des raisons complexes, le terrain d'expérimentation n'a été obtenu qu'en juillet 2011, et l'expérimentation de stockage de topsoil n'a donc pu démarrer qu'en août 2011 (soit plus d'une année et demi après le début du projet).

- L'expérimentation à Goro avec des espèces végétales endémiques visant à tester sur terrain l'effet de la mycorhization, combiné ou non avec un amendement organique (boue de station d'épuration), a eu également du retard du fait de la croissance plus lente que prévu des plants en pépinière qui étaient encore trop petits au premier trimestre 2011 pour être mis en terre. La plantation a donc été retardée à novembre 2011. Or le suivi des plants sur le terrain devait se faire sur 2 ans.

Les autres études réalisées sont listées ci-dessous dans les volets correspondants.

2.3.1. VOLET 1 : CARACTÉRISATION DU TOPSOIL ET DE SON ÉVOLUTION PENDANT SON STOCKAGE EN MINE.

Cette étude vise à mieux comprendre les potentialités des topsoils et les moyens de les conserver et de les gérer. Elle comporte :

- Le suivi de l'évolution de topsoils stockés en mine selon 2 modalités, en andain de 2 m de haut ou étalé en couche de 50 cm de haut. Ces deux modalités sont comparées au topsoil non stocké. L'étude est réalisée sur les 2 sites, correspondant à deux types de conditions très différentes en termes de pluviosité et d'altitude.

L'objectif de l'étude est d'analyser les variations des potentialités du topsoil au cours d'un stockage étalé ou en tas surélevé en mine, afin de préconiser un mode de gestion optimale.

Pour cela, différents paramètres sont mesurés régulièrement pendant 3 ans. Sont traités dans ce volet les potentialités biologiques du topsoil : potentiel séminal (banque de graine), potentiel mycorhizogène et densité de microflore bactérienne. Les paramètres physico-chimiques (pH, potentiel redox mesurant le degré d'aération, conductivité électrique, spéciation des métaux, capacité d'échange cationique et matière organique) sont traités dans le volet 3.

- L'analyse de l'évolution de la viabilité de graines de 4 espèces végétales pionnières enfouies dans le sol (à l'intérieur de petits sachets). Ce travail permet d'obtenir des données complémentaires à celle de l'expérimentation précédente, afin de comprendre les facteurs qui influencent la viabilité des graines au sein du topsoil.
- L'étude de la conservation en conditions contrôlées *ex situ* des semences de 4 espèces, pour déterminer les conditions optimales de conservation de ces graines.
- La caractérisation de la banque de graine de topsoils non stockés provenant de trois types de maquis différents (maquis paraforestier, maquis arbustif et maquis ligo-herbacé), ainsi que l'analyse des variations de la banque de graines en fonction des saisons sur ces topsoils. Ces études apportent d'autres informations importantes pour la gestion des topsoils et ont été réalisées tant sur la zone de Goro que de Tontouta.

L'ensemble des paramètres étudiés, ainsi que les analyses physico-chimiques générales (présentées précédemment) permet d'avoir une bonne image de la fonctionnalité des topsoils et de l'évolution de leur fertilité au cours du stockage et en fonction des saisons, ce qui permettra d'en déduire des recommandations pour la bonne gestion et utilisation des topsoils en vue de la restauration écologique des milieux.

2.3.2. VOLET 2 : CONNAISSANCE ET UTILISATION DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS.

Ce volet comporte plusieurs études complémentaires dont l'objectif final est de maîtriser l'optimisation des symbioses mycorhiziennes dans les opérations de revégétalisation :

- Diversité des champignons mycorhiziens à arbuscules (AMF) ; variation après stockage du topsoil : l'analyse de la diversité générale des AMF (par séquençage de l'ADN) dans les racines de quelques espèces végétales sur le site de Goro permet de compléter les connaissances obtenues en parallèle sur d'autres sites donnant une vision assez précise de l'importance de ces symbiotes dans les écosystèmes miniers. Une comparaison entre la diversité en milieu naturel à Goro et celle trouvée dans les racines des mêmes plantes se développant sur le topsoil stocké est ensuite réalisée. Cette comparaison permet de vérifier si le stockage du topsoil réduit la diversité des AMF.
- Diversité des champignons ectomycorhiziens (ECM) ; déterminisme de leur tolérance au nickel : là encore, un complément d'étude de la diversité est réalisée parallèlement, afin d'estimer l'importance de ce groupe de symbiotes. L'analyse des déterminants moléculaires de la tolérance au nickel permet de comprendre leur mode d'adaptation.
- Mycorhization en serre avec le champignon ECM *Pisolithus albus* : l'expérience vise à analyser, en conditions semi-contrôlées, les améliorations apportées à la croissance et l'adaptation de la plante au milieu ultramafique, par cette symbiose.
- Influence de la fertilisation phosphatée en serre, sur la mycorhization (AMF) et le développement de 3 espèces végétales pionnières des maquis miniers : l'objectif est le même que précédemment, mais il est focalisé essentiellement sur le rôle d'apport de P, car cet élément est un des facteurs qui contrôlent la mycorhization. L'expérience vise donc notamment à déterminer les doses de fertilisation favorables à la fois à la mycorhization et à la croissance des plantes.
- Enrobage de graines avec des spores de champignons mycorhiziens (AMF) en vue de leur utilisation en hydroseeding: la revégétalisation par ensemencement hydraulique concerne souvent des zones en pente sans topsoil. Dans ces conditions, l'apport de champignons mycorhiziens est essentiel. La présence des spores sur les graines permettrait à la symbiose de s'instaurer dès les premiers stades du développement de la plante, stades les plus critiques en termes d'adaptation et de survie.
- Expérimentation sur terrain : mycorhization de plants de 2 espèces végétales, l'une à affinité ECM, l'autre à affinité AMF ; influence d'un amendement en boue de station d'épuration sur la symbiose mycorhizienne et le développement des plantes. Il s'agit d'une expérience importante à la fois en termes de temps de travail, de nombres de personnes impliquées et de conséquences pratiques. C'est en effet la première expérience sur terrain minier utilisant l'inoculation de plants en pépinière. Elle vise à vérifier l'intérêt de la mycorhization des plantes en pépinière, pour la revégétalisation, et l'intérêt de la combinaison de ce traitement avec un amendement organique riche notamment en phosphore. Un suivi de différents paramètres biologiques (croissance, mycorhization) et physico-chimiques (teneurs en éléments majeurs et en métaux de la plante et du sol) permet d'interpréter correctement les résultats.

2.3.3. VOLET 3 : DYNAMIQUE IN SITU DES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES TOPSOILS

Cette partie est couplée à l'expérimentation sur terrain de stockage du topsoil décrite dans le volet 1. Elle comporte :

- L'évolution du pH, du potentiel d'oxydoréduction et de la conductivité dans les topsoils stockés en mine : les variations de pH, d'aération et de conductivité sont des éléments

pouvant expliquer des changements qui s'opèrent pendant le stockage du topsoil, notamment dans les couches profondes.

- L'évolution des diverses fractions des principaux métaux (Fe, Mn, Co, Ni, Cr) dans les topsoils stockés en mine : la toxicité métallique peut varier dans les sols en fonction de la spéciation des différents métaux, c'est-à-dire leur transformation. Il est donc important d'évaluer correctement l'évolution de ces éléments.
- Le fonctionnement des topsoils naturels et stockés en termes de composition minérale globale : cette approche globale permet d'apprécier l'évolution de la fertilité chimique des topsoils au cours du stockage.
- La caractérisation fine de la matière organique des topsoils et son évolution pendant le stockage : l'étude de l'évolution de la qualité de la matière organique permet de mieux interpréter les changements dans la capacité de rétention des cations et des métaux dans le sol.

2.3.4. VOLET 4 : DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DE QUELQUES ESPÈCES DE TRISTANIOPSIS ET SCAEVOLA DANS UNE PERSPECTIVE DE CONSERVATION ET DE RESTAURATION DES MILIEUX

Un des problèmes qui peut se poser en restauration écologique de milieux fragmentés est la faible diversité génétique des espèces utilisées ne permettant pas d'obtenir des populations suffisamment diversifiées pour avoir une bonne évolution sur le long terme. La connaissance des distances de pollinisation et de dissémination des graines est alors importante pour savoir si les populations pourront ou non avoir des échanges avec les milieux naturels environnants. Cette étude peut servir de modèle pour des études plus larges en vue de maîtriser les aspects de génétique des populations végétales en milieu minier. Elle comporte :

- Une analyse de la structuration de la diversité génétique des espèces testées à l'échelle du territoire
- Une estimation par approche génétique des distances de pollinisation et de dissémination des graines de *Tristaniopsis calobuxus* et de *Scaevola montana*.
- Une étude démographique d'une population de *T. calobuxus*.
- Une étude particulière du genre *Tristaniopsis* en Nouvelle-Calédonie, à l'aide d'outils moléculaires, afin de proposer un appui à la caractérisation de sa diversité spécifique.

3. VOLET 1 « CARACTÉRISATION DU TOPSOIL ET DE SON ÉVOLUTION PENDANT SON STOCKAGE EN MINE»

Intervenants :

IAC_axe II : Laurent L'Huillier, Bruno Fogliani (après 2012), Romain Matthieu, Casimir Véa, tâches 1 et 2

UNC-LIVE: Hamid Amir, tâche 3 ; Bruno Fogliani (avant 2012), tache 1, Valérie Médevielle, technicienne

Léa Hatteschweiler : VCAT UNC/IAC, puis Audrey Laurent : contractuelle UNC/IAC

3.1. OBJECTIFS, ORGANISATION ET DESCRIPTION DES TRAVAUX

3.1.1. OBJECTIFS ET DÉMARCHE GÉNÉRALE

Peu de données existent actuellement concernant les modalités optimales de conservation, de gestion et d'utilisation des topsoils néo-calédoniens. Or la bonne gestion et l'utilisation des topsoils sont désormais considérées comme des points clés pour la restauration écologique sur terrains miniers. Les topsoils sont en effet des sources importantes de graines, de propagules et de microorganismes, et contiennent l'essentiel de la matière organique et des nutriments nécessaires au développement des végétaux. Plusieurs questions se posent, notamment sur l'évolution de ces paramètres au cours du stockage des topsoils, et sur la valeur des topsoils en fonction de leur situation dans le paysage (effet du type de sol, de la végétation, …).

Le volet 1 propose à la fois des expérimentations sur le terrain concernant le stockage et la gestion du topsoil, des travaux de recherche *in situ* et des expérimentations en serre et au laboratoire sur les topsoils ou les graines les composant. La caractérisation et le suivi de la banque de graines, du potentiel mycorhizogène et de la densité bactérienne permettent d'obtenir les informations nécessaires pour mieux maîtriser sa conservation et son utilisation.

Les expérimentations sur le terrain, portant sur la conservation du topsoil, sont mises en place avec 3 modalités : une parcelle témoin représentative de la diversité végétale naturelle de la zone, un topsoil de la même zone récemment décapée, stocké en tas de 2m de haut et un topsoil de la même zone stocké épandu en couche de 40-50 cm. Des topsoils d'autres stations sont également analysés pour compléter les données de cette expérimentation.

3.1.2. MISE EN PLACE DES EXPÉRIMENTATIONS SUR TERRAINS

3.1.2.1. Mise en place de l'expérimentation à Goro

La mise en place de l'expérimentation sur le stockage du topsoil a nécessité d'attendre le défrichage d'une parcelle de maquis paraforestier (Fig. 8), afin de récupérer le topsoil frais correspondant. Les accords finalisés, la zone de récupération a ensuite été choisie et délimitée. Les travaux de décapage ont été menés par le sous-traitant SAS Goro Mines, sous notre

supervision et celle des pépiniéristes. Le sol a été décapé sur environ 30 cm de profondeur ; les souches de bois ont été conservées et les plus gros blocs de cuirasse enlevés.



Figure 9 : Maquis paraforestier de Goro

Les figures 10 à 13 montrent quelques étapes de la mise en place des parcelles d'expérimentation sur le stockage du topsoil sur la zone B.



Figure 10 : Récupération du topsoil après décapage



Figure 11 : Chargement dans le camion



Figure 12 : Déchargement du camion



Figure 13 : Topsoil en andain de 2 m

La description des formations végétales et les analyses physico-chimiques sont données dans la partie « matériels et méthodes généraux ». Ce topsoil, issu d'une formation para-forestière très dense, a été choisi pour son potentiel en restauration écologique relativement bon (à l'inverse de celui de Tontouta beaucoup plus pauvre).

Le terrain, en zone d'expérimentation présentait l'avantage d'être bien isolée (accès protégé et réservé), suffisamment grande pour accueillir les expériences à mettre en place, et enfin relativement plane et abritée du vent. 150 m^3 de topsoil nécessaires à l'expérience de stockage ont été amenés sur le terrain. Nous avions à disposition des engins très lourds, un camion et une chargeuse, limités dans leur manœuvre à cause des risques d'embourbement.

Deux conditions de stockage de topsoil sont testées (Fig. 13 et 14): sous forme d'un andain de 2 m de haut (pour vérifier s'il n'y a pas un effet de la compaction du topsoil, avec anérobiose), et sous forme étalée (épaisseur : 50 cm), afin de comparer la conservation au cours du temps. La chargeuse étant peu adaptée pour faire un tri des blocs de cuirasse et des grosses souches, nous avons donc fait au mieux avec le matériel à disposition et les contraintes du terrain. Les deux tas contiennent quelques gros blocs de cuirasse. Pour cette raison, la méthode de prélèvement que nous avons adoptée sur toute la durée du projet, a consisté à utiliser une pelle mécanique pour rafraichir l'andain de topsoil sur un côté en enlevant une couche de 30-40 cm pour accéder au topsoil interne et prélever à différentes profondeur ensuite avec du petit matériel. Les prélèvements pour les analyses biologiques sont réalisés d'abord tous les 3 mois (1ère année) puis tous les 6 mois (détails au point 3 suivant).



Figure 14 : Topsoil étalé (50 cm d'épaisseur environ)

3.1.2.2. Mise en place de l'expérimentation à Tontouta

A partir d'août 2011, la société SMGM nous a installé les parcelles pour le suivi du stockage du topsoil en andain (2 m) et en étalé (50 cm) (Fig. 15 à 17). Le mode opératoire est similaire à celui décrit pour Goro. Toutefois, pour Tontouta, nous n'avons pas pu superviser nous même le prélèvement et le transfert du topsoil. Le topsoil de Tontouta, issu d'une formation moins développée (maquis ligno-herbacé) que celle de Goro, est moins riche en matière organique et en réserve de graines, donc d'une qualité différente de celui de Goro. Il est donc intéressant de suivre l'évolution pendant le stockage de 2 topsoils bien différents.



Figure 15 : Mise en place du topsoil stocké en andain sur la mine de vulcain à Tontouta (août 2011)



Figure 16 : Andain de topsoil (2 m de haut environ) stocké sur la mine de vulcain à Tontouta (mise en place août 2011).



Figure 17 : Topsoil stocké étalé (environ 50 cm de haut) sur la mine de vulcain à Tontouta (mise en place août 2011)

3.1.3. TÂCHE 1 : CARACTÉRISATION DE LA BANQUE DE GRAINE DES TOPSOILS, DE LEUR POTENTIEL SÉMINAL, DE LEUR DIVERSITÉ ET DE LEUR ÉVOLUTION SUR LES PARCELLES EXPÉRIMENTALES, EN CONDITIONS NATURELLES COMPARÉES AUX DIFFÉRENTES CONDITIONS DE STOCKAGE.

3.1.3.1. Sous-tâche 1 : Suivi des graines in situ

L'utilisation du topsoil et son efficacité à restaurer le milieu dépendent étroitement de sa capacité biologique. La banque de graines, en particulier, qui est à l'origine de la régénération naturelle y joue un rôle fondamental. Cette dernière est composée de diverses espèces issues du cortège floristique de la zone de prélèvement. Chacune de ces espèces possède un type de graine dont la structure et la dormance permettent une survie plus ou moins longue dans la couche de surface. L'étude de ces graines et de leur longévité *in situ* apparait dès lors comme un élément clé du mode de conservation du topsoil.

Des expérimentations comparatives portent également sur la conservation des graines dans les topsoils en mettant l'accent sur 4 espèces pionnières des milieux ultramafiques néo-calédoniens, par des études en laboratoire (caractérisation de la structure externe et interne des semences, étude de leurs réserves séminales et de leur mode de conservation) et des études de terrain (suivi de la capacité germinative des semences en milieu naturel au cours du temps, estimation de la longévité des graines en fonction de la profondeur d'enfouissement).

- Démarche expérimentale :

Les réponses des graines aux manipulations in situ sont ici évaluées, ainsi que les réponses au stockage, selon différentes techniques in situ (en tas / à plat) et selon la durée de stockage. Un suivi régulier sur 3 ans de la banque de graines et du potentiel séminal des topsoils stockés est réalisé.

Le travail sur 3 ans a porté sur le suivi au cours du temps du potentiel séminal des topsoils stockés, selon différentes modalités (origine, épaisseur, mode de stockage), sur les sites de Goro et de Tontouta, deux emplacements à situation contrastée.

Sur Goro, après une mise en place de l'essai en novembre 2010 avec le stockage d'un topsoil issu d'un maquis paraforestier, des prélèvements de topsoil stocké ont été réalisés tous les 3 mois l'année 1, puis tous les 6 mois pour les années 2 et 3. Ainsi, depuis le début il y a eu 9 échantillonages de topsoil stocké, soit 36 mois de suivis.

Sur Tontouta, l'essai a été mis en place en août 2011, avec le stockage d'un topsoil issu d'un maquis ligno-herbacé, en andain et à plat. Des prélèvements de topsoil stocké ont été réalisés

tous les 3 mois l'année 1, puis tous les 6 mois l'année 2 (2013). Ainsi, depuis le début il y a eu 7 échantillonages de topsoil stocké, soit 24 mois de suivis.

À chacune de ces dates et sur les deux sites, des échantillons de topsoils stockés en andain sont prélevés à quatre épaisseurs (surface, 50 cm, 100 cm, 150 cm), et des échantillons sont prélevés sur le topsoil stocké à plat à 50 cm de profondeur. A raison de cinq répétitions pour chaque épaisseur, au total 25 échantillons sont prélevés à chaque date.

Après prélèvement, les fractions de topsoils sont mises en terrine sous serre avec arrosage automatique (Fig. 18), et les germinations issues des graines contenues dans ce topsoil font l'objet d'un suivi régulier (environ tous les mois la première année, puis tous les 2-3 mois), jusqu'à ce qu'une identification au niveau du genre et si possible au niveau de l'espèce soit réalisée.



Figure 18 : Topsoils mis en terrine sous serre de l'IAC avec arrosage automatique.

Chaque échantillon de sol prélevé est également préparé pour analyse des paramètres physico-chimiques (en plus des observations microbiologiques réalisées par l'UNC et des analyses sur les métaux par l'INPL).

Des bougies poreuses ont été mises sur le topsoil stocké en andain (au sommet et à la base), pour le suivi du transfert d'éléments minéraux, notamment de métaux (voir le volet 3). Toutefois, aucune solution de sol n'a pu être relevée, même après passage de pluie. Il est probable que la porosité du substrat soit trop grande (présence de nombreux blocs de cuirasse), favorisant une circulation très rapide de la solution de sol (l'installation de lysimètre ou autre dispositif n'était pas envisageable du fait de la texture du sol).

3.1.3.2. Sous-tâche 2 : Conservation en conditions contrôlées ex-situ des semences par études de leurs caractéristiques propres

Quatre espèces avaient été choisies initialement pour la diversité de leur dormance présumée, afin d'avoir une gamme la plus large possible à savoir *Costularia comosa* (non dormante), *Alphitonia neocaledonica* (dormance physique confirmée et physiologique présumée ; L'Huillier et al., 2010 ; Zongo 2010), *Gymnostoma deplancheanum* (non dormante ; L'Huillier et al., 2010 ; Zongo 2010) et *Gahnia novocaledonensis* (dormance physiologique). Cependant, les quantités de graines nécessaires aux expérimentations de germination, d'enfouissement, de conservation et de vieillissement accéléré n'ont pas été suffisantes lors de la collecte de graines pour certaines espèces début 2012. Il a donc été décidé de travailler sur d'autres espèces tout aussi importantes et présentant des dormances de même type, à savoir *Machaerina* (ex *Baumea*) *deplanchei*

(dormance physiologique peu profonde présumée ; L'Huillier et al., 2010 ; Zongo 2010) et *Scaevola* cylindrica (dormance physiologique profonde présumée ; L'Huillier et al., 2010 ; Zongo 2010) qui viennent de fait s'ajouter aux espèces *A. neocaledonica* et *G. deplancheanum*.

- Démarche expérimentale :

Leurs caractéristiques externe et interne par macro et microscopie ont été étudiées, tout comme l'analyse de la composition brute de leurs réserves séminales : glucides, lipides, protides puis l'analyse plus fine de chacun de ces groupes de métabolites en particulier de la composition en acide gras des dits lipides. Ces données ont été mises en relation avec leur caractère orthodoxe ou récalcitrant. Des expériences de conservation en conditions contrôlées de température (température ambiante, 5°C, 15°C) et d'humidité (5%-silice ou 12%-chlorure de lithium d'humidité relative) pendant les années n+1 et n+2 ont été menées. A intervalle de temps régulier (T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T8, T10, T12, T15, T18, T21, T24, T30), la viabilité des graines ainsi que leur capacité à germer ont été étudiées selon des méthodes préétablies :

- La viabilité est évaluée par un test au chlorure de Tetrazolium (ISTA, 1999) ;
- les graines de *G. deplancheanum,* de *M. deplanchei* et de *S. cylindrica* sont mises à germer sans prétraitement à 25°C après avoir été désinfectées
- les graines d'*A. neocaledonica* sont mises à germer à 25°C après avoir été placées désinfectées puis placées dans un bain d'eau chaude à 80°C et laissées à refroidir toute une nuit.

Par ailleurs, des expérimentations de vieillissement accéléré à 45°C et 100% d'humidité relative (conditions extrêmes) ont été menées avec pour objectif d'établir l'impact sur les caractéristiques des graines (viabilité et germiation), du fait en particulier de la détérioration des constituants des réserves séminales qui jouent un rôle essentiel au moment de la croissance de la jeune plantule.

Les données obtenues ont alors été mises en relation avec celles obtenues dans les conditions naturelles (sous tâche 3).

3.1.3.3. Sous-tâche 3 : Etude de la longévité des graines in-situ.

L'enfouissement des graines ensachées, fraîchement collectées issues d'un lot homogène, s'est fait sur deux années différentes en fonction de la disponibilité des semences sur le terrain et ce à 4 profondeurs différentes de 2, 5, 10 et 50 cm (Fig. 19). Ainsi les graines d'*A. neocaledonica* et de *G. deplancheanum* ont été enfouies sous du top soil stocké sur la zone de Goro en 2011 alors que celle de *S. cylindrica* et de *M. deplanchei* l'ont été en 2012 sur la zone de Vulcain à Tontouta.



Figure 19 : Photos illustrant la mise en place de l'essai d'enfouissement d'*A. neocaledonica* et *G. deplancheanum* sur la zone de Goro.

Des prélèvements ont été effectués à différents temps (T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T8, T10, T12, T15, T18, T21, T24, T30) à toutes les profondeurs. La viabilité des graines et leur taux de germination (selon la même méthode qu'en sous-tâche 2), ainsi que leur levée en terrines sur vermiculite, régulièrement arrosées placées en chambre contrôlée (T° :25°C : lumière/obscurité 12h/12h), ont été étudiés afin de suivre leur perte de vigueur au cours du temps.

3.1.4. TÂCHE 2 : APPROCHE DESCRIPTIVE ET FONCTIONNELLE

Les mêmes paramètres qu'en tâche 1 sont étudiés sur des topsoils de différents autres sites afin d'analyser la diversité des comportements des topsoils, en mettant l'accent sur les relations avec la végétation en place.

Dans cette tâche deux études ont pu être menées. La première, réalisée en grande partie dans le cadre d'un stage de master 2 encadré par l'IAC pendant 6 mois (Goxe 2010) et poursuivie pendant deux ans d'observations en serre, porte sur la comparaison de différents topsoils en place en conditions naturelles (non stockés), provenant de trois types de maquis (maquis paraforestier, maquis arbustif et maquis ligno-herbacé, notés dans l'ordre MPF, MA et MLH) sur deux sites miniers (Tontouta et Goro, de conditions de pluviométrie et température nettement différentes) (Fig. 20 et 21). Au total, ce sont donc 3 formations végétales de maquis, sur 2 sites, à raison de 10 parcelles (de 10mx10m) par formation végétale (10 répétitions), soit 60 parcelles en tout qui ont été étudiées. Après avoir inventorié et caractérisé les formations végétales en place sur chaque parcelle, les topsoils ont été analysés afin de déterminer leur qualité pour la restauration écologique : la banque de graines (évaluation comme dans la tâche 1/sous-tâche 1, les prélèvements de topsoils ayant été fait entre avril et mai 2010, pour chaque parcelle 12 prélèvements espacés de 1m et de 240 cm2 réunis), les caractéristiques physico-chimiques par analyse de sol et le contenu en spores de mycorhizes à arbuscules (MA) (pour ces paramètres d'analyse de sol et de mycorhizes on se reportera aux parties suivantes, et au rapport de J. Goxe 2010).

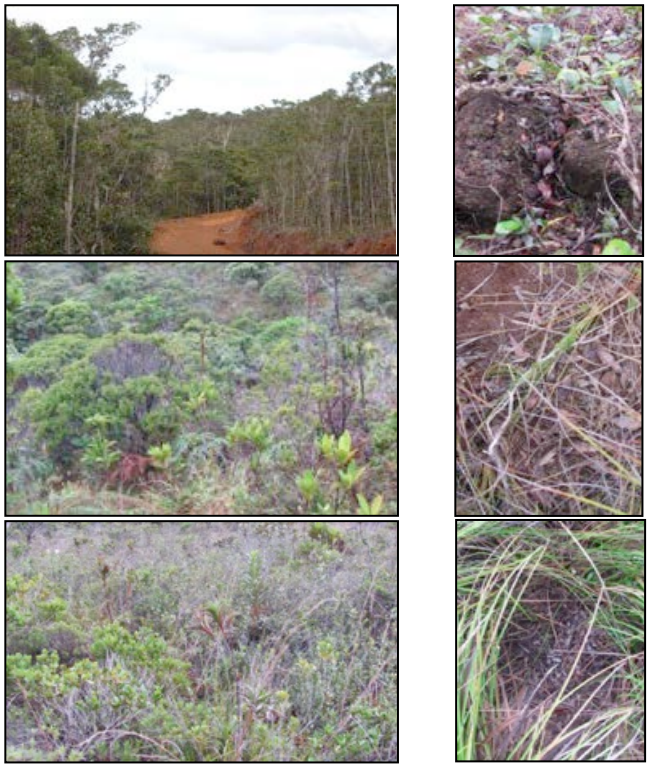


Figure 20 : Vues (dans l'ordre de haut en bas) des maquis paraforestier, arbustif et ligno-herbacé de Goro. A droite, vues des litières associées.

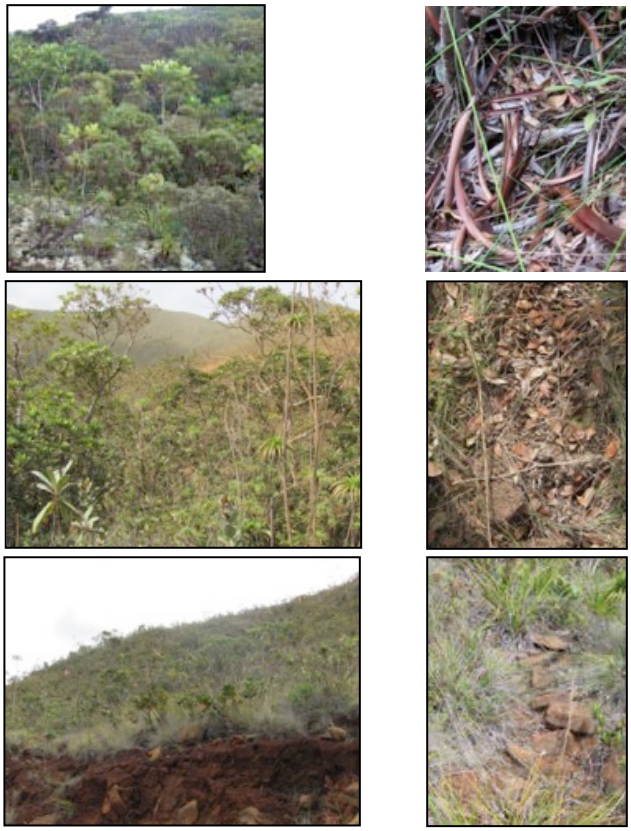


Figure 21 : Vues (dans l'ordre de haut en bas) des maquis paraforestier, arbustif et ligno-herbacé de Tontouta. A droite, vues des litières associées.

L'autre étude porte sur l'effet saison (date de prélèvement du topsoil). Elle a été menée sur le site de Tontouta, sur deux formations végétales (maquis paraforestier et maquis ligno-herbacé), pendant un an à raison d'un prélèvement tous les 2 mois environ (6 prélèvements entre janvier 2013 et janvier 2014) sur les mêmes parcelles à chaque fois (5 parcelles par formations, soit 10

parcelles en tout). Les deux formations choisies et les parcelles de ces formations sont exactement les mêmes que celles qui ont déjà été étudiées dans l'étude précédente ci-dessus, afin de compléter les résultats.

3.1.5. TÂCHE 3 ET 4 : SUIVI DU POTENTIEL MYCORHIZOGÈNE ET DE L'ACTIVITÉ MICROBIENNE DES TOPSOILS

Les topoils comportent une microflore symbiotique et non symbiotique essentielle pour le développement des plantes, en particulier, les champignons mycorhiziens à arbuscules (AMF) dont l'importance et la capacité à mycohizer les plantes (potentiel mycorhizogène) est mesurable. Ce potentiel mycorhizogène est estimé ici selon deux techniques :

- La quantité de spores AMF (spores relativement de grande taille : 50-300 μm) est quantifiée par tamisage humide, puis centrifugation sur gradient de saccharose (50%), puis comptage des spores viables (ayant un contenu cellulaire) sous loupe binoculaire (GX45).
- Le degré de mycorhization d'une plante piège, le sorgho, cultivée sur le sol étudié. Le choix du sorgho, plante que nous utilisons depuis de nombreuses années, est dicté par les considérations suivantes : i) c'est une plante robuste, adaptée à diverses conditions, présentant peu de maladies et ayant une bonne affinité avec les AMF ; ii) c'est l'une des rares plantes à tolérer les métaux lourds notamment Ni, avec toutefois une variabilité de la tolérance selon les sols; iii) l'utilisation d'espèces de maquis minier est peu envisageable en raison de leur lenteur de croissance qui ne permet d'avoir un résultat qu'après plus d'une année de croissance. Le degré de mycorhization est mesuré par observation microscopique, après coloration des racines fines (5 échantillons par traitements) au bleu Trypan puis étalement sur lames dans du glycérol.

L'activité des bactéries, ou leur abondance est également un bon indice de la fertilité du sol. Elle est estimée ici par le suivi périodique de la densité des bactéries aérobies cultivables. L'activité enzymatique globale prévue au départ dans le projet s'est révélée inefficace, car trop faible pour faire apparaître des différences en termes d'évolution au cours du stockage. Les différents essais préliminaires réalisés montrent que la densité des bactéries aérobies cultivables est un bon indicateur de l'activité globale du sol et de sa dégradation. Ce paramètre est donc utilisé ici uniquement en tant qu'indicateur relativement sensible et non comme valeur réelle de la quantité de bactéries du sol, celles-ci étant en majorité non cultivables.

Les prélèvements sont réalisés tous les 3 mois la première année, puis tous les 6 mois sur le topsoil stocké en andain ou étalé. Chaque série de prélèvements pour une période donnée comporte 20 échantillons de topsoil (5 modalités de profondeur et 4 répétitions)

L'étude des variations physico-chimiques (pH, conductivité, potentiel redox, spéciation des métaux, teneurs en éléments majeurs, caractérisation de la matière organique), des topsoils stockés sont décrites dans le volet 3.

3.2. TRAVAUX RÉALISÉS ET RÉSULTATS OBTENUS

3.2.1. TÂCHE 1 : CARACTÉRISATION ET CONSERVATION DE LA BANQUE DE GRAINES DES TOPSOILS

3.2.1.1. Sous-tâche 1 : Suivi des graines in situ

3.2.1.1.1. Une diversité spécifique modeste à partir des topsoils stockés :

Les germinations obtenues en serre à partir des topsoils montrent les résultats suivants en ce qui concerne la diversité d'espèces (Fig. 22) :

Pour le site de GORO, après trois ans de suivi (topsoil stocké n°2), 14 espèces ont fait l'objet de germinations en serre. Une espèce domine : *Gahnia novocaledonensis* ; suivie de 3 autres bien présentes : *Alphitonia neocaledonica, Polyscias* sp. et *Costularia comosa* (mais qu'au début pour cette espèce). Les autres espèces présentes en moindre quantité sont : *Dacrydium* sp., *Styphelia* sp., *Dracophyllum* sp., *Hibbertia pancheri*, *Comptonella* sp., *Solmsia calophylla, Dodonaea viscosa, Myodocarpus* sp., *Eriaxis rigida* et *Sannantha leratii*.

Le premier topsoil stocké (n°1) avait permis de relever 17 espèces (malheureusement le suivi a dû être abandonné, ce topsoil stocké ayant été écrasé et en partie prélevé par des engins d'un sous-traitant).

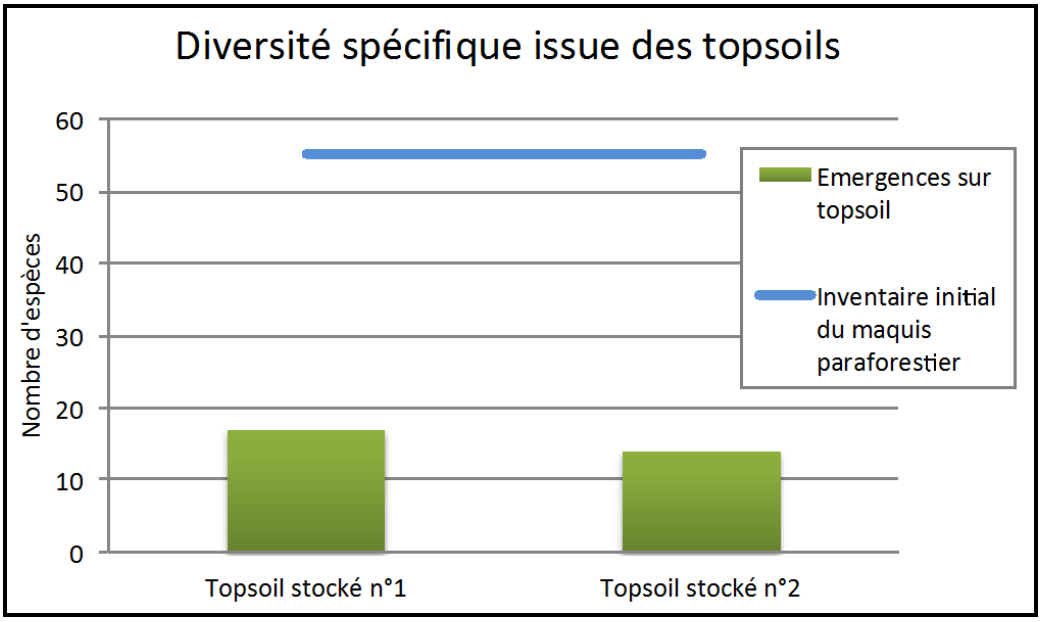


Figure 22 :Nombre d'espèces identifiées à partir des germinations (émergences) obtenues à partir des topsoils, après 36 mois d'observations (site de Goro).

Ces diversités spécifiques relevées à partir des germinations sont à comparer à la diversité spécifique de l'inventaire du maquis paraforestier au sein duquel le topsoil étudié a été prélevé (Tab. 2). Cet inventaire floristique initial avait permis de relever 55 espèces au sein de ce maquis sur une surface de 400 m^2. Ainsi, 75% des espèces relevées au départ ne sont pas retrouvées dans les germinations issues du topsoil. Ceci peut s'expliquer soit par une absence de graines viables de ces espèces dans le topsoil au moment de son prélèvement, soit par une perte rapide de viabilité de ces graines lors de la manipulation et le stockage du topsoil, soit encore par des graines qui avaient déjà germé *in situ* (le cas pour *Gymnostoma deplancheanum*, un nombre important de plantules avaient été observées lors de l'inventaire initial au sein du maquis). Ces taux sont similaires à ceux déjà observés par le passé sur ces types de sol (L'Huillier 2007).

Pour le site de Tontouta, après deux ans de suivi, assez peu d'émergences ont été observées en serre, au total 6 espèces : essentiellement des Cypéracées (4 espèces : *Costularia comosa, C. nervosa, Lepidosperma perteres, Machaerina deplanchei*), *Alphitonia neocaledonica* et *Sannantha leratii*. L'espèce dominante est *Lepidosperma perteres*, suivi de *Costularia comosa* et *Machaerina deplanchei*.

Tableau 2 : Comparaison entre l'inventaire floristique et la dynamique germinative des topsoils.

Inventaire floristique initial de la zone de prélèvement du topsoil de Goro (réalisé le 5 mai 2010) Description: Sol ferrallitique ferritique sur cuirasse démantelée. Sol nu: 0%. Litière: recouvrement 100%, épaisseur 5-10 cm. Altitude: 220 m. Pente: 5°. Coord GPS (WGS 84) : Long: 166.944, Lat: -22.297							**Suivi des germinations**		
							Relevés topsoil stocké 1*	**Relevés topsoil stocké 2***	**Relevés terrines en serre**
Famille	**Genre**	**Espèce**	**Indice Braun-Blanquet**	**Plantules***	**Unité de végétation**	**Statut**	**Plantules ****		
Apocynaceae	*Alstonia*	*coriacea*	1		FM	E			
Apocynaceae	*Alyxia*	*tisserantii*	r		FM	E			
Apocynaceae	*Pagiantha*	*cerifera*	1		FM	E			
Apocynaceae	*Parsonsia*	*edulis*	r		F	E			
Apocynaceae	*Parsonsia*	*flexuosa*	r		FM	E			
Aquifoliaceae	*Ilex*	*sebertii*	1		FM	E			
Araliaceae	*Polyscias*	*pancheri*	1	xx	M	E	x ?	x	xx
Asparagaceae	*Lomandra*	*insularis*	2	x	M	E			
Bignoniaceae	*Deplanchea*	*speciosa*	r		FM	E			
Casuarinaceae	*Gymnostom*	*deplancheanu*	3	xxx	M	E	X		
Cladoniaceae	*Cladonia*	*agregata*	r		M				
Clusiaceae	*Garcinia*	*balansae*	2	x	FM	E	x ?		
Clusiaceae	*Garcinia*	*neglecta*	r		FLM	E	x ?		
Cunoniaceae	*Codia*	*spatulata*	1		FM	G			
Cunoniaceae	*Pancheria*	*billardieri*	r		MN	G	x ?		
Cyperaceae	*Costularia*	*comosa*	/	/	MR	E	x ?	x	xx
Cyperaceae	*Gahnia*	*novocaledonens*	r		MR	E	xxx	xx	xxx
Cyperaceae	*Machaerina*	*deplanchei*	/	/	MN	E	X		
Dilleniaceae	*Hibbertia*	*pancheri*	2	xx	FM	E	X		x
Ebenaceae	*Diospyros*	*parviflora*	r		FLM	E			
Ericaceae	*Dracophyllum*	sp.	/	/		E			x
Ericaceae	*Styphelia*	*pancheri*	1		FM	E	x ?		x
Flagellariaceae	*Flagellaria*	*neocaledonica*	1		FMR	A	x ?		
Lauraceae	*Cryptocarya*	*quillauminii*	1		F	E			
Lindsaeaceae	*Lindsaea*	*nervosa*	r		F	E			
Meliaceae	*Dysoxylum*	*canalense*	×		FM	E			
Myodocarpacea	*Myodocarpu*	sp.	/	/					x
Myrtaceae	*Austromyrtu*	sp.	1			E			
Myrtaceae	*Eugenia*	*hurlimannii*	×		FM	E			
Myrtaceae	*Eugenia*	*stricta*	1		M	E			
Myrtaceae	*Sannantha*	sp.	/	/	MR	E			x
Myrtaceae	*Syzygium*	*macranthum*	2		F	E			
Myrtaceae	*Syzygium*	*wagapense*	2	xx	FM	E			
Orchidaceae	*Dendrobium*	*fractiflexum*	r		F	E			
Orchidaceae	*Eriaxis*	*rigida*	/	/	MR	E	x ?	x	x
Phyllanthaceae	*Phyllanthus*	*carlottae*	2		F	E			
Phyllanthaceae	*Phyllanthus*	*pronyensis*	r		FM	E			
Pittosporaceae	*Pittosporum*	*deplanchei*	r		FM	E			
Pittosporaceae	*Pittosporum*	sp.	r						
Podocarpaceae	*Dacrydium*	*araucarioides*	1	x	M	E	X		x
Primulaceae	*Rapanea*	*asymmetrica*	2		FM	E			
Proteaceae	*Stenocarpus*	*trinervis*	1		FM	E			
Rhamnaceae	*Alphitonia*	*neocaledonica*	1		FLM	E	xxx	xx	xx
Rubiaceae	*Gardenia*	*aubryi*	1		FM	E	x ?		
Rubiaceae	*Ixora*	*francii*	r		M	E			
Rubiaceae	*Psychotria*	*semperflorens*	r		FLM	E			
Rubiaceae	*Tarenna*	*hexamera*	r		M	E			
Rutaceae	*Comptonella*	sp.	/	/					x
Rutaceae	*Halfordia*	*kendac*	1		FLM	A			
Salicaceae	*Casearia*	*silvana*	r		FLM	E			
Sapindaceae	*Dodonaea*	*viscosa*	/	/	LM	A			x
Sapindaceae	*Guioa*	*villosa*	r		FM	E			
Sapotaceae	*Beccariella*	*azou*	2		M	E			
Sapotaceae	*Beccariella*	*baueri*	2		FM	E			
Schizaeaceae	*Schizaea*	*dichotoma*	r		FM	A			
Smilacaceae	*Smilax*	sp.	r		FM	E	x ?		
Thymelaeaceae	*Lethedon*	*tannensis*	r		FLM	E			
Thymelaeaceae	*Solmsia*	*calophylla*	2		FM	G			x
Thymelaeaceae	*Wickstroemi*	*indica*	r		FLM	A			
Xanthorrhoeace	*Dianella*	sp.	r						

* Topsoil stocké 1 : déposé frais en tas de 2 m de haut ; abandonné pour le suivi (roulage dessus et prélèvement par des sous-traitants).

* Topsoil stocké 2 : topsoil déposé frais en tas de 2 m de haut ; suivi étroit (années 2011 à 2014).

** Plantules : xxx nombreux ; xx : moyennement nombreux ; x : peu nombreux ; x ? : Détermination non confirmée au niveau espèce. F : forêt dense humide ; M : maquis ; L : forêt sclérophylle ; N : fourrés secondaires ; R : végétation des zones humides.

Ces diversités spécifiques relevées à partir des germinations sont à comparer à la diversité spécifique de l'inventaire du maquis paraforestier au sein duquel le topsoil étudié a été prélevé. Cet inventaire floristique initial avait permis de relever 55 espèces au sein de ce maquis sur une surface de 400 m^2 (cf. la liste dans le rapport 2011). Ainsi, 75% des espèces relevées au départ ne sont pas retrouvées dans les germinations issues du topsoil. Ceci peut s'expliquer soit par une absence de graines viables de ces espèces dans le topsoil au moment de son prélèvement, soit par une perte rapide de viabilité de ces graines lors de la manipulation et le stockage du topsoil, soit encore par des graines qui avaient déjà germé *in situ* (le cas pour *Gymnostoma deplancheanum*, un nombre important de plantules avaient été observées lors de l'inventaire initial au sein du maquis). Ces taux sont similaires à ceux déjà observés par le passé sur ces types de sol (L'Huillier 2007).

Pour le site de Tontouta, après deux ans de suivi, assez peu d'émergences ont été observées en serre, au total 6 espèces : essentiellement des Cypéracées (4 espèces : *Costularia comosa, C. nervosa, Lepidosperma perteres, Machaerina deplanchei*), *Alphitonia neocaledonica* et *Sannantha leratii*. L'espèce dominante est *Lepidosperma perteres*, suivi de *Costularia comosa* et *Machaerina deplanchei*.

3.2.1.1.2. Une densité de germinations assez faible à partir des topsoils stockés

Entre 5 et 25 germinations par m^2 ont été observées à partir du topsoil stocké de Goro (Fig. 23), ce qui représente des densités plutôt faibles. En effet, des taux précédemment observés sur des topsoils de la même zone ont montré des densités entre 20 et 150 germinations/m^2 (L'Huillier 2007 ; Goxe 2010). Ce topsoil mis en stock semble donc de qualité médiocre au regard de la quantité de graines viables qu'il contient.

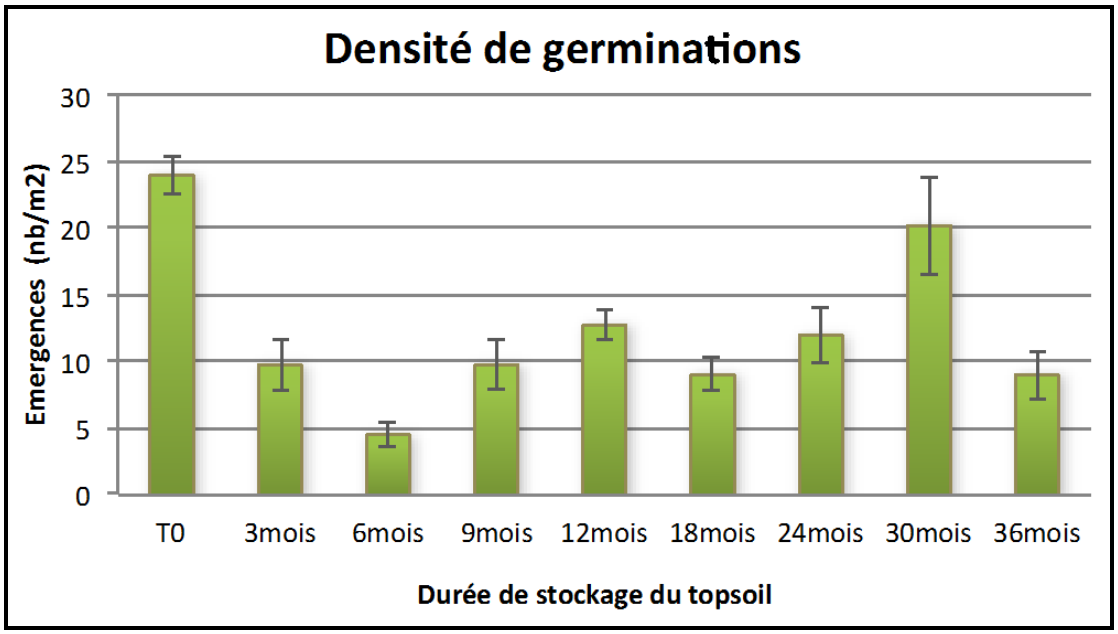


Figure 23 : Densité de germination (émergences) en fonction de la durée de stockage du topsoil, après 12 mois de suivi en serre (moyenne de 20 terrines par date, toute épaisseur confondue) (site de Goro).

Sur le topsoil de Tontouta, les densités varient de 1 à 8 germinations par m^2, ce qui est encore plus faible. La qualité de ce topsoil concernant la quantité de graines viables contenues est donc très médiocre. Il est probable que le prélèvement ait été réalisé sur une épaisseur trop importante, ayant causé une dilution des graines contenues en surface du sol. La date de prélèvement est aussi un facteur qui a pu avoir un effet (voir plus loin, effet saison).

A ce stade, il semble donc que le choix initial du topsoil, le soin apporté dans le prélèvement (épaisseur réduite), voire la date de prélèvement soient déjà des points fondamentaux.

3.2.1.1.3. Un pouvoir séminal assez bien conservé au cours du temps de stockage

Le nombre de germinations par m^2 semble diminuer légèrement au cours du temps de stockage du topsoil, bien que cela semble plutôt variable (Fig. 23) : sur le site de Goro à T0 ce nombre est de 24, il semble diminuer ensuite au cours du temps pour se situer autour de 5 à 15 au delà de quelques mois de stockage. Toutefois à 30 mois on observe une remontée avec 20 germinations/m^2, ce qui indique une variation importante au cours des 36 mois de stockage, qui semble liée à une variation annuelle. Les explications de ces variations sont potentiellement liées à des dormances, qui seraient levées annuellement lors de conditions climatiques plus favorables : on constate en effet les germinations les plus élevées à T0, T12 puis autour de T24-T30mois, soit quasiment tout les ans à chaque saison chaude. Cette variation semble donc indiquer un potentiel de graines dormantes prêtes à germer même après 3 ans de stockage (il aurait été intéressant de poursuivre cette observation sur plus de 3 ans pour confirmer cette observation).

En observant plus en détail ce même graphique, mais en distinguant les types de graines en deux catégories, dormantes et non dormantes (Fig. 24), on constate que les graines non dormantes ont émergé essentiellement à T0 (*Costularia comosa* dans le cas du site de Goro). Par contre, s'agissant des graines dormantes, elles montrent une capacité à résister au stockage, puisque le nombre d'émergences ne semble pas diminuer en 36 mois de stockage. La variation observée semble correspondre à une réponse annuelle, avec davantage d'émergences en saison chaude et moins en saison fraiche, en accord avec l'hypothèse évoquée au paragraphe précédent sur des levées de dormance surtout en saison plus chaude et humide.

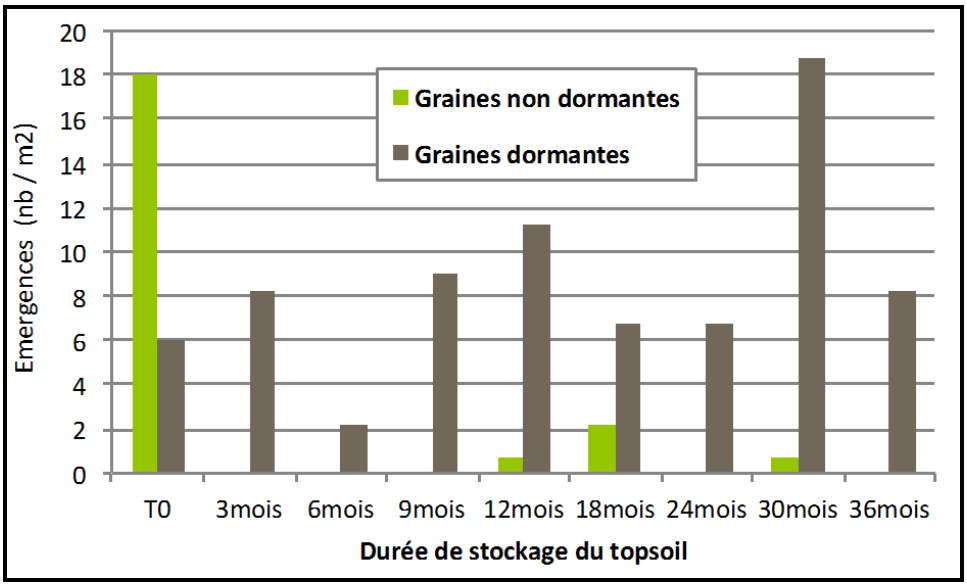


Figure 24 : Densité de germination en fonction du temps de stockage du topsoil, et selon le type de semences (non dormantes / dormantes) (site de Goro) (nombre d'émergences après 12 mois de suivi en serre, moyenne de 20 terrines par date, toute épaisseur confondue).

La même tendance est observée sur le site de Tontouta : pas de baisse au cours du temps des 24 mois de stockage. Toutefois le nombre d'émergences est faible, et ne permet pas de statuer de manière robuste sur une éventuelle évolution au cours du temps du pouvoir séminal. Il semble toutefois, qu'à la faveur de conditions plus sèches sur ce site, des graines orthodoxes (ex. *Costularia comosa* essentiellement, *Sannantha leratii*) peuvent encore germer après 24 mois de stockage, bien qu'elles ne présentent pas de dormance.

3.2.1.1.4. Des germination et conservations de graines variables selon les espèces du topsoil stocké

Les suivis montrent des comportements nettement différents en fonction des espèces (Fig. 25).

Ainsi sur le site de Goro, *Costularia comosa* fait l'objet de nombreuses germinations au départ (à T0), puis semble perdre toute capacité à germer rapidement après seulement 3 mois de stockage du topsoil. Cela s'explique probablement par l'absence de dormance de ces graines (L'Huillier et al. 2010), conjuguée aux conditions environnementales du site de Goro : ainsi avec des conditions favorables d'humidité et de température rencontrées sur ce site, la majorité des graines de cette espèce ont vraisemblablement germé rapidement en quelques semaines, épuisant rapidement le stock.

Au contraire *Gahnia novocaledonensis, Alphitonia neocaledonica, Polyscias* sp. et *Styphelia* sp. montrent une capacité à germer encore 30 et 36 mois après la mise en stockage du topsoil (Fig. 25). D'autres espèces à graines dormantes apparaissent également après plusieurs mois de stockage (*Hibbertia pancheri*, …). Dans ce cas cette observation peut être expliquée par la présence de dormances existantes chez ces graines : les graines d'*Alphitonia neocaledonica* possèdent une dormance physique (L'Huillier et al. 2010 ; Zongo et al. in rev.), leur conférant une capacité à résister pendant plusieurs mois à une dégradation des téguments. Celles de *Gahnia novocaledonensis* présentent probablement une dormance physiologique (comme celle d'une autre espèce du même genre, *Gahnia aspera* (Zongo 2010) ainsi que très certainement *Polyscias* sp., tandis que *Styphelia* sp. semble présenter une dormance morphologique (Wulff et al. 2012).

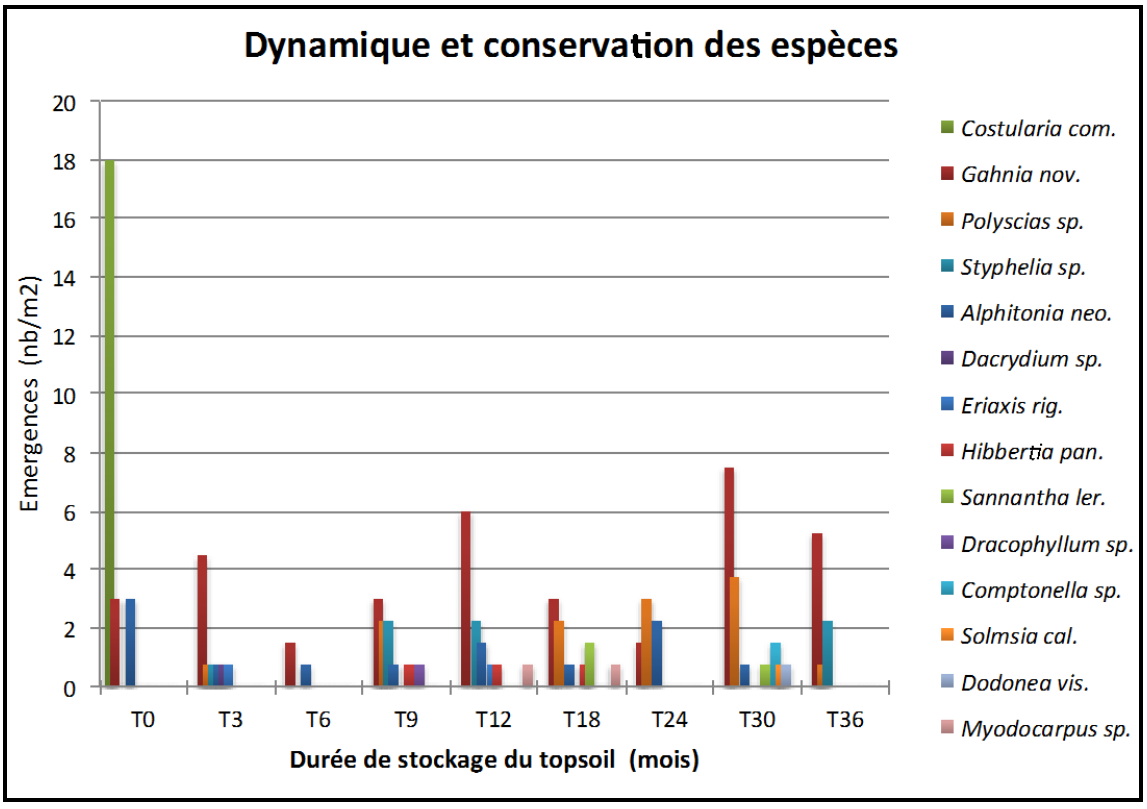


Figure 25 : Germinations (émergences) des différentes espèces (celles identifiées) en fonction de la durée de stockage du topsoil (en mois). Résultats après 12 mois de suivi en serre, toute épaisseur confondue (site de Goro).

3.2.1.1.5. Une conservation des graines peu influencée par l'épaisseur de stockage du topsoil

Le suivi des germinations selon l'épaisseur du stockage ne montre pas de tendance particulière (Fig. 26) : sur le site de Goro, les valeurs varient autour de 100 émergences/m^2, que ce soit en surface ou en profondeur jusqu'à 150 cm. Le suivi jusqu'à T+18mois semblait indiquer une baisse significative des germinations avec la profondeur de stockage (80 émergences/m^2 en surface, 60 à 150 cm). Pourtant en poursuivant les observations dans le temps, on constate qu'aux trois dates suivantes (T24, 30 et 36 mois) il n'y a pas de différences entre les différentes profondeurs.

Ce sont essentiellement les graines dormantes de *Gahnia novocaledonensis*, ainsi que *Alphitonia neocaledonica*, *Styphelia* sp. et *Polyscias* sp. qui montrent un maintien de leur pouvoir germinatif en fonction du temps et de l'épaisseur (Fig. 25), et qui permettent d'expliquer l'absence de baisse significative de la totalité des germinations selon la profondeur.

S'agissant des graines non dormantes il n'a pas été possible de voir une évolution significative : *Costularia comosa* a entièrement germé à T0 (plus d'émergences par la suite), et d'autres graines non dormantes sont apparues plus tardivement (*Sannantha leratii* à 18 mois, *Myodocarpus* sp. à 12 et 18 mois) ce qui indique la capacité de maintien également pour certaines de ces semences lorsque les conditions de germination ne sont pas réunies (humidité suffisante en particulier).

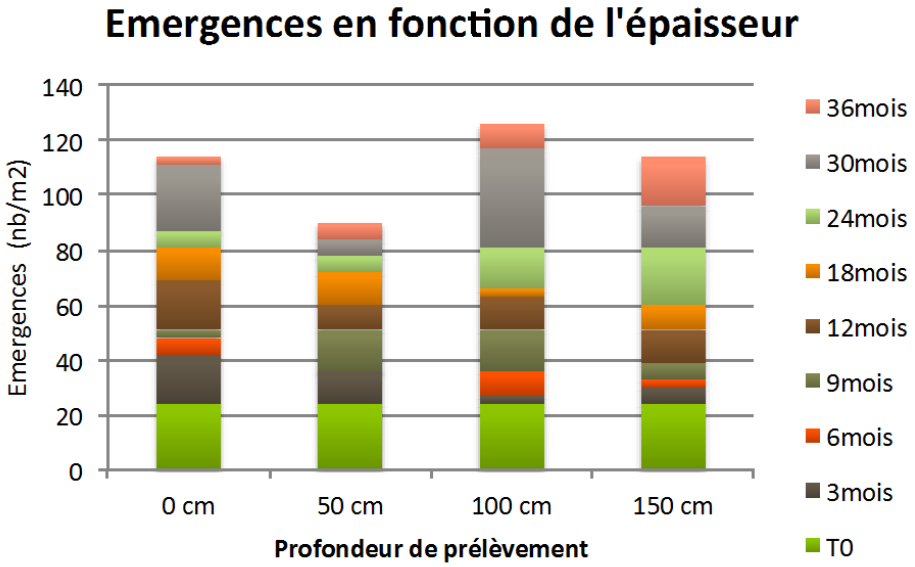


Figure 26 : Nombre cumulé d'émergences en fonction de la profondeur de prélèvement (épaisseur) du topsoil stocké, et en fonction de la durée de stockage. Résultats de 12 mois de suivi en serre (moyenne de 5 terrines par date et pour chaque épaisseur).

3.2.1.2. Sous-tâche 2 : Conservation en conditions contrôlées ex-situ des semences par études de leurs caractéristiques propres

3.2.1.2.1. Structure et composition des graines

Les structures externes, les compositions en métabolites primaires, le caractère orthodoxe/récalcitrant et les dormances des 4 espèces ont été étudiées sur des lots frais homogènes qui ont été utilisées pour l'ensemble des expérimentations. Ainsi les données obtenues dans ce cadre sont essentielles afin d'appréhender les réponses des graines dans les expériences de conservation, de vieillissement accéléré, de germination en condition contrôlées mais aussi après enfouissement.

Toutes ces graines semblent présenter un caractère orthodoxe (Tab. 3, Fig. 27).

La proportion de lipides neutres est assez importante quelle que soit l'espèce concernée. Ces derniers semblent constituer un mode de stockage de réserves énergétiques important pour les espèces de maquis miniers. A noter la proportion importante de glucides hydrosolubles chez *G. deplancheanum* et *S. cylindrica* et la prédominance des protéines chez *A. neocaledonica*.

Tableau 3 : Caractéristiques morphologiques et physiologiques des graines retenues pour l'étude CNRT-Biotop

Famille	**Casuarinaceae**	**Cyperaceae**	**Goodeniaceae**	**Rhamnaceae**
Genre/espèce	*Gymnostoma deplancheanum*	*Machaerina deplanchei*	*Scaevola cylindrica*	*Alphitonia neocaledonica*
Type de fruit	Capsule déhiscent	Achène	Baie	Poly-drupe
masse des semences (graines ou fruits/g)	380 (± 20)	362 (± 7)	30 (+/-1)	44 (± 2)
Tégument	Mince	Epais	Epais	Epais
Dissémination potentielle	Anémochorie (aile)	Barochorie et hydrochorie	Zoochorie	Barochorie et zoochorie ?
Albuminée ou Exalbuminée	Exalbuminée	Albuminée	Albuminée	Albuminée
Embryon	Important	Peu important	Important	Important (80%)
Dormance	Non Dormante	Physiologique peu profonde	Physiologique profonde	Physique (et physiologique?)
Taux d'humidité (%)	8,54 (+/-0,36)	8,36 (+/-0,52)	11,85 (+/-0,26)	8,89 (+/-0,39)
Protéines totales (%)	5,19	15,36	9,46	15,5
Lipides neutres (%)	14,76	16,65	11,41	11,73
Glucides hydrosolubles (%)	15,1	1,95	15,31	1,36
Amidon (%)	ND	ND	ND	0,14

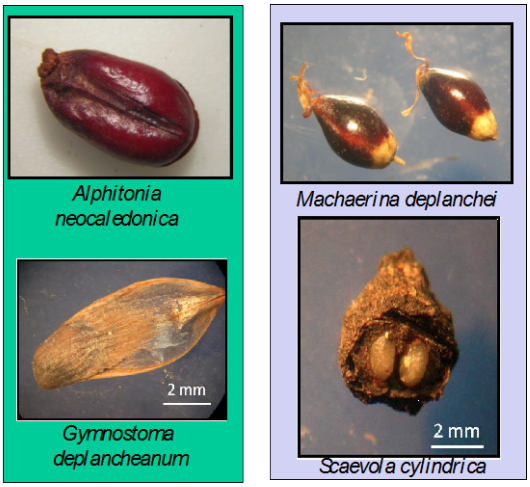


Figure 27 : Photos des graines/semences entières retenues pour cette étude

3.2.1.2.2. Mise en conservation en conditions contrôlées de température

Les 4 espèces sélectionnées ont été mises en conservation à des dates différentes selon la disponibilité des graines sur le terrain :

- *Alphitonia neocaledonica* depuis le 19 avril 2011

- *Gymnostoma deplancheanum* depuis le 06 mai 2011
- *Machaerina deplanchei* depuis le 20 mars 2012
- *Scaevola cylindrica* depuis le 18 juin 2012

L'analyse des résultats sur les graines conservées 30 mois pour *A. neocaledonica* et *G. deplancheanum* et 18 mois pour *M. deplanchei* montre des tendances différentes selon l'espèce considérée (Fig. 28).

Ainsi, quelle que soit la température de conservation, *A. neocaledonica* a tendance à se maintenir avec une humidité relative de 12% (Figs. 28B, D, F) avec des taux de germination proches de 60 à 70%.

A contrario, la germination des graines de cette espèce pour une même température (Fig. 18) est plus affectée à une humidité relative de 5% qu'une humidité de 12%. Ainsi pour exemple à 4°C le taux maximal de germination obtenu après 30 mois de suivi est de 63% avec un taux d'humidité de 12% contre seulement 8% avec un taux d'humidité de 5%.

Ces données montrent le caractère intermédiaire de ces graines dont une dessiccation trop poussée conduit à la perte de viabilité.

Concernant les graines de *G. deplancheanum*, ces dernières se conservent nettement mieux à une température basse de 4°C qu'aux températures de 15 et 25°C (Fig. 28). Ainsi à 25°C et pour une humidité relative de 12%, la germination est quasiment nulle après 2 mois de conservation (Fig. 28 F). Par contre, à cette même température, le fait d'abaisser le taux d'humidité relative permet de maintenir les graines aptes à germer pendant près de 24 mois avant une perte de viabilité. (Fig. 28E).

Ainsi, le meilleur moyen de conserver les graines de *G. deplancheanum* est à la température de 4°C et à 5% d'humidité relative avec un taux de germination estimé proche de 20% après 30 mois contre près de 28% lors de leur mise en conservation à T0 (Fig. 28A). Ceci reflète le caractère orthodoxe de ces graines

Concernant les graines de *M. deplanchei*, l'expérimentation a été menée avec des prélèvements allant jusqu'à 24 mois de conservation. Cependant, cette graine présentant une dormance physiologique, sa germination est étalée dans le temps. Pour bien appréhender le maximum de germination, il faut donc suivre cette germination jusqu'à obtenir une phase de plateau, c'est la raison pour laquelle le dernier temps représenté pour les graphiques de la figure 28 est le T18 ayant bénéficié de 12 mois de suivi en germination. On constate ainsi une très grande variabilité dans les taux de germination maximums, ne laissant pas apparaître une tendance aussi nette que pour les deux espèces précédentes. Il est ainsi surprenant de constater que des taux de germination maximums sont supérieurs à celui du témoin. Ce résultat peut-être lié au fait que des graines du témoin soient encore dormantes et pourraient potentiellement germer dans les mois à venir. En tout état de cause, après 18 mois de conservation, il semble que les graines aient maintenu une bonne capacité à germer quelle que soit la température ou le taux d'humidité relative considérés. On pourrait être tenté de penser qu'après 18 mois les graines germent mieux après avoir été conservées à 25°C or si l'on s'attache à observer le taux de viabilité des graines plutôt que le taux de germination, on constate que quelle que soit la température ou le taux d'humidité relative de conservation, les graines ont un taux de viabilité proche de l'ordre de 65% en moyenne (Fig. 29). Cela confirme l'effet de la dormance sur les taux de germination obtenus et que des graines ont encore la capacité de germer. Il semblerait également que la faible humidité relative a pour conséquence de mettre les graines dans une dormance plus profonde quelle que soit la température considérée.

Enfin, il est à noter qu'un phénomène périodique s'exprime au niveau des taux de germination laissant penser que les graines possèdent une horloge interne fixant une période de levée de dormance alternant avec un retour en dormance. On pourrait s'étonner de la présence de ce phénomène périodique au niveau de la viabilité des graines (Fig. 29), mais il nous semble que ceci peut être attribué à un phénomène de vie ralentie qui abaisse les activités métaboliques dont

la respiration qui est mise en évidence par le test au chlorure de tetrazolium et de fait la coloration étant faible voire non visible, cela a du nous conduire à classer certaines graines comme non viables alors qu'elles l'étaient. Ce phénomène n'a jamais été décrit à ce jour chez aucune espèce dans des conditions contrôlées de conservation mais est connu dans des conditions naturelles (cf sous-tâche 1.3).

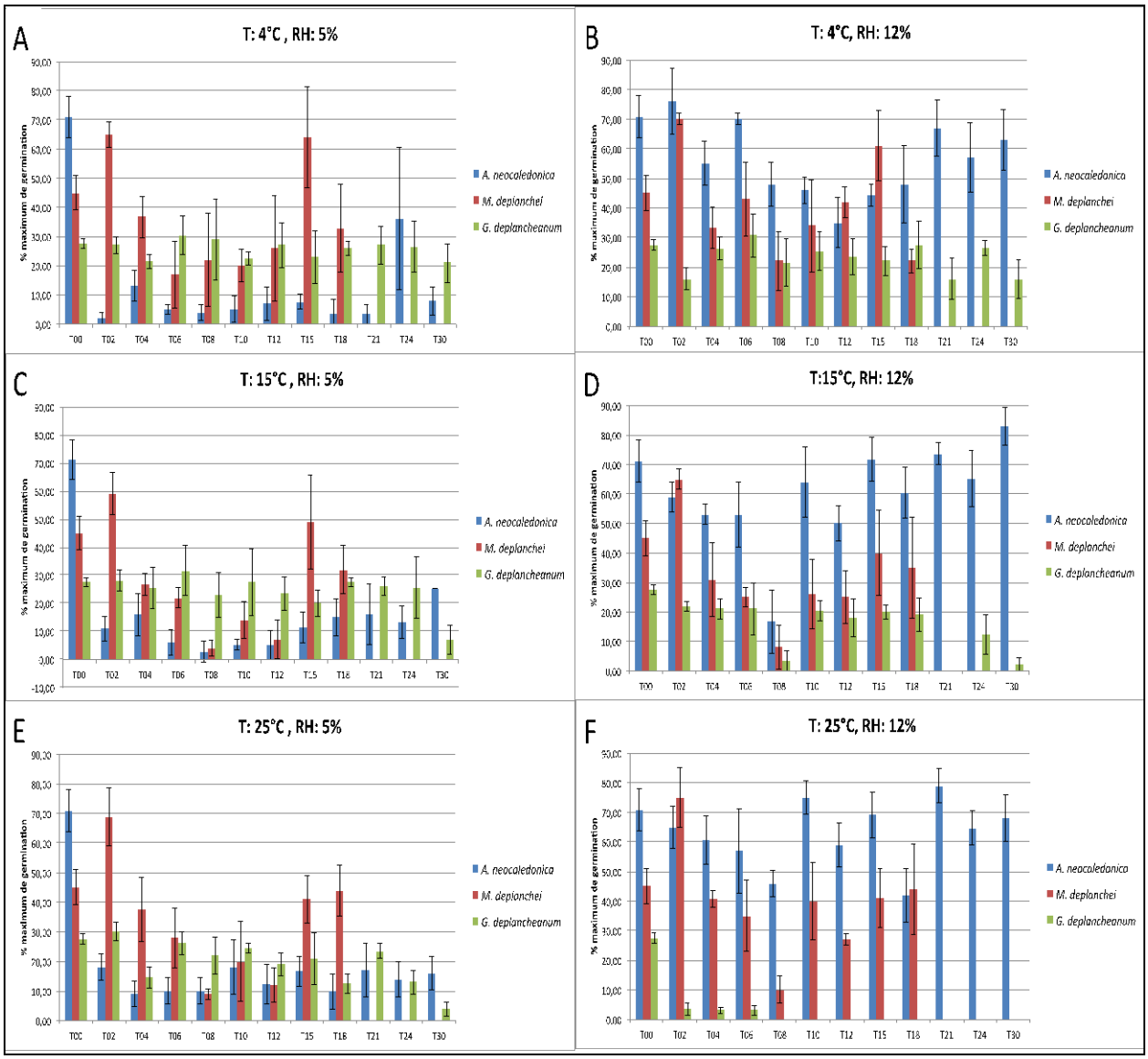


Figure 28 : Pourcentages maximums de germination obtenus au cours du temps après 30 mois de suivi pour des graines d'*A. neocaledonica* (bleu) et *G. deplancheanum* (vert) et après 18 mois de suivi pour des graines de *M. deplanchei* (rouge) après conservation dans des conditions de température et d'humidité relative différentes. Dans le titre des graphiques : T°= Température de conservation, RH : Humidité relative de conservation.

Concernant les graines de *S. cylindrica*, leur dormance physiologique très profonde ne nous a pas permis d'obtenir et ce après plusieurs mois de suivi (jusqu'à 24 mois de mise en germination pour les plus anciennes) un nombre significatif de germinations, 1 ou 2 graines germées maximum par traitement. Nous avons donc décidé de baser notre analyse sur le taux de viabilité des graines au cours de leur conservation. Le résultat montre en effet que quelle que soit la température ou l'humidité, les graines conservent leur capacité germinative à des taux proches de ceux des graines fraîches de l'ordre de 55% pour notre lot (Fig. 30). Il semble y avoir une légère perte de viabilité pour des graines conservées en présence de silice (RH: 4%) mais rien de significatif après 24 mois. On peut donc penser que les graines viables restent après 24 mois de conservation, vivantes, aptes à germer mais la conservation n'a aucun effet sur la levée de dormance.

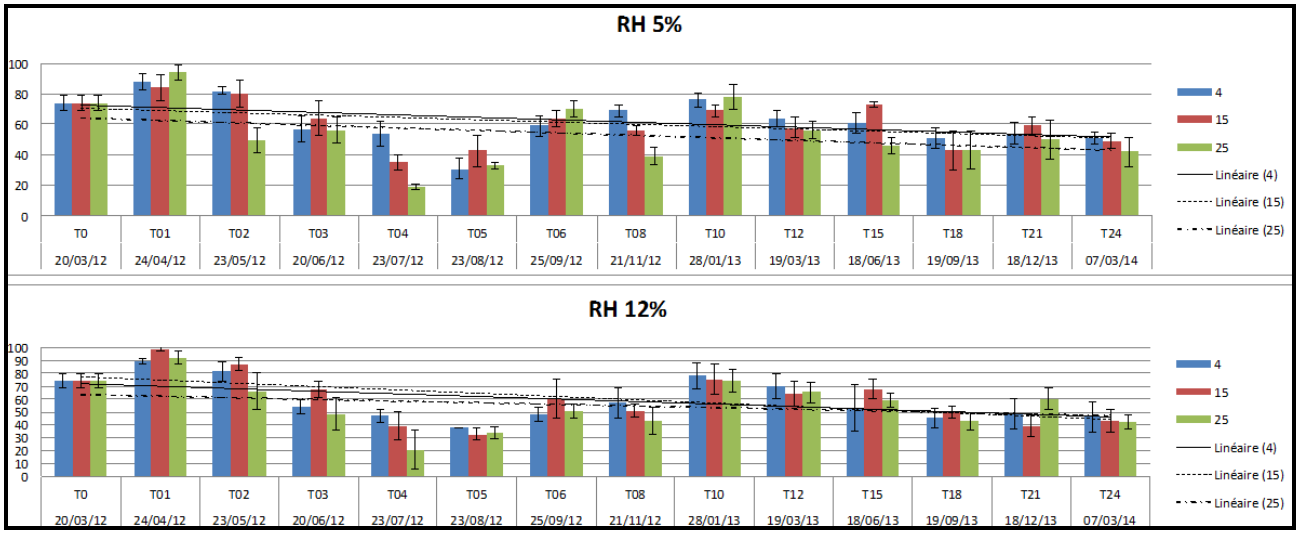


Figure 29 : Taux de viabilité des graines de M. deplanchei obtenus au cours du temps après conservation dans des conditions de température et d'humidité relative différentes. Dans le titre des graphiques : RH : Humidité relative de conservation.

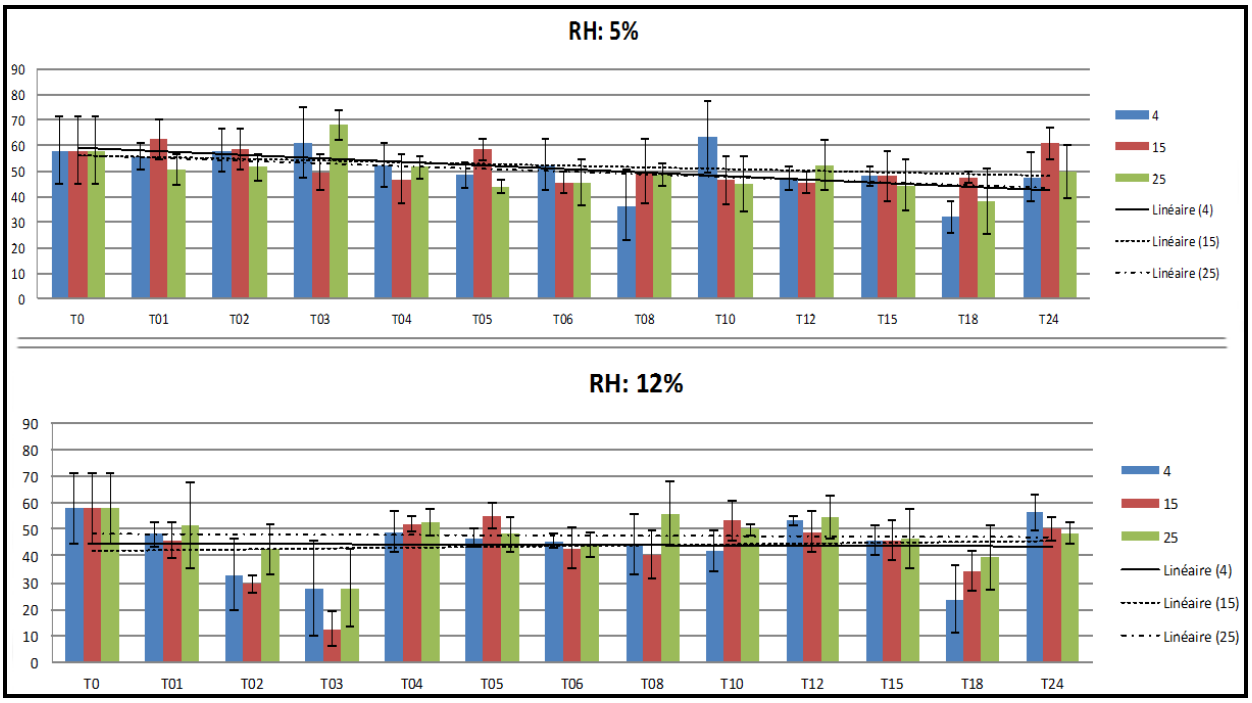


Figure 30 : Taux de viabilité des graines de *S. cylindrica* obtenus au cours du temps après conservation dans des conditions de température et d'humidité relative différentes. Dans le titre des graphiques : RH : Humidité relative de conservation.

3.2.1.2.3. Vieillissement accéléré

Cette expérimentation avait pour objectif d'évaluer dans des conditions extrêmes la capacité de survie des graines au cours du temps. Même s'il est difficile de faire un lien direct entre les données de vieillissement accéléré et celles du terrain, il est tout de même intéressant d'évaluer par comparaison entre les espèces laquelle se maintiendra le plus longtemps en milieu naturel.

Les résultats montrent de manière très claire que les graines d'*A. neocaledonica* et de *M. deplanchei* ont une capacité de résistance beaucoup plus importante que *G. deplancheanum* (Fig. 31). En effet, les graines de cette dernière meurent toutes après 3 jours de traitement alors que celles d'*A. neocaledonica* présentent encore, après 20 jours d'expérimentation, une viabilité de près de 10% (contre près de 70% au début de l'expérimentation) et que celles de *M. deplanchei* présentent encore après 21 jours une viabilité de l'ordre de 35% (contre près de 70% au début de l'expérimentation). Ces données sont à relier avec la structure de ces graines en particulier la présence d'un tégument épais pour *A. neocaledonica* et *M. deplanchei* qui réduit l'impact du vieillissement, ainsi qu'avec la composition en réserves séminales. Ainsi, il est admis qu'une graine riche en lipides eux même composés d'acide gras insaturés est plus sensible (Rowena et al. 2008).

Concernant l'espèce *S. cylindrica*, leur dormance profonde a eu pour conséquence de n'observer qu'un faible taux de germination malgré 2 années de suivi (Fig. 32). Par contre, l'étude de la viabilité montre qu'après 17 jours de vieillissement accéléré, le taux est maintenu à une valeur importante quasi équivalente au témoin mais dès 21 jours, ce taux chute fortement.

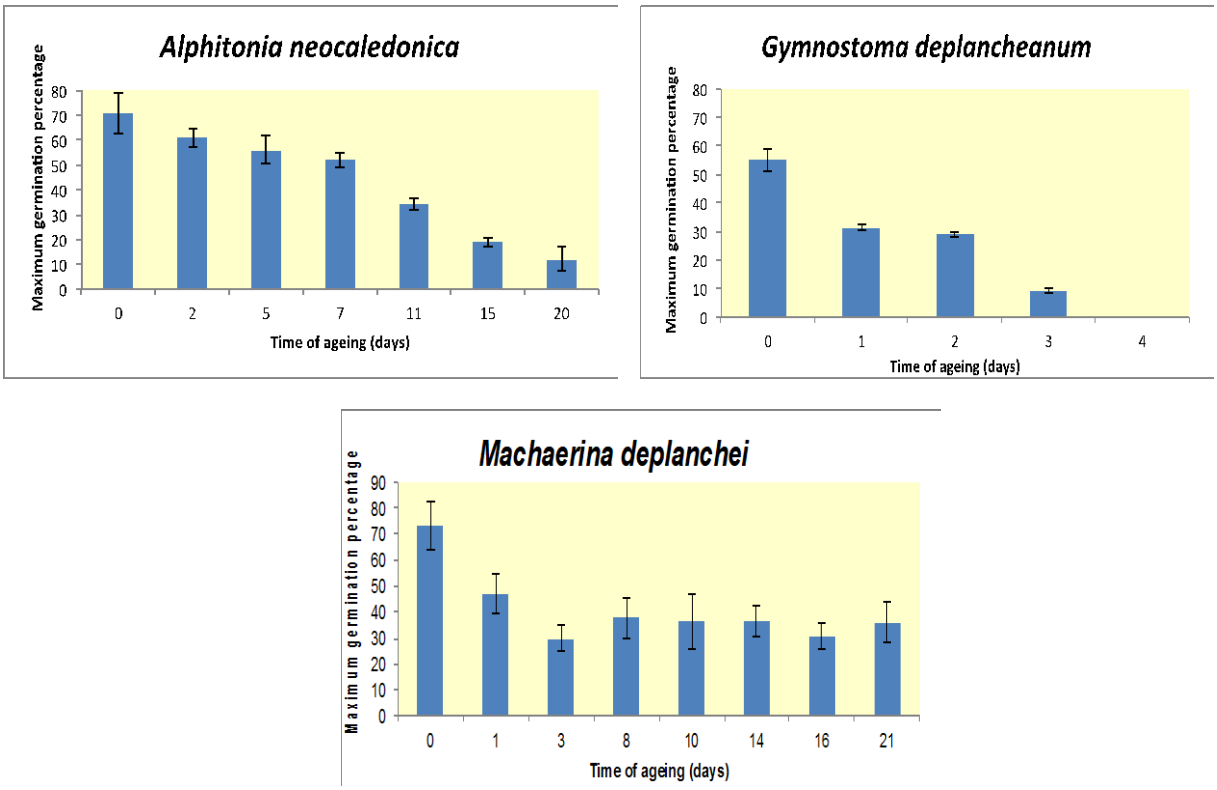


Figure 31 : Pourcentages de germination maximums obtenus pour les graines de *G. deplancheanum*, d'*A. neocaledonica* et de *M. deplanchei* exposées pendant un temps plus ou moins long à un vieillissement accéléré (45°C, 100HR).

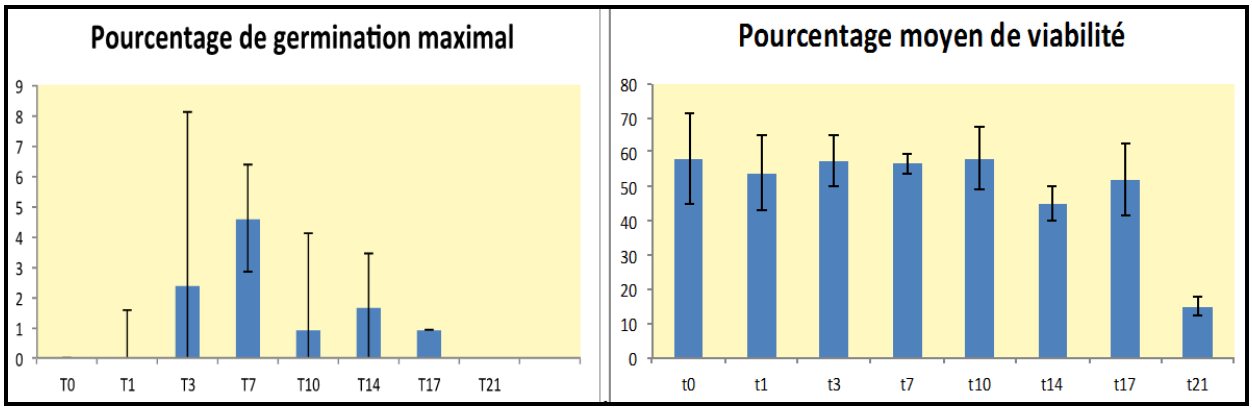


Figure 32 : Pourcentages de germination maximums (pour 100 fruits) et taux moyen de viabilité obtenus pour les graines de *S. cylindrica* exposées pendant un temps plus ou moins long à un vieillissement accéléré (45°C, 100HR).

3.2.1.3. Sous-tâche 3 : Etude de la longévité des graines in-situ.

Les résultats obtenus sur la longévité des graines *in-situ* montrent une variété de réponses différentes selon la graine considérée et le type de dormance qui les caractérise.

Ainsi, dans le cas de *G. deplancheanum* une germination de l'ensemble des graines a eu lieu dès les deux premiers mois, au sein des sachets. Ceci est du essentiellement au fait que ces graines sont non dormantes de par leur structure qui présente un tégument fin perméable à l'eau et un embryon de grande taille (Fig. 33). Ainsi, si les conditions de germination sont réunies, ces dernières germent très rapidement (entre 5 et 40 jours en conditions contrôlées de laboratoire à 25°C sous lumière continue ; Fig. 33). Ainsi, les conditions d'humidité et de température de la zone d'expérimentation au moment de l'enfouissement au mois de février ont favorisé leur germination. Au delà de ces deux mois, plus aucun suivi n'a donc été effectué.

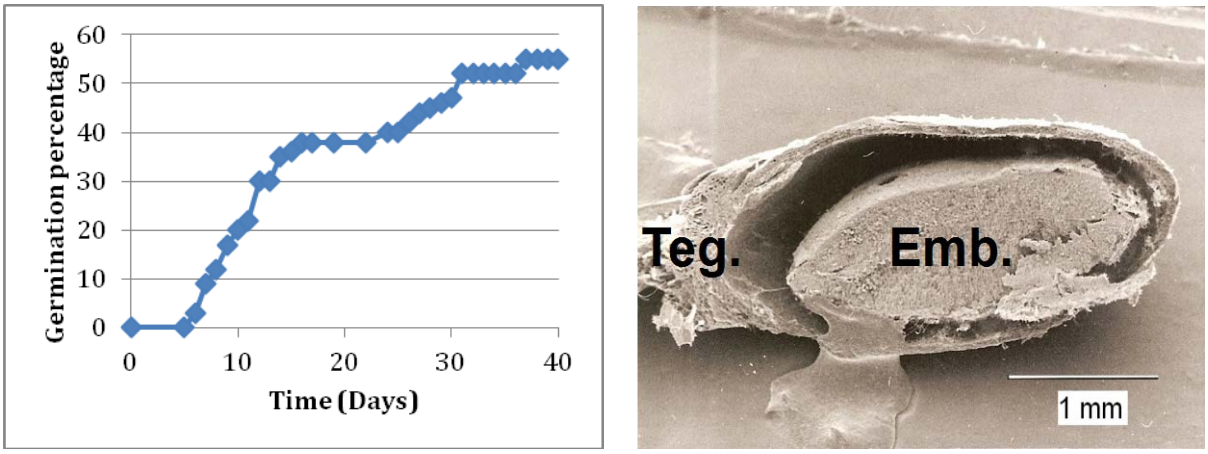


Figure 33 : Germination cumulée à 25°C sous lumière continue et coupe longitudinale de graines de *G. deplancheanum* (Teg : Tégument ; Emb : Embryon).

A l'inverse dans le cas d'*A. neocaledonica*, le suivi a été effectué pendant une période de 30 mois. Il est important de rappeler que cette espèce était connue pour sa dormance physique (imperméabilité à l'eau) comme le montre la figure 34 et qu'une dormance physiologique était suspectée. Afin de rendre possible le suivi de la capacité germinative de ces graines, nous avons donc décidé de les scarifier après les avoir récupéré afin de s'épargner le problème de la dormance physique.

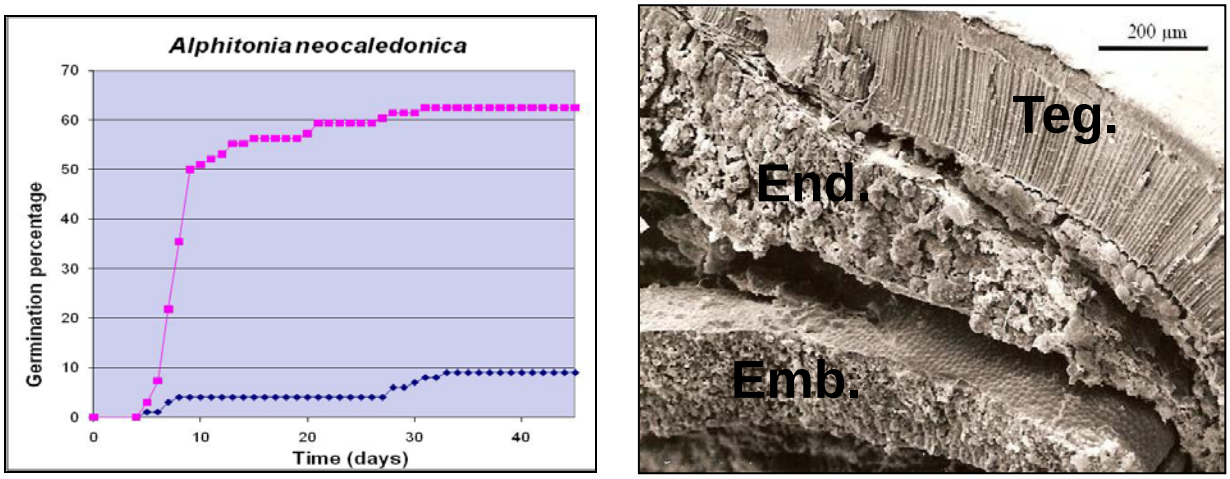


Figure 34 : Germination cumulée à 25°C sous lumière continue de graines scarifiées (■) ou non (♦) et coupe longitudinale de graines d'*A. neocaledonica* (Teg : Tégument ; Emb : Embryon ; End : Albumen).

L'analyse des données indique que globalement la capacité germinative des graines est peu affectée quelle que soit la profondeur d'enfouissement (Fig. 35) et ce après même 30 mois. Cette réponse est à relier avec l'épaisseur du tégument qui confère une capacité de résistance dans le temps de ces graines à dormance physique. A l'inverse, on observe un effet sur la levée qui caractérise la capacité de la plantule à s'installer puisque pour des faibles profondeurs, cette capacité diminue au cours du temps pour les 10 premiers centimètres alors qu'à 50 cm celle-ci est toujours semblable après 30 mois. Ce phénomène est à relier au vieillissement qui a souvent pour effet de dégrader les réserves qui deviennent alors inutilisables par l'embryon qui n'a plus la « force » de s'installer. Ces phénomènes de vieillissement sont étroitement liés à des phénomènes d'oxydation (Black et al, 2006), ainsi l'accès à l'oxygène en lien avec la profondeur (compaction) a un impact évident.

Il est par ailleurs très intéressant de noter un phénomène périodique de levée de dormance puis de retour en dormance caractérisé par un maximum de germination variable selon la période de l'année. Ce phénomène périodique confirme la présence d'une dormance physiologique chez *A. neocaledonica*. Cette dernière présente donc au final une dormance physique combinée à une dormance physiologique peu profonde. Si l'on tente de relier ce phénomène périodique aux facteurs abiotiques, on constate que la température est l'élément qui permet de l'expliquer (Fig. 34), ce qui va dans le sens de ce qui a déjà été décrit par Fenner et Thompson (2005). Ainsi, la période fraîche et sèche étant moins favorable à la germination, la graine rentre en dormance pour lever ensuite cette dormance à l'entrée de la période chaude. Elle semble donc sensible aux variations de température au cours de l'année. Ce phénomène semble encore plus marqué au niveau de la levée. Ainsi cette période fraîche semble être encore moins favorable à l'installation de la plantule.

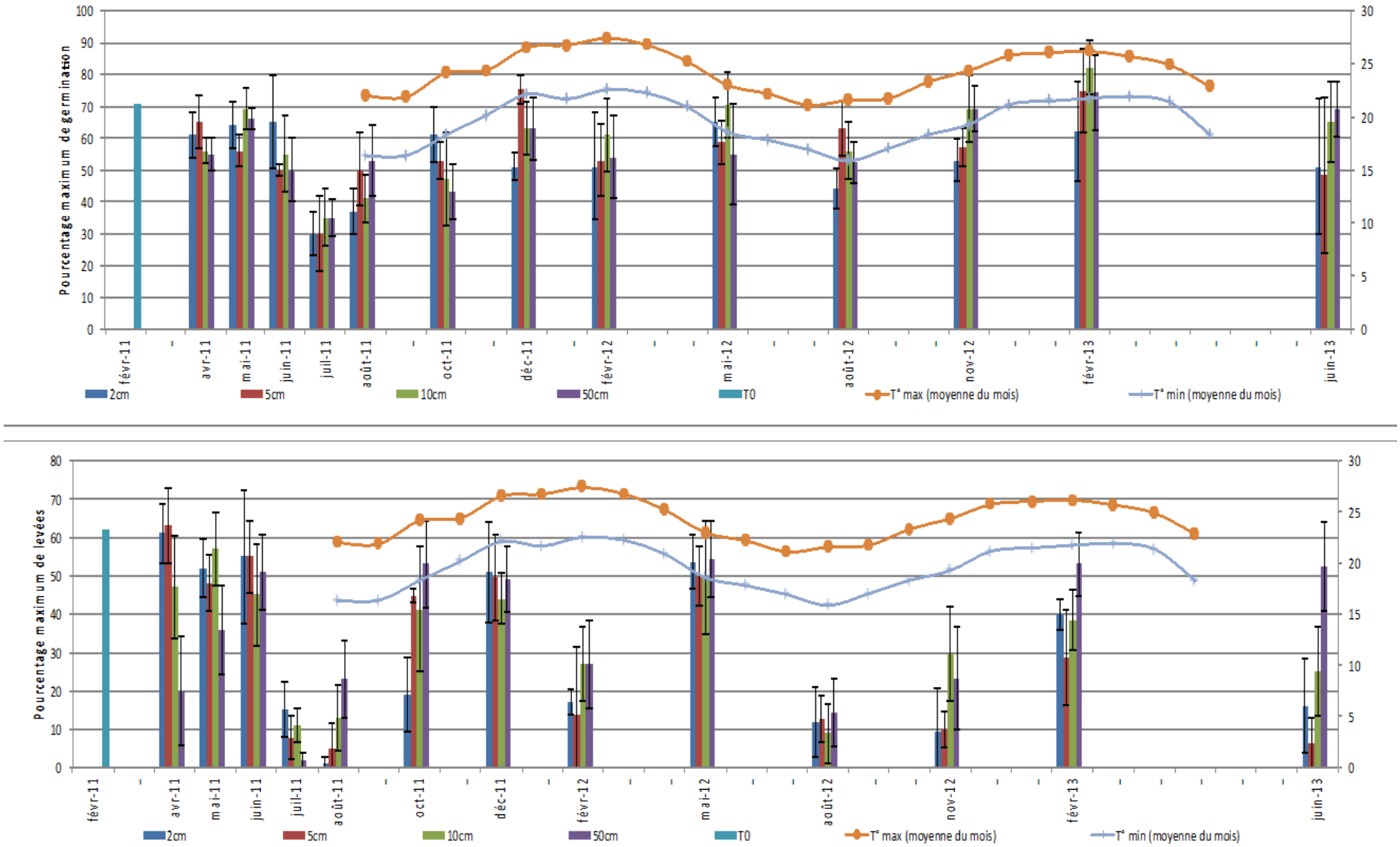


Figure 35 : Pourcentages de germination maximums (en haut) et de levées (en bas) obtenus pour les graines d'*A. neocaledonica* enfouies en fonction du temps à différentes profondeurs. Représentation de la température minimale et maximale entre août 2011 et mai 2013 (données VALENC).

Les mêmes travaux menés sur les graines de *Machaerina deplanchei* connues pour leur dormance physiologique, certes sur une période plus courte, enfouies sur Tontouta, zone pour laquelle nous n'avons pas pu obtenir les données météo, montrent malgré tout les mêmes tendances (Fig. 36) avec une baisse de la capacité germinative entre les mois de juillet à septembre et ce quelle que soit la profondeur d'enfouissement. Il n'est pas non plus possible d'observer de tendances liées à la profondeur, ainsi quelle que soit la profondeur, après 18 mois toutes les graines semblent avoir conservé leur capacité à germer.

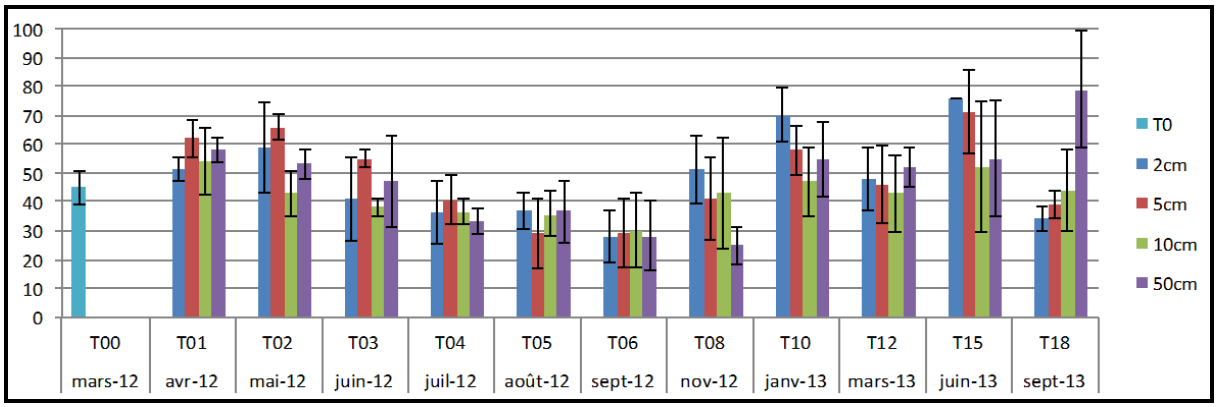


Figure 36 : Pourcentages de germination maximums obtenus pour les graines de *M. deplanchei* enfouies en fonction du temps à différentes profondeurs dans un topsoil.

Enfin, dans le cas des graines de *Scaevola cylindrica*, la dormance étant très profonde, tout comme chez S. montana (Wulff et al. 2012), il ne nous a pas été possible d'obtenir un nombre suffisant de germination pour pouvoir apporter une interprétation. Cependant, en travaillant sur le taux de viabilité des graines (Fig. 37), on peut constater qu'après 24 mois de suivi, la viabilité reste sensiblement la même que celle du témoin laissant présager une capacité de germination conservée au cours du temps quelle que soit la profondeur considérée.

Par ailleurs après 21 mois n'ayant obtenu aucune germination, il a été réalisé un test de viabilité sur les graines mises en étuve pendant cette période. Celui-ci a révélé que les graines étaient encore toute viables confirmant de fait la dormance profonde de ces dernières.

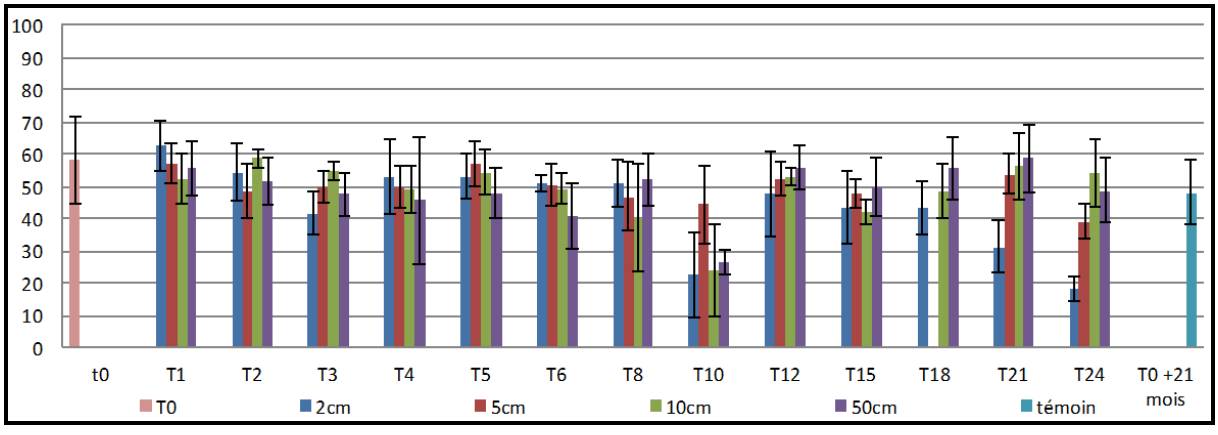


Figure 37 : Taux de viabilité des graines de *S. cylindrica* enfouies en fonction du temps à différentes profondeurs dans un topsoil. (T0 +21 mois : viabilité du lot de graines placées en germination à T0 et évalué après 21 mois en culture)

Enfin, concernant la levée de cette dormance, il a été constaté au sein des sachets de graines récupérés que les sachets placés à 2 cm de la surface, donc les plus exposés aux variations de température et d'humidité présentaient un nombre non négligeable de graines germées à partir de juin 2013 (12 mois après enfouissement avec plus de 40% en juin 2014 (24 mois après

enfouissement) (Fig. 38). La levée de dormance est donc progressive à partir de la première année. A noter qu'après 18 mois et encore plus après 24 mois, les graines enfouies à 5 et 10 cm voient également cette dormance se lever. Ainsi pour cette espèce une conservation supérieure à 24 mois pourrait avoir un effet néfaste sur son maintien dans la banque de graines.

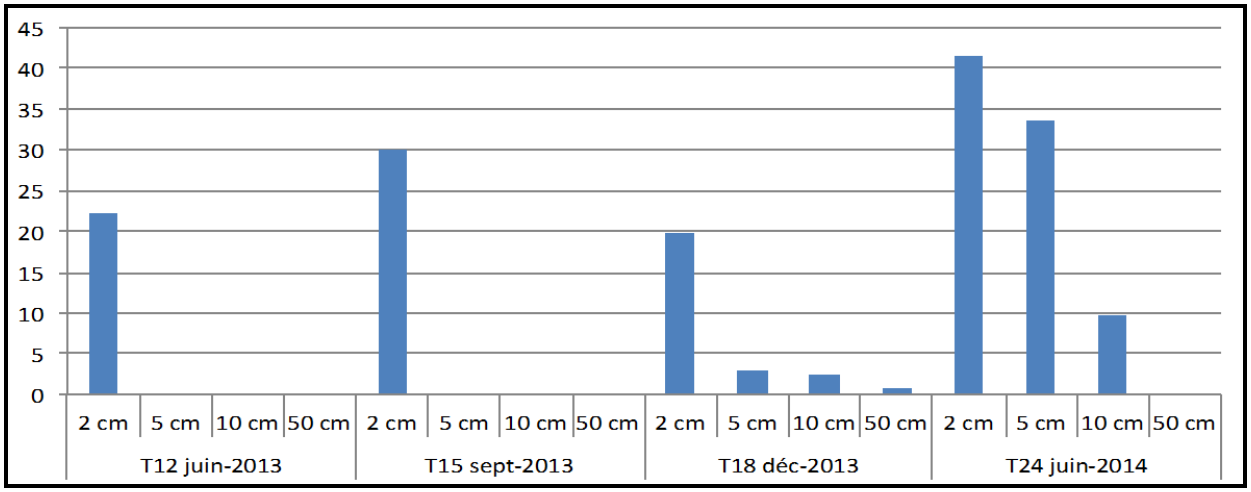


Figure 38 : Pourcentage de graines germées de *S. cylindrica* dans les sachets récupérés enfouies après un certain temps à différentes profondeurs dans un topsoil.

3.2.1.4. Conclusions pour la tâche 1

Les expérimentations de stockage de topsoil qui ont été menées dans cette étude montrent qu'il est possible de récupérer environ une quinzaine d'espèces à partir des germinations obtenues sur ces topsoils, ce qui, comparé à l'inventaire initial (55 espèces en moyenne), représente 25% de la diversité initiale. Si cela paraît modeste, cela n'en est pas moins essentiel, car ces espèces sont pionnières pour la majorité d'entre-elles et vont faciliter l'implantation d'autres espèces (succession secondaire), de plus ces topsoils contiennent des mycorhizes et des nutriments indispensables pour le maintien des espèces.

Le pouvoir séminal des graines du topsoil stocké peut être conservé, pour plusieurs espèces, sur une assez longue durée. Ainsi il n'est pas observé de baisse de germination après 36 mois de stockage du topsoil pour la majorité des graines dormantes (*Gahnia novocaledonensis, Machaerina deplanchei, Alphitonia neocaledonica*, *Polyscias* sp., *Styphelia* sp., …), tandis que les graines non dormantes ne sont pas conservées (perte totale de certaines espèces déjà à 3 mois de stockage). Concernant les graines dormantes, on constate un nombre plus important de germinations en saison chaude, il pourrait être ainsi conseillé de réutiliser le topsoil de préférence en saison chaude pour avoir des résultats plus rapides.

Lorsque les conditions sont plus sèches (comme sur Tontouta), les graines non dormantes ont toutefois la capacité à être conservées dans le topsoil sur des durées plus longues, pouvant émerger encore après 24 mois de stockage (ex. *Costularia comosa*). Ainsi la gestion du topsoil pourra être différente selon la pluviométrie du site, la conservation étant meilleure en conditions sèches.

L'épaisseur de stockage (jusqu'à environ 2 mètres, conditions de l'expérimentation) influence peu la conservation des graines. En effet, le suivi selon l'épaisseur pendant 36 mois de stockage ne montre pas de différences en termes de nombre de germinations. Ceci est expliqué essentiellement par la capacité de conservation des graines dormantes (celles listée ci-dessus) dans ces conditions de durée et d'épaisseur.

Afin de conserver de façon optimale, en conditions contrôlées de laboratoire, les graines des différentes espèces étudiées, les méthodes à employer sont :

- pour *Alphitonia neocaledonica* à 4, 15 ou 25°C, à un taux d'humidité relative de 12% :
- pour *Gymnostoma deplancheanum* à 4°C et à un taux d'humidité relative de 5 à 12% :
- pour *Machaerina deplanchei* quelle que soit la température et le taux d'humidité étudiés, les graines conservent leur capacité germinative. Cependant, pour optimiser leur utilisation pratique après conservation et avoir une germination plus rapide, il semble que la température de 25°C et un taux d'humidité relative de 12% soient les plus adaptés ;
- pour *Scaevola cylindrica*, après 18 mois, quelles que soient la température et l'humidité, le taux de viabilité est maintenu. Par contre, la germination est toujours aussi difficile.

Les études de vieillissement accéléré ont montré que les graines de *G. deplancheanum* étaient très sensibles aux variations climatiques extrêmes alors que celle d'*A. neocaledonica*, *M. deplanchei* et *S. cylindrica* sont adaptées à ce type de conditions et devraient donc se maintenir plus longtemps dans la banque de graines même dans des conditions difficiles.

Sur la longévité des graines *in-situ,* les études menées par enfouissement de graines *in situ* permettent de révéler qu'un topsoil peut être stocké sur une longue période sur une épaisseur de 50cm sans affecter la capacité germinative de graines présentant soit une dormance physique (cas d'*A. neocaledonica*), soit une dormance physiologique (cas de *S. cylindrica*) soit une combinaison des deux (cas de *M. deplanchei*). A contrario, ce stockage conduira à la perte des graines sans dormance, qui dès que les conditions sont favorables vont germer et donc ne pas être maintenues dans la banque de graines. Il est à noter que les graines d'*A. neocaledonica* et de *M. deplanchei* ont la capacité de se maintenir jusqu'à au moins 30 mois et 24 mois au regard du temps de suivi de notre expérimentation. Par contre, les graines de *S. cylindrica* dans les conditions de notre expérimentation enfouies à Tontouta voient leur dormance être levée après 24 mois pour des profondeurs comprises entre 2 et 10cm. On peut donc penser qu'un stockage supérieur à 24 mois conduira à une perte importante de cette espèce dans la banque de graines.

De manière générale, concernant les graines il semble préférable de ne pas conserver le topsoil au-delà de 24 mois et il est important de noter qu'un stockage a toutes les chances de conduire à la perte des graines non dormantes. Il est important aussi de noter que les travaux menés jusqu'à présent sur les maquis miniers indiquent que la majorité des graines sont non dormantes (L'Huillier et al., 2010). Le stockage du topsoil aura donc un effet néfaste sur le maintien de la diversité de sa banque de graines.

3.2.2. TÂCHE 2 : APPROCHE DESCRIPTIVE ET FONCTIONNELLE IN ET EX SITU : SUIVI DE TOPSOILS EN PLACE SUR DIFFÉRENTS SITES

3.2.2.1. Des germinations à partir des topsoils variables selon les sites et selon les types de végétation

En comparant les deux sites d'étude on constate de fortes variations de germinations selon les sites et les formations végétales : la plus forte densité de germinations a été relevée pour les topsoils issus des maquis MPF de Tontouta (avec environ 420 émergences/m^2 après 20 mois de suivis), alors que les topsoils MPF de Goro présentent la plus faible densité (80 émergences/m^2).

Des variations importantes peuvent être constatées également dans les germinations de Cypéracées et de Dicotylédones (Fig. 39) : les espèces de Cypéracées sont pratiquement toujours les plus nombreuses à germer **(**sauf sur MPF de Goro), avec des variatios assez

fortes selon les types de formation végétales. Les densités de germination de dicotylédones peuvent varier également fortement, ici du simple au triple selon les types de formation végétale.

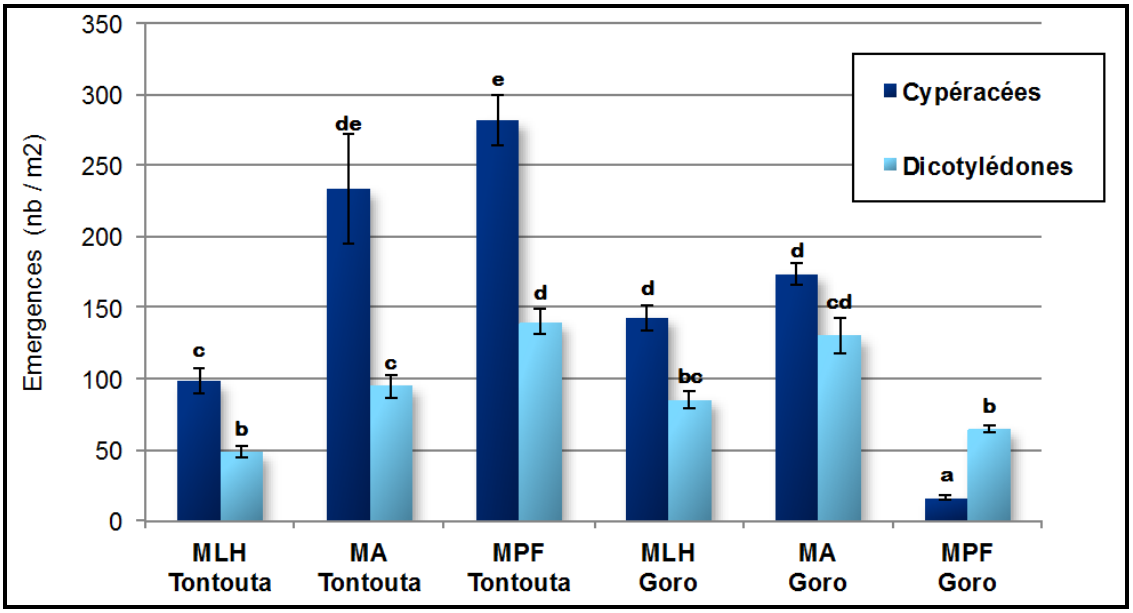


Figure 39 : Densités de germinations issues des différents topsoils. Suivi réalisé sur 20 mois, sur 10 échantillons de topsoils placés en serre pour chaque formation végétale des deux sites d'étude (prélevés sur des parcelles de 100 m^2). Des lettrines différentes indiquent une différence significative entre les formations végétales.

3.2.2.2. Des espèces dominantes dans les germinations selon les sites et selon les types de végétation

Une observation plus fine au niveau des espèces qui ont pu être identifiées parmi toutes les germinations (Figs. 40 et 41), permet de constater que certaines espèces sont très présentes tel que *Machaerina deplanchei, Costularia comosa* et *C. nervosa* chez les Cypéracées, ou *Styphelia* sp. et *Sannantha leratii* chez les dicotylédones.

Par ailleurs, ces dominances de germination sont très variables selon les formations et les sites : *Machaerina deplanchei* et *Costularia comosa* par exemple sont très présentes sur Tontouta (surtout sur maquis MA) et peu sur Goro, *Costularia nervosa* se retrouve sur pratiquement toutes les formations.

En terme de diversité spécifique, quasiment tous les sites (hormis MPF sur Goro) ont de nombreuses espèces de Cypéracées qui émergent à partir de leur topsoil (entre 5 et 7), et de nombreuses espèces de dicotylédones également (entre 5 et 8, hormis MA sur Goro avec 3 espèces mais qui sont 3 espèces dominantes).

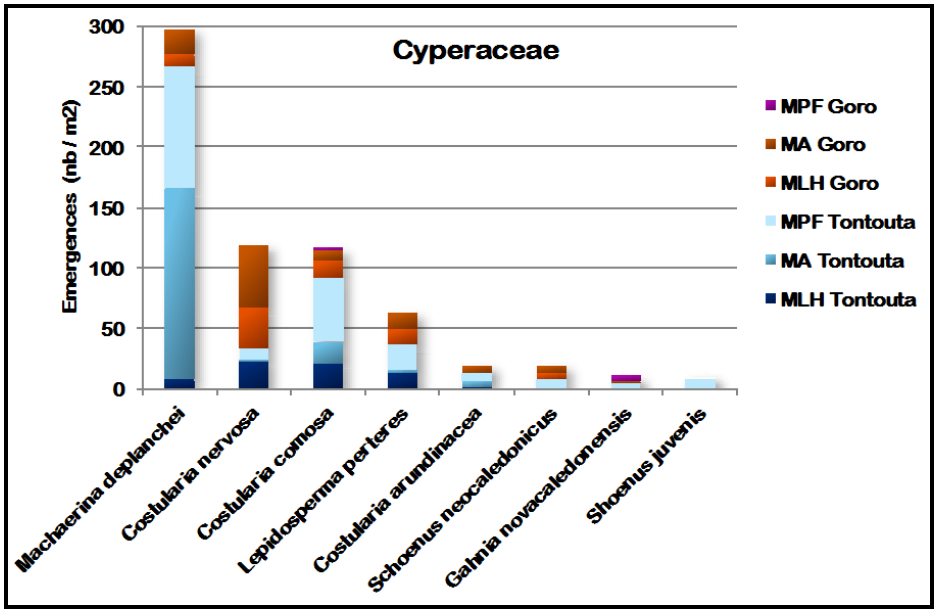


Figure 40 : Densités de germinations des espèces de Cypéracées identifiées à partir des différents topsoils. Suivi réalisé sur 20 mois, sur 10 échantillons de topsoils placés en serre pour chaque formation végétale des deux sites d'étude (prélevés sur des parcelles de 100 m ^{2}).

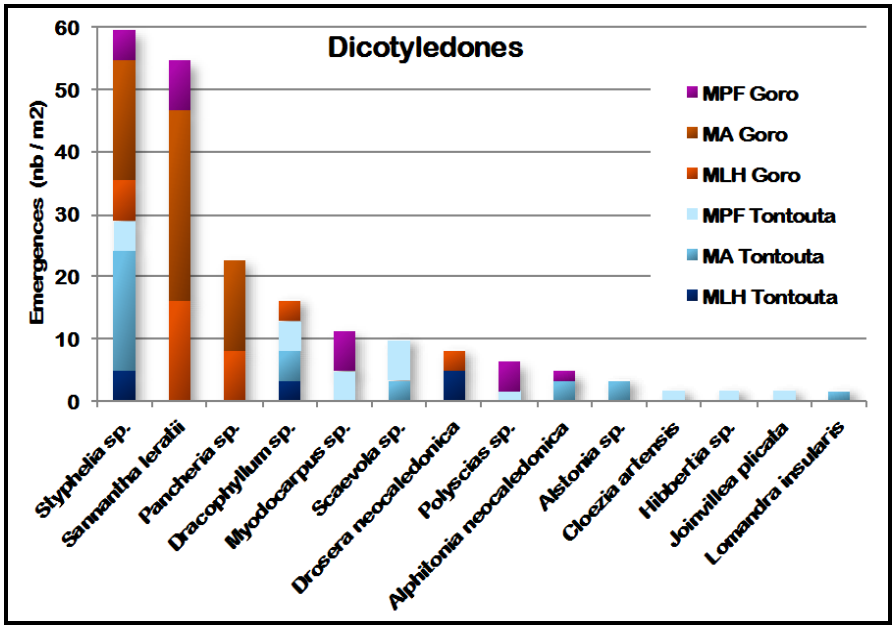


Figure 41 : Densités de germinations des espèces de Dicotylédones identifiées à partir des différents topsoils. Suivi réalisé sur 20 mois, sur 10 échantillons de topsoils placés en serre pour chaque formation végétale des deux sites d'étude (prélevés sur des parcelles de 100 m ^{2}).

3.2.2.3. Une banque de graine concentrée en surface dans les premiers centimètres de sol

Des prélèvements de sol à différentes épaisseurs (0-2,5 cm, 2,5-5 cm, et 5-10 cm) ont confirmé que les graines étaient surtout concentrées dans les premiers centimères de sol (Fig. 42) : ainsi 80% des germinations apparaissent à partir des graines stockées dans la couche 0-2,5cm d'épaisseur, et 17% dans la couche 2,5-5cm. Ainsi 97% des graines se situent dans les 5 premiers centimètres du sol. L'épaisseur de prélèvement du topsoil va ainsi avoir une

influnce déterminante sur la qualité finale du topsoil : un prélèvement par exemple de topsoil sur 50 cm (ce qui est courant actuellement) va diluer les semences d'un facteur 10 environ. Entre 5 et 10cm seules des graines de *Costularia comosa* ont émergé.

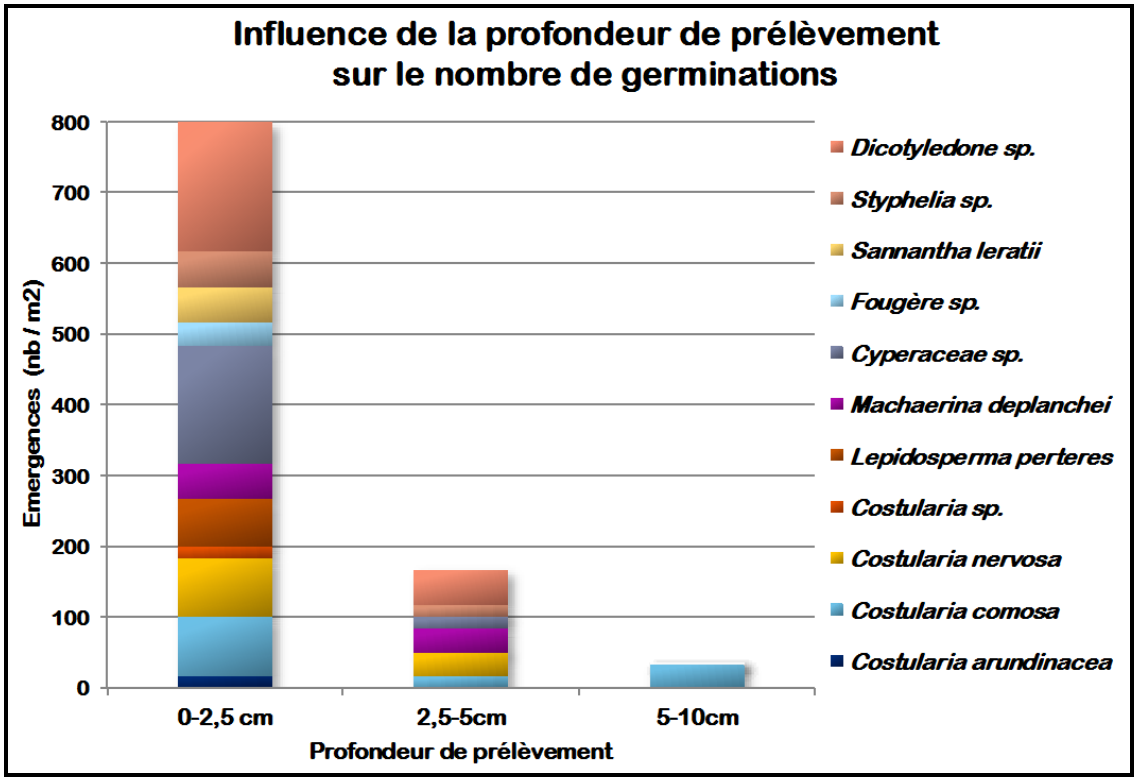


Figure 42 : Densités de germinations des banques de graines des topsoils prélevés sur plusieurs épaisseurs. Prélèvements réalisés sur maquis arbustifs de Goro, sur 5 parcelles (5 échantillons par épaisseur), prélevés soigneusement à l'aide d'une plaque métallique pour empêcher tout mélange entre couche. Suivi sur 20 mois en serre.

3.2.2.4. Une relation entre la densité de germination et la composition floristique de la végétation

Les résultats ont mis en évidence une relation entre la composition floristique des formations végétales en place et les banques de graines des topsoils. Ainsi, une Analyse en Composante Principale (Fig. 43) montre que les densités de germinations des banques de graines des topsoils sont positivement corrélées avec la richesse spécifique en Cyperaceae des maquis en place, mais peu corrélé à la richesse spécifique des maquis (Goxe 2010).

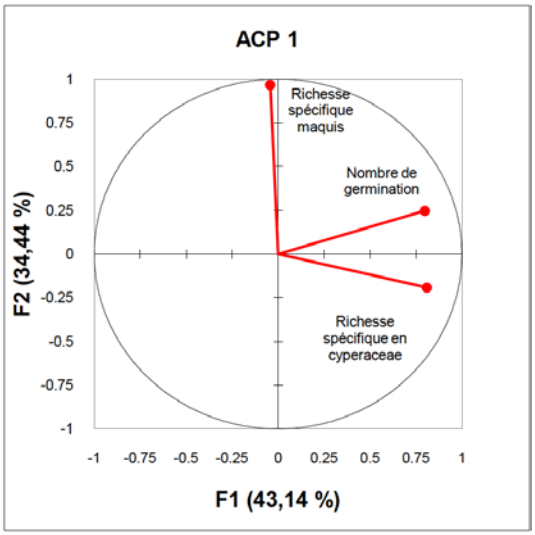


Figure 43 : ACP intégrant le nombre de germinations, la richesse spécifique des formations végétales et la richesse spécifique en Cyperaceae des formations végétales en place. 77,58 % de la variabilité est représentée sur les axes F1 et F2.

3.2.2.5. Un effet saison assez marqué sur les qualités germinatives des topsoils

Des topsoils de deux formations végétales (maquis paraforestier MPF, et maquis ligno-herbacé MLH sur Tontouta) ont été prélevés à différentes dates pour évaluer l'influence de la saison sur la banque de graines, car les cycles phénologiques de fructification des espèces varient dans l'année et ont certainement une grande influence sur cette banque de graines.

Sur la densité des germinations, on constate un fléchissement pour les topsoils prélevés en saison fraîche (Fig. 44) : au mois de juin et août pour les maquis paraforestier, et au mois d'août et surtout octobre pour les maquis ligno-herbacés.

Ce fléchissement concerne autant les Cypéracées que les dicotylédones, avec toutefois une tendance à une baisse plus franche parmi les dicotylédones.

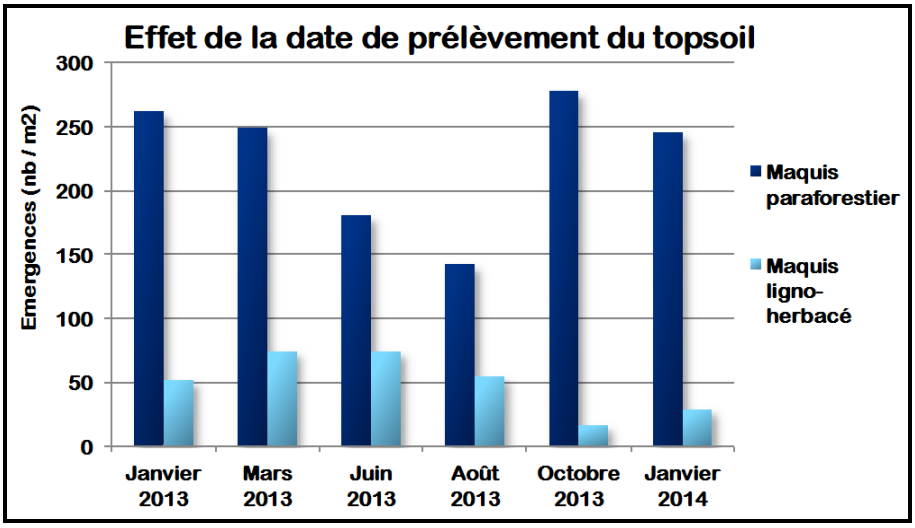


Figure 44 : Densité de germinations (émergences) sur les topsoils des deux formations étudiées, en fonction de la date de prélèvement des topsoils. Prélèvements réalisés sur maquis paraforestier (MPF) et maquis ligno-herbacés (MLH) de Tontouta, sur 5 parcelles (5 répétitions) par maquis, suivis sur 9 mois en serre.

Plus en détail, on constate également une baisse de la diversité d'espèces dans les émergences pendant la saison fraîche (Fig. 45) : sur maquis MPF cette baisse concerne peu les Cypéracées et surtout des dicotylédones (« ligneux » dans la figure 45) ; sur MLH les Cypéracées et les dicotylédones sont impactées nettement avec une baisse, de 4-6 espèces en saison chaude à 1 seule espèce en saison fraîche.

Il est fort probable que pour les topsoils prélevés en saison fraîche, une grande partie des graines non dormantes qui ont été produites en saison chaude (fin d'année à début d'année), laquelle reste la période principale de fructification pour la majorité des espèces de maquis minier (L'Huillier et al. 2010), avaient déjà germé et ont été détruites lors du prélèvement.

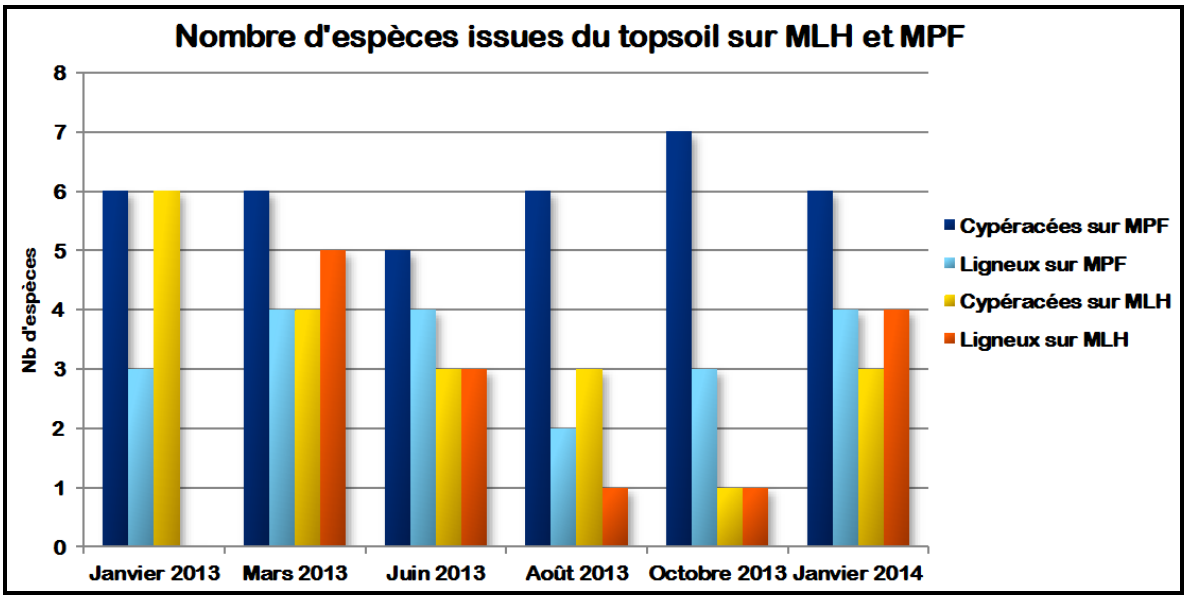


Figure 45 : Diversité spécifique observée à partir des germinations (émergences) sur les topsoils des deux formations étudiées, en fonction de la date de prélèvement des topsoils. Prélèvements réalisés sur maquis paraforestier (MPF) et maquis ligno-herbacés (MLH) de Tontouta, sur 5 parcelles (5 répétitions) par maquis, suivis sur 9 mois en serre.

3.2.2.5.1. Conclusions pour la tâche 2 :

La comparaison de plusieurs topsoils (non stockés) provenant de sites différents et de formations végétales différentes montre que la densité de germination et la diversité spécifique obtenues à partir de ces topsoils sont très variables. Il apparaît ainsi important de pouvoir caractériser la capacité d'un topsoil au plan de sa banque de graines avant de l'utiliser (à l'aide des méthodes utilisées ici, à savoir la prise d'échantillons mis en terrine en serre, et suivis plusieurs mois). Cela permet ensuite de raisonner le choix des espèces produites en pépinière et utilisées lors d'opérations de restauration écologique, afin de compléter la diversité des espèces à implanter sur le site dégradé.

L'étude de la distribution verticale des graines dans le sol (par prélèvements à différentes épaisseurs dans les premiers cm) montre qu'environ 97% des graines sont concentrées en surface dans les 5 premiers cm du sol. L'épaisseur de prélèvement du topsoil va ainsi avoir une influence déterminante. Une méthode idéale consisterait ainsi à prélever dans un premier temps le topsoil sur une épaisseur très fine d'environ 10cm où sont concentrées toutes les semences (actuellement les outils utilisés permettent difficilement de prélever moins de 30 cm de sol), puis dans un second temps la couche inférieure (« subsoil ») sur environ 10-50 cm (100 cm maximum, considérant que des racines et des mycorhizes peuvent encore se trouver à cette profondeur). La réutilisation de ces couches de sol doit ensuite respecter logiquement leur agencement, les épaisseurs d'étalage pouvant être plus faibles qu'à l'origine de façon à pouvoir

traiter des surfaces plus grandes que la surface d'origine du prélèvement : le subsoil peut être étalé sur environ 30 cm (au lieu de 50cm) et le topsoil sur environ 5cm si possible (au lieu de 10cm), ce qui permet de ne pas enfouir des graines inutilement, car les graines enfouies à plus de 3-4 cm n'ont quasiment aucune chance de pouvoir émerger et se développer.

La date de prélèvement du topsoil est un autre paramètre important à prendre en compte. Ainsi il apparaît préférable de prélever des topsoils en saison chaude, en fin d'année ou début d'année, période pendant laquelle la banque de graines a plus de chance d'être bien pourvue en quantité et en diversité.

3.2.3. TÂCHE 3 ET 4 : SUIVI DU POTENTIEL MYCORHIZOGÈNE ET DE L'ACTIVITÉ MICROBIENNE DES TOPSOILS

3.2.3.1. Sur le site de Goro (VALE-NC) :

3.2.3.1.1. Potentiel mycorhizogène

- **Potentiel mycorhizogène apprécié par la densité des spores AMF viables**

Les densités de spores AMF viables ont été mesurées pour chaque échantillon (fig 46 et 47).

Au temps zéro, la valeur unique donnée ici représente une moyenne puisqu'au départ, il n'y a pas de différence entre les différents niveaux de profondeurs, le sol ayant été homogénéisé avant d'être installé.

Comme dans toute expérience biologique de terrain, en raison de la diversité des facteurs influençant les paramètres ciblés, les résultats sont hétérogènes et les interprétations délicates et complexes. Toutefois, il se dégage des traits généraux relativement clairs et stables.

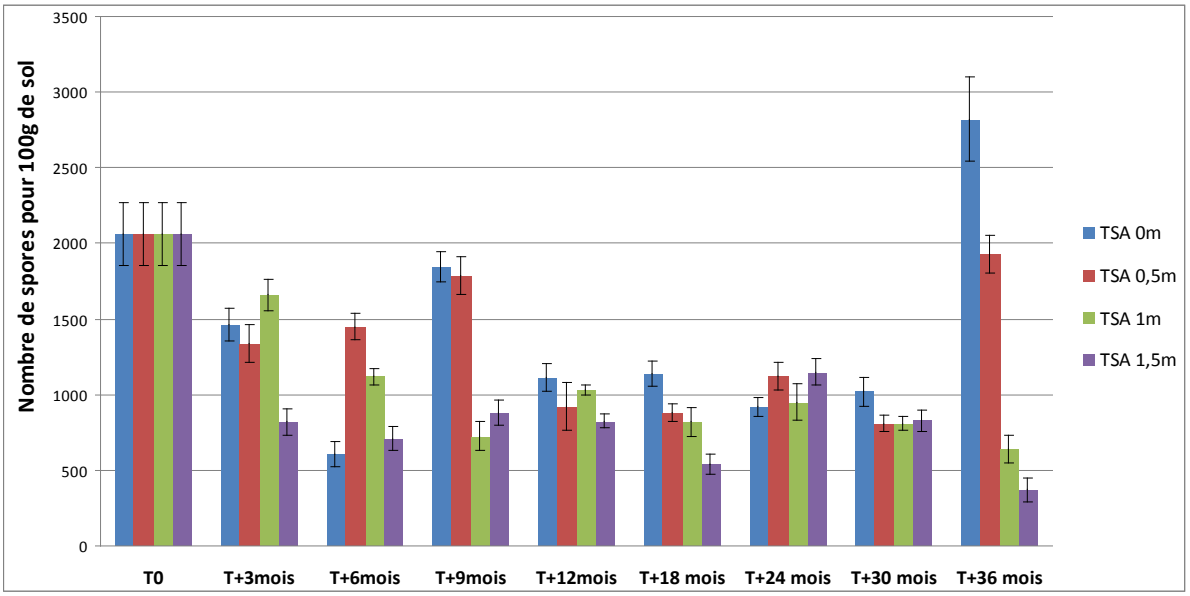


Figure 46 : Evolution du nombre de spores AMF viables dans les topsoils stockés 0 à 36 mois à Goro, en andain, à différentes profondeurs

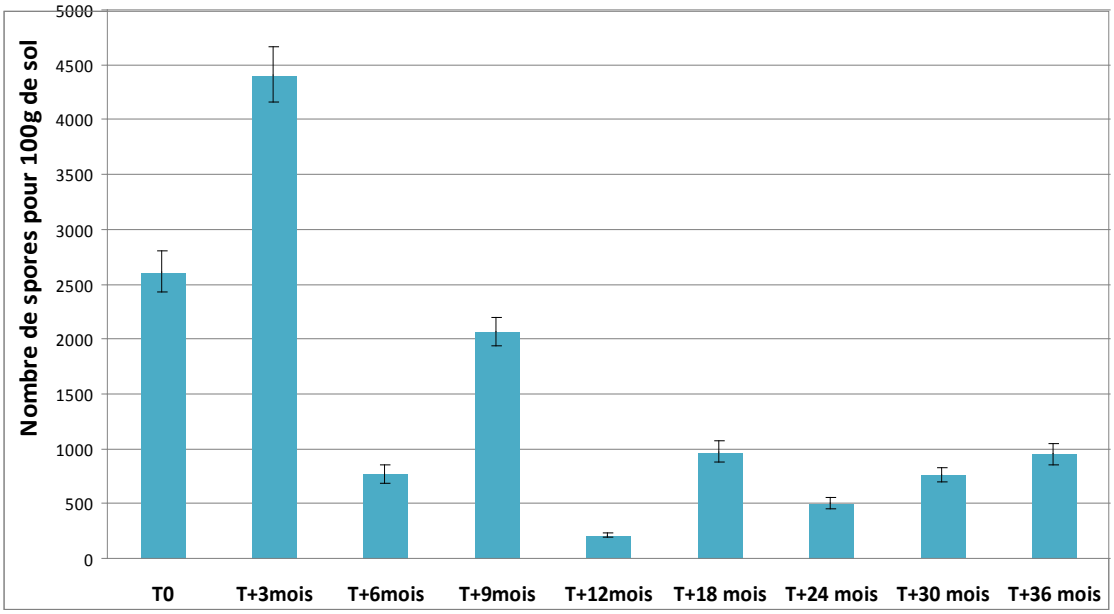


Figure 47 : Evolution du nombre de spores AMF viables dans les topsoils stockés 0 à 36 mois à Goro, étalés (50cm).

On note une baisse générale du nombre de spores AMF se manifestant dès le troisième mois. Après 6 mois de stockage, le nombre de spores est en moyenne 3 fois plus faible qu'au départ.

Par la suite, il semble y avoir une remontée de la densité en spores, puis une certaine stabilisation avant d'avoir une nouvelle remontée importante du nombre de spores AMF, mais uniquement en surface.

D'autre part, il apparaît aussi que les couches les plus profondes du topsoil stocké en andain sont moins favorables à la conservation des spores AMF, les valeurs étant généralement plus basses en profondeur. Ceci est aussi confirmé par les valeurs généralement plus élevées obtenues pour le topsoil stocké étalé.

Les AMF sont des symbiotes obligatoires ; toutefois leurs spores (considérées comme étant des chlamydospores : spores de résistance produites par le mycélium) permettent aux champignons de se conserver dans le sol en absence de plantes un temps variable, selon les conditions de substrat et de climat (humidité, température). Les conditions naturelles pour les topsoils à Goro semblent donc peu favorables à une conservation longue des spores. Humidité et chaleur sont généralement peu favorables à une bonne conservation, comme c'est le cas pour les graines. C'est pourquoi, en laboratoire, les spores AMF sont généralement conservées dans du sol sec à température modérée (15-25 °C). Les résultats obtenus dans d'autres expérimentations similaires (Notamment thèse de L. Bordez en cours) montrent que cette baisse de la densité des spores dans un topsoil stocké est toujours observée et est parfois beaucoup plus importante que celle notée ici.

La remontée apparemment significative de la densité en spores à partir du 9ème mois est difficile à interpréter. Elle ne semble pas due à un apport de spores provenant d'ailleurs, puisque l'augmentation apparaît aussi dans les couches profondes du topsoil stocké. La première hypothèse logique est que cette augmentation serait liée au développement des plantes à partir de la banque de graines. La valeur plus élevée en surface tend à confirmer cette hypothèse. L'augmentation beaucoup plus importante au 36ème mois, mais uniquement dans les 50 premiers centimètres, confirme l'hypothèse d'une production de spores en relation avec le développement des plantes sur le topsoil stocké. Cela indiquerait que le topsoil peut récupérer une partie de ses potentialités initiales après développement de plantes, s'il est stocké étalé (60 cm au maximum).

Potentiel mycorhizogène apprécié par la mycorhization du sorgho sur le topsoil

En ce qui concerne la deuxième technique de mycorhization sur plante, la baisse de la densité en spores AMF dans les 6 premiers mois apparaît de façon peu nette en termes de mycorhization des plants de sorgho cultivés sur ces sols. Cependant, les niveaux de mycorhization mesurés avec le modèle sorgho (Fig. 48) sont bas et de ce fait très variables et contestables. Les écarts-types sont très élevés indiquant une très forte hétérogénéité, ne permettant pas réellement de distinguer des différences significatives. Il est probable que la réceptivité du sorgho aux AMF dans les conditions de substrat ultramafique soit insuffisante pour traduire correctement le potentiel mycorhizogène du sol. Les plants sont en effet chétifs et plus ou moins stressés. Il serait cependant trop compliqué et contraignant d'utiliser une espèce endémique du milieu minier, compte-tenu de la lenteur de croissance de ces espèces. Par ailleurs, au-delà de quelques mois en serre les risques de pollution du sol par des spores AMF venues de l'extérieur n'est pas négligeable. Lorsque les taux de mycorhization sont élevés, cela ne gène pas vraiment, car les différences restent nettes, mais lorsque ces taux sont faibles comme ici, cela peut perturber les interprétations. L'ensemble de ces éléments peut expliquer les résultats obtenus. Toutefois on constate globalement une baisse de la mycrohization, puis une remontée à 12 mois. Nous n'avons pas réalisé les analyses après 12 mois selon ce protocole, en raison de sa fiabilité discutable.

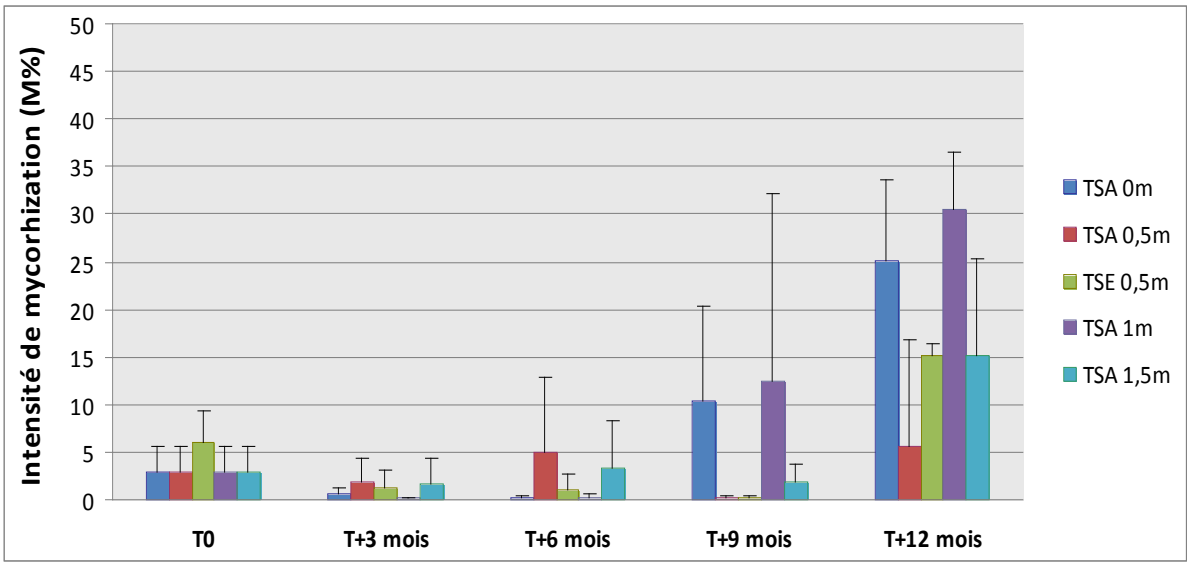


Figure 48 : Evolution du potentiel mycorhizogène du topsoil stocké en andain (TSA) ou étal (TSE) à Goro, en fonction du temps à différentes profondeurs. Détail des intensités de mycorhization (M en %), avec leurs écarts-types.

C'est pourquoi, nous avons réalisé en 2013, une dernière expérience en serre pour tenter de vérifier s'il y a bien une réduction du taux de mycorhization induit par le topsoil stocké pendant 24 mois par rapport au sol naturel correspondant, en changeant les conditions de culture. Afin d'améliorer la croissance du sorgho sur le topsoil, nous avons rajouté 40% (en volume) de terreau stérilisé à l'autoclave aux topsoils étudiés. Des précautions supplémentaires ont été prises pour éviter une contamination externe. Les résultats (Fig. 49) indiquent bien une baisse forte du potentiel mycorhizogène du topsoil stocké, même si les valeurs d'intensité de mycorhization restent faibles.

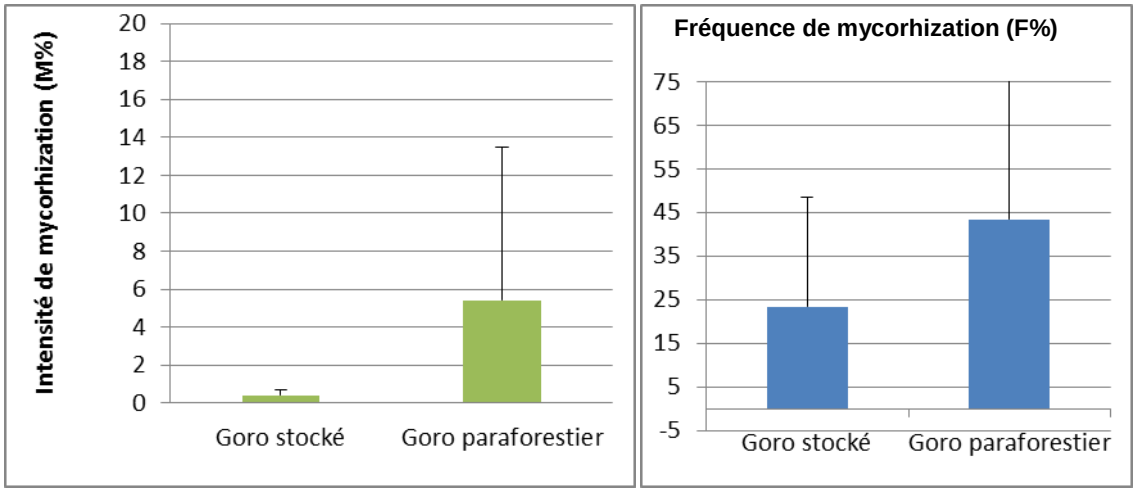


Figure 49 : Intensité (M %) et fréquence (F %) de mycorhization des plants de sorgho développés sur le topsoil de Goro à l'état naturel (Goro paraforestier), ou stocké 24 mois. L'intensité traduit la surface racinaire colonisée par les AMF, tandis que la fréquence traduit le nombre de racines plus ou moins colonisées par les AMF.

En conclusion, l'ensemble des résultats de cette partie confirment clairement l'appauvrissement du topsoil en termes de potentiel mycorhizogène pendant le stockage et ceci dès les 6 premiers mois et confirme également que le stockage étalé permet une meilleure conservation du potentiel mycorhizogène que le stockage en andain.

3.2.3.1.2. Densités microbiennes

Concernant la mesure des activités microbiennes, nous avons eu des difficultés méthodologiques liées à la très faible activité de ces sols qui ne permet pas de voir des différences claires entre les traitements. Nous avons donc dû réaliser un certain nombre d'essais méthodologiques pour trouver une technique plus précise que celle prévue initialement. Aucune des techniques de mesure de l'activité microbienne ne donne de résultats correctement interprétables. Les essais sur la technique FDA avec ajout de glucose pour stimuler l'activité de façon comparative selon les sols, n'est finalement pas beaucoup plus satisfaisante. C'est pourquoi, nous avons opté pour le dénombrement de la microflore bactérienne aérobie cultivable. Cette méthode donne des valeurs bien corrélées à la biomasse microbienne active dans le sol. Effectivement les résultats obtenus dans ce sens (Fig. 50) sont très clairs :

En surface, on constate une forte baisse (environ 4 fois) de la densité bactérienne dès le troisième mois, avec ensuite une baisse plus modérée. En profondeur, la baisse est plus lente, mais aboutit à peu près au même niveau après 24 mois. Globalement ces valeurs se stabilisent ensuite à 30 et 36 mois. Dans le topsoil étalé la baisse est progressive, mais atteint après 36 mois un niveau 12 fois plus faible.

Cette réduction des populations bactériennes est liée à la baisse des concentrations en composés énergétiques, suite à la disparition des racines végétales qui alimentent le sol en ces composés (rhizodéposition). Elle implique à la fois une réduction de l'activité de minéralisation liée à la microflore, activité directement responsable de la production continue d'éléments minéraux essentiels (N, P, K, Ca, etc.), mais aussi la raréfaction probable de certaines espèces symbiotiques ou ayant des effets positifs directs sur les plantes (bactéries PGPR, notamment vivant habituellement autour des racines). La faible différence existant entre la surface et la profondeur, en termes quantitatifs, est liée ici au fait qu'en profondeur les bactéries anaérobies peuvent compenser la raréfaction des bactéries aérobies en relation avec l'asphyxie du sol. Toutefois, il est vraisemblable que sur le plan qualitatif, les couches profondes soient plus

pauvres en espèces bactériennes symbiotiques et synergiques généralement aérobies.

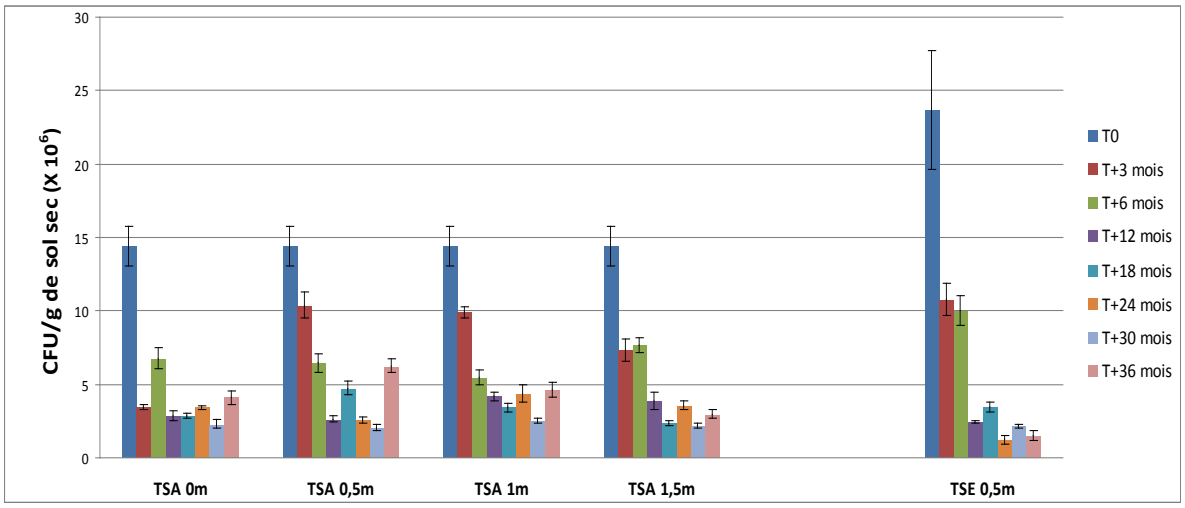


Figure 50 : Evolution sur 36 mois de la densité de la microflore bactérienne hétérotrophe aérobie (utilisée comme indicateur) dans les topsoils stockés en andain (TSA) ou étalé (TSE), à différentes profondeurs, à Goro. T0 = topsoil en début de stockage.

Cette forte baisse de la densité bactérienne, dès 6 mois, s'accompagne nécessairement d'une baisse importante de la fertilité du topsoil.

3.2.3.2. Sur le site de Tontouta (SMGM)

Pour le site de Tontouta, en raison de la mise en place tardive du topsoil stocké (voir précédemment), le suivi n'a pu être fait que sur 24 mois.

3.2.3.2.1. Potentiel mycorhizogène

- **Potentiel mycorhizogène apprécié par la densité des spores AMF viables**

Les résultats sont plus difficiles à interpréter que pour Goro (Fig. 51). La première remarque importante est que le nombre de spores, au temps zéro est très faible (environ 330 spores/ 100g de sol). A titre de comparaison, le topsoil de Goro comporte plus de 2000 spores /100g et un sol de maquis minier à l'état normal comporte souvent plus de 4000 spores/100g. Comme nous le verrons plus loin, les quantités de bactéries sont également très faibles. Par ailleurs, nous avons noté qu'il n'y avait quasiment pas de racines dans ce topsoil.

Les résultats obtenus en termes d'évolution de la densité des spores AMF sont très difficiles à interpréter et semblent quasiment aléatoires. On pourrait supposer que les sols auraient été ensemencés par des spores ramenées par le vent, mais cela aurait induit une augmentation uniquement en surface. L'analyse des densités de plantes qui se sont développées sur ce topsoil ne va pas également dans le sens d'une sporulation sur les plantes, la densité en graines viables étant très faible (moins de 10 germination par m^2, voir tâche 1). En fait il est quasi certain que ces fluctuations soient liées à la faible quantité de spores au départ, la technique utilisée étant peu sensible pour les valeurs basses (les erreurs de lecture au microscope sont d'autant plus conséquentes que les chiffres sont faibles). On peut toutefois constater que le nombre des spores à 24 mois est clairement plus bas qu'au départ.

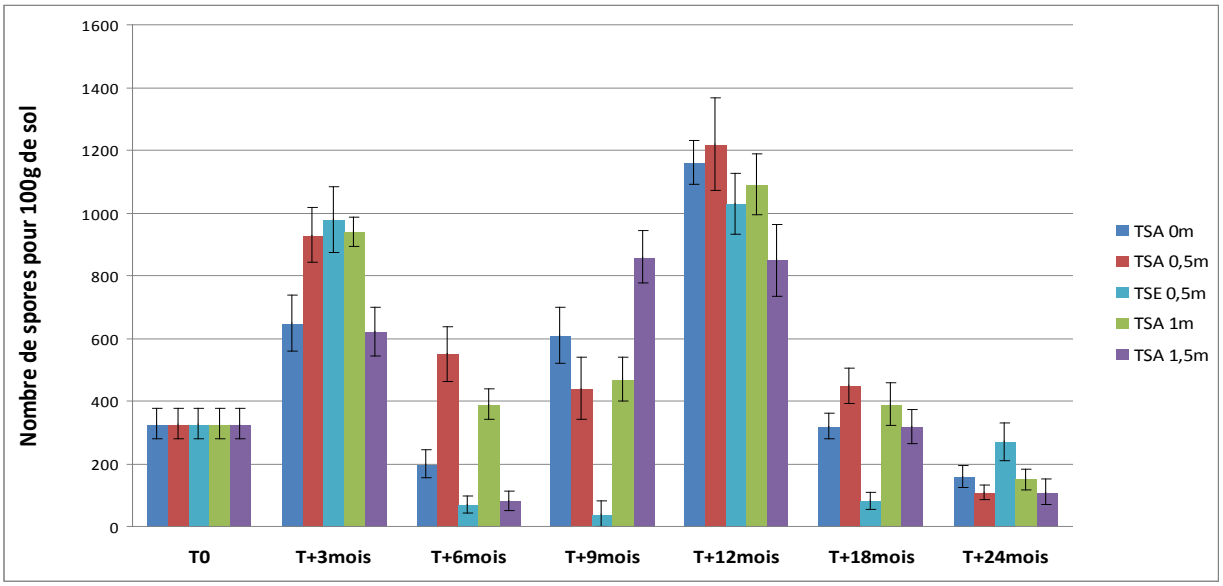


Figure 51 : Evolution du nombre de spores AMF viables dans les topsoils stockés en andain (TSA) ou étalé (TSE) de 0 à 24 mois à Tontouta, à différentes profondeurs. Au temps zéro, la valeur unique donnée ici représente une moyenne puisqu'au départ, il n'y a pas de différence entre les différents niveaux de profondeurs.

Potentiel mycorhizogène apprécié par la mycorhization du sorgho sur le topsoil

L'évolution du potentiel mycorhizogène mesuré par la mycorhization du sorgho est également très aléatoire pour les mêmes raisons (résultats non présentés ici).

Par contre, la deuxième technique utilisée, avec enrichissement du topsoil avec de l'humus stérile, montre une baisse significative entre le topsoil stocké et le topsoil d'origine (Fig. 52) ; ce qui montre bien une baisse du potentiel mycorhizogène au cours du stockage.

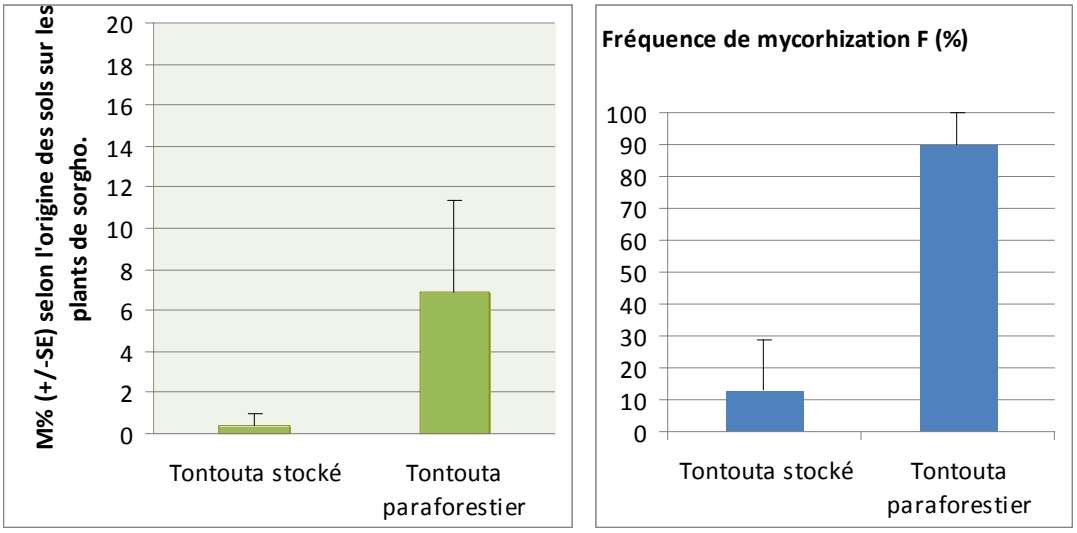


Figure 52 : Intensité (M %) et fréquence (F %) de mycorhization des plants de sorgho développés sur le topsoil de Tontouta non stocké, ou stocké 18 mois. L'intensité traduit la surface racinaire colonisée par les AMF, tandis que la fréquence traduit le nombre de racines plus ou moins colonisés par les AMF.

3.2.3.2.2. Densités microbiennes

Les résultats de la microflore bactérienne rejoignent ceux obtenus pour les spores AMF (Fig. 53) :

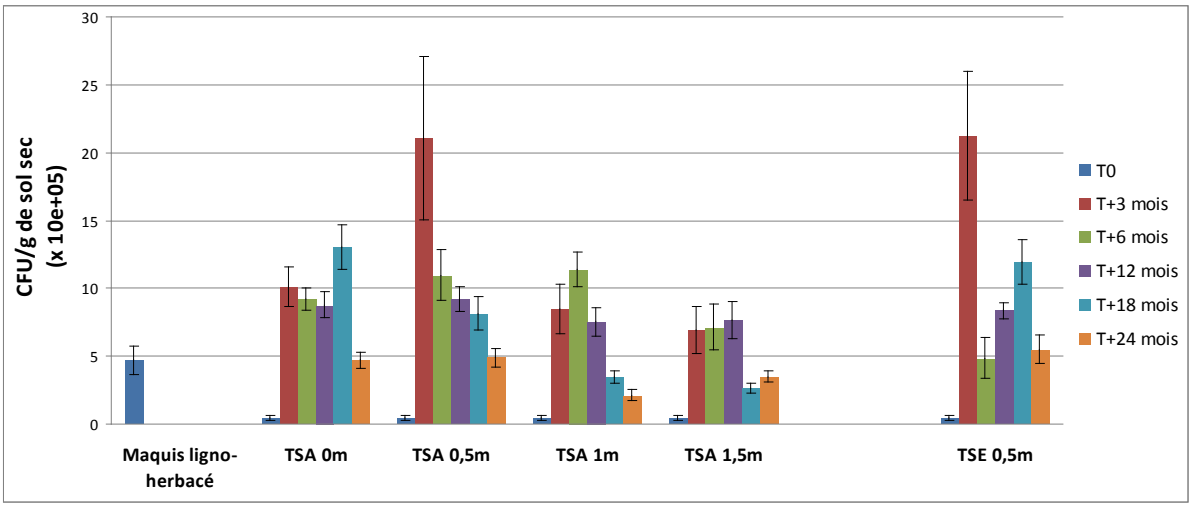


Figure 53 : Evolution de la densité de la microflore bactérienne hétérotrophe aérobie dans le topsoil de Tontouta stockés en andain (TSA) ou étalé (TSE) en fonction du temps et de la profondeur. La valeur notée « maquis ligno-herbacé » représente la densité bactérienne dans le sol correspondant au milieu naturel,

On note en effet, une densité de bactéries anormalement basse en début d'expérimentation (moins de 10^5 CFU/g de sol). Cette valeur est nettement plus basse que celle du milieu naturel (maquis ligno herbacée donnée à côté). Il n'est dès lors pas anormal de voir cette densité augmenter. En effet, si le sol de départ est presque stérile, comme cela semble être le cas, tout apport externe (par l'eau, le vent et le développement, même rare, de plantes) peut faire remonter la densité des bactéries. Ces résultats nous amènent à douter de ce topsoil et à considérer 2 hypothèses:

1 - Ce topsoil est anormalement peu fertile (cas extrême), sachant qu'il s'agit d'un maquis ligno-herbacé (peu productif), mais cela n'explique pas réellement des valeurs aussi basses.
2 - Ce topsoil a été mélangé avec un important volume de sous-sol latéritique plus ou moins stérile, ce que semble corroborer la quasi absence de racine dans ce topsoil. C'est donc cette deuxième hypothèse que nous retiendrons. La rareté des graines viables dans ce sol (voir tâche 1) conforte cette hypothèse.

Si, comme nous le pensons, le topsoil a été fortement dilué avec de la latérite stérile se trouvant en dessous au moment du prélèvement, il a dû subir une forte dépression de l'activité bactérienne en relation avec cette dilution brutale, avant de remonter suite à une adaptation partielle de la microflore à ce mélange et à des apports ultérieurs de composés carbonés.

Malheureusement, à la suite du retard très important que nous avions enregistré pour le démarrage de cette expérimentation à Tontouta, la mise en place du site s'est faite précipitamment et nous n'avons pas pu être présents et contrôler la façon dont le topsoil a été prélevé et transféré pour le stockage, comme cela a été le cas pour Goro. Quoiqu'il en soit, la très faible fertilité de ce substrat au départ illustre la difficulté de bien gérer le topsoil depuis son prélèvement (qui doit être bien pensé en fonction de l'épaisseur réelle de sol, en creusant si besoin un profil pédologique pour vérifier à partir de quelle profondeur les racines deviennent rares) jusqu'à sa plantation.

3.2.3.3. Conclusions des tâches 3 et 4

On peut résumer comme suit les résultats obtenus dans cette partie :

- D'une façon générale, le nombre de spores AMF indiquant la capacité du sol à mycorhizer les plantes baisse assez fortement dès le 3ème mois. Il tend toutefois à remonter en fin d'expérimentation suite au développement des plantes, mais uniquement en surface.
- La densité des populations bactériennes baisse également fortement dans le topsoil de Goro indiquant une chute importante de la fertilité du sol, notamment après 12 mois.
- Le topsoil stocké à Tontouta montre un comportement indiquant un niveau initial de fertilité anormalement bas, probablement dû à un mélange topsoil/latérite stérile, de sorte qu'il a plutôt tendance à remonter ensuite, mais ce modèle n'est pas conforme à la majorité des topsoils. Ceci illustre la difficulté à gérer le topsoil et la nécessité de s'assurer de la bonne profondeur du topsoil à prélever.

D'autres résultats obtenus récemment sur un autre projet (Thèse Laurent Bordez, 2015, en cours) montrent également une tendance très nette à la baisse du potentiel mycorhizogène et de l'activité microbienne sur 2 topsoils différents.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats nous amènent à proposer que le topsoil doit être réutilisé le plus rapidement possible après décapage et si possible dès le décapage. Lorsque le topsoil doit être stocké, même pour une courte période, il est préférable de l'étaler (couche de 50 cm environ). S'il est stocké plus de 6 mois, il paraît indispensable de le revitaliser par différents moyens : inoculation des plants en AMF, apport d'une fine couche de sol non stocké au dessus du topsoil dégradé, amendement organique, etc.

3.3. RÉFÉRENCES CITÉES :

Black M.J., Bewley J.D. and Halmer P., 2006. The encyclopedia of seeds. Science technology and uses. CAB International, Wallingford, UK.

Bordez L., 2015 (à soutenir juillet). Étude sur les potentiels biologiques des topsoils et leur gestion en vue de leur utilisation pour la restauration écologique des milieux dégradés. Application au massif du Koniambo. Université de la Nouvelle-Calédonie (Dir. H. Amir).

Fenner, M., Thompson, K., 2005. The ecology of seeds. Cambridge university press. New York.

ISTA, 1999. International rules for seed testing. Seed Sci. Technol. 27 (supplement).

L'Huillier L., 2007. Assessment of soil seed banks for rehabilitation of nickel mines in New Caledonia. *In* "Proceedings of the Seed Ecology II 2007 Conference, 9-13 September, Perth, Australia". Eds. S Turner, D Merritt, S Clarke, L Commander and K Dixon. pp 51. Kings Park and Botanic Garden, Perth, Australia.

L'Huillier L., Wulff A., Fogliani B., Zongo C., Gâteblé G. and Jaffré T., 2010. – Chapitre 6. La restauration des sites miniers: 147-220, in L'Huillier L., Jaffré T., & Wulff A. (eds.), *Mines et Environnement en Nouvelle-Calédonie : Les milieux sur substrats ultramafiques et leur restauration*, Editions IAC, Nouméa Nouvelle-Calédonie.

Rowena L.L., Panetta F.D., Steadman K.J., Probert R., Bekker R.M., Brooks S., and Adkins S.W., 2008. Seed Persistence in the Field May Be Predicted by Laboratory-Controlled. Weed Science 56:523–528.

Zongo, C., 2010. Données biologiques et physiologiques sur les semences de quelques espèces de milieux

ultramafiques néo-calédoniens. Thèse de doctorat de l'Université de la Nouvelle-Calédonie, 228 pp.

3.4. PUBLICATIONS, COMMUNICATIONS ET MÉMOIRES LIÉES AU VOLET 1 :

3.4.1. PUBLICATIONS RÉALISÉES DANS LE CADRE DU PROJET OU DIRECTEMENT LIÉES AU SUJET ABORDÉ DANS CE PROJET:

Wulff A, Turner S, Fogliani B, and L'Huillier L., 2012. Smoke stimulates germination in two divergent Gondwanan species (*Hibbertia pancheri* and *Scaevola montana*) endemic to the biodiversity hotspot of New Caledonia. *Seed science research*, FirstView Articles, pp 1-6.

Zongo C., McGill C.R., Rabier J., Saintpierre D., L'Huillier L. and Fogliani B. Structure and biology of kuà seeds (*Alphitonia neocaledonica*) used for revegetation in New Caledonia. (En cours de révision)

Bordez L, Mewissen R, Fogliani B, L'Huillier L, Zongo C, Leveau A and Amir H. Floristic and seasonal heterogeneity of topsoil seed banks on ultramafic substrat, in Koniambo massif, New Caledonia. A soumettre (mai 2015).

3.4.2. COMMUNICATIONS DANS LA CADRE DU PROGRAMME ECOMINE BIOTOP OU RELIÉ AU SUJET ABORDÉ DANS CE PROGRAMME:

Amir H. and Fogliani B., 2012. Potentialités, suivi et gestion des topsoils, en vue de la restauration écologique des terrains dégradés par l'activité minière. Forum de l'OEIL "Vers un meilleur suivi des milieux terrestres du Sud. Nouméa, Nouvelle-Calédonie, 18-22 juin.

Amir H., L'Huillier L., Fogliani, B. and Bordez B., 2013. Restauration écologique après exploitation minière en Nouvelle-Calédonie. Où en est-on et quelles perspectives ? Séminaire « Quelles recherches Scientifiques en Province Nord ? », Poindimié, Nouvelle-Calédonie, 19-21 juin 2013.

Amir H., Fogliani B. and L'Huillier L., 2012. The "CNRT BioTop" project: the biological potential of New Caledonian ultramafic topsoils and its management for ecological restoration of degraded mining areas. Inaugural conference of the Society for Ecological Restoration Australasia (SERA), Perth, Western Australia, 27-30 November 2012.

Amir H. and Fogliani B., 2012. Potentialités, suivi et gestion des topsoils, en vue de la restauration écologique des terrains dégradés par l'activité minière. Forum de l'ŒIL sur le suivi des milieux terrestres du Sud, Nouméa 18-22 juin 2012

Bordez L, Jourand P, Ducousso M, Carriconde F, Cavaloc Y, Santini S, Mozar M, Leveau A and Amir H., 2014. Selective topsoil management of mined lands for vegetation communities restoration. 8th International Conference on Serpentine Ecology, Sabah, Malaisie, 9-13 June 2014.

Bordez L. , Jourand P. , Ducousso M. , Carriconde F. , Cavaloc Y. , Santini S. , Mozar M. , Leveau A., Fogliani B., L'Huillier L. and Amir H., 2014. Selective topsoil's mycorrhizal diversity management of mined lands for vegetation communities restoration in New Caledonian ultrmafic ecosystems of Konimabo massif. Congrès International sur les

Mycorhizes, Marrakech, Maroc, 15-17 Octobre 2014.

Fogliani, B. and L'Huillier L., 2011. Has the soil seed bank the capacity to restore high biodiversity areas? Some case studies from New Caledonian ultramafic environment. 4th World Conference on Ecological Restoration (SER2011), August 21-25, Merida, Mexico.

Fogliani B., L'Huillier L. and Wulff A., 2012. Restoration in a south Pacific biodiversity hotspot, the case of New Caledonia. Conference of the Society for Ecological Restoration Australasia (SERA), Perth, Western Australia, 27-30 November 2012.

Fogliani B., L'Huillier L., Medevielle V., Laurent A. and Vea C., 2013. *In situ* and *ex-situ* storage and longevity of seeds used for revegetation in New Caledonia. International conference on Seed Ecology IV. 27-30 July, Shenyang, China

Lagrange A., Amir H., Delrieu M. and L'Huillier L., 2014. *Costularia comosa* (Cyperaceae) responses to phosphate and nitrogen fertilization: effects on plant growth and development on New Caledonia's lateritic soils. 8th International Conference on Serpentine Ecology, 9-13 June 2014

Oddi A., L'Huillier L., Jaffré T. and Géraux H., 2012. Mine rehabilitation and forest restoration in New Caledonia: a challenge to conserve a unique biodiversity. Symposium International "Reclamation, Restoration and Rehabilitation Towards a Greener Asia ", 3~5 July 2012, Sunway Putra Hotel, Kuala Lumpur.

Zongo C., L'Huillier L., Wulff A., Villegente M., and Fogliani B., 2012. Restoration in a south Pacific biodiversity hotspot, the case of New Caledonia. Inaugural conference of the Society for Ecological Restoration Australasia, Perth, Australia, 27-30 Novembre 2012.

3.4.3. MÉMOIRES, RAPPORTS :

Goxe J. 2010. Comparaison de topsoils provenant de différentes formations de maquis pour la restauration écologique des sites miniers de Nouvelle-Calédonie. Stage de MASTER 2 mention « Gestion Environnementale des Ecosystèmes et des Forêts Tropicales », Engref Montpellier, IAC, avril-sept 2010, 172 p. Encadrement L. L'Huillier.

Matthieu R. 2013. Potentialités, suivi et gestion de la banque de graines des topsoils, en vue de la restauration écologique des terrains dégradés par l'activité minière. Master Professionnel Mention Sciences de la Vie et de la Santé Spécialité Biologie Intégrative des Interactions Plantes Microbes Environnement. Université de Bourgogne, 40 pp. Encadrement B. Fogliani.

Wulff A., Fogliani B., Véa C., L'Huillier L. 2012. Etude de la germination et de la levée de dormance d'espèces végétales endémiques du grand Sud de la Nouvelle-Calédonie. Rapport final de convention Vale Nouvelle-Calédonie (3eme année) Ed IAC. 41p.

4. VOLET 2 « CONNAISSANCE ET UTILISATION DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS »

Intervenants :

UNC-LIVE: Hamid Amir, tâches 1, 2 et 3 ; Yvon Cavaloc, tâche 1 ; Pascal Pagand ; tâche 3 ; Simon Gensous, doctorant, tâche 2 ; Valérie Médevielle, technicienne ; travaux sur les champignons mycorhiziens à arbuscules

LSTM, UMR 113 : Philippe Jourand, tâche 1, 2 et 3 ; Marc Ducousso, tâches 1, 2 et 3, Clarisse Majorel (IE) ; Laure Hannibal (IE) ; travaux sur les champignons ectomychoriziens.

SIRAS-Pacifique : Danielle Saintpierre, tâche 2, sous tâches 2 et 3 ; travaux sur les champignons mycorhiziens à arbuscules.

Léa Hatteschweiler : VCAT IAC/UNC, puis Audrey Laurent : contractuelle UNC/IAC.

Eliane Helly-Joly : contrat de technicienne en 2011 chez SIRAS-Pacifique, à mi-temps sur le projet CNRT BioTop.

Sarah Gigante: contrat de quelques mois, UNC (à moitié sur Ecomine BioTop).

UNC-PPME: Peggy Gunkel-Grillon ; Monika Lemestre technicienne : Contribution à la tâche 3 à travers les analyses de métaux dans les organes des plantes et les sols rhizosphériques.

4.1. OBJECTIFS, ORGANISATION ET DESCRIPTION DES TRAVAUX

Ce volet est divisé en 3 tâches :

- La tâche 1 vise à obtenir des informations scientifiques pertinentes pour une gestion optimale de la diversité des symbiotes fongiques (champignons ectomycorhiziens ou ECM et champignons mycorhiziens à arbuscules ou AMF) dans la restauration écologique des terrains miniers dégradés et la variation de cette diversité dans le cas de topsoil stocké. Par ailleurs, des gènes d'adaptation des champignons ECM au syndrome serpentinique sont recherchés en utilisant les techniques les plus actuelles dans ce domaine. Ces données pourront ensuite être utilisées pour choisir les modalités de l'expérimentation de mycorhization sur terrain.
- La tâche 2 consiste en plusieurs expériences en laboratoire et en serre visant à quantifier les effets des champignons mycorhiziens et à déterminer les conditions optimales de leur utilisation.
- Enfin, la tâche 3 correspond à une expérimentation intégrée sur le terrain, faisant intervenir toutes les équipes (en relation avec le volet 3 du projet) et permettant de tester *in situ* les effets des champignons ECM et des AMF sur 2 espèces végétales endémiques, en analysant tous les paramètres liés à l'adaptation et à la croissance des plantes.

4.1.1. TÂCHE 1 : DIVERSITÉ DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS ET ADAPTATION AU MILIEU ULTRAMAFIQUE

4.1.1.1. Diversité des AMF et variation de leur diversité au cours d'un stockage de topsoil

Au cours de cette étude, nous avons effectué une analyse de variation de la diversité des AMF en relation avec le stockage du topsoil. Pour cela, nous avons étudié la diversité des AMF présentant une association symbiotique avec les racines de plants ayant poussé sur un topsoil stocké en andain sur le terrain à Goro. Le topsoil provient d'une zone de maquis paraforestier (zone BS6) qui servira de témoin au cours de cette étude. Afin de vérifier s'il n'y a pas appauvrissement de cette diversité au cours du temps, une analyse similaire a été effectuée sur des plants provenant de la parcelle témoin BS6. Cette analyse ne pouvait pas se faire par l'analyse des spores présentes dans le topsoil, celles-ci étant trop rares et peu viables.

Des racines de 4 plants appartenant chacun à 5 espèces végétales différentes (*Alstonia sp., Alphitonia neocaledonica, Hibbertia sp., Scaevola sp.* et *Polyscias sp.*) ont donc été prélevées sur le terrain à la fois sur les parcelles B et BS6. Pour chacune de ces racines, le taux de mycorhization a été évalué puis l'ADN a été extrait et un fragment du gène de l'ADNr 18S a été amplifié par une double PCR. La première étape consiste en une amplification d'une région de 795 pb à l'aide des amorces AML1 et AML2 (Lee *et al*, 2008) (Fig. 54). Cette paire d'oligonucléotides permet l'amplification de l'intégralité des séquences fongiques, mais présente l'inconvénient d'amplifier également le gène 18S de l'espèce végétale hôte. Pour éliminer les séquences végétales, une seconde amplification est réalisée à l'aide des amorces AM1 et NS31 (Helgason *et al*, 1998; Simon *et al*, 1992). Le fragment de 550 pb obtenu est alors cloné dans la bactérie *E. coli* à l'aide du plasmide pGEM-T (Promega) et les clones individuels sont séquencés en utilisant la méthode de Sanger en utilisant le kit de séquençage BigDye Terminator v3.1 (ABI). Les séquences ont toutes été réalisées sur la plateforme du vivant hébergée à l'IRD.

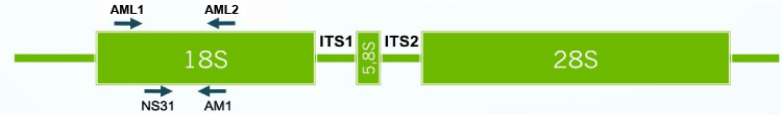


Figure 54 : Localisation des amorces utilisées pour l'amplification de l'ADNr 18S Le gène de l'ADNr (18S – ITS1 – 5,8S – ITS2 -28S) est représenté ici. Les amorces AML1/AML2 utilisées pour la première amplification et les amorces AM1/NS31 utilisées pour la seconde PCR sont indiquées. Le produit final contient 550 pb.

Il faut noter que 8 mois après le début de l'expérimentation, aucun plant de *Polyscias sp*. exploitable n'a pu être isolé sur le topsoil étalé. De la même façon, nous avons noté la présence de *Scaevola sp*. sur cette parcelle alors que cette espèce végétale n'a pas pu être retrouvée dans la parcelle témoin BS6. Par contre, lors de l'analyse finale réalisée à 18 mois, des plants de *Polyscias sp*. ont été retrouvé sur les 2 parcelles, à l'inverse de *Scaevola sp.* Cette dernière espèce a donc été écartée de l'étude à 18 mois.

4.1.1.2. Caractérisation moléculaire de champignon ECM : étude du modèle Pisolithus albus : déterminants moléculaires impliqués dans la tolérance au nickel

4.1.1.2.1. Diversité des champignons ectomycorhiziens des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie (UF)

Une collection de carpophores de champignons ectomycorhiziens (ECM) a été collectée dans les forêts et les maquis miniers des écosystèmes ultramafiques de Nouvelle-Calédonie. Leur ADN génomique a été isolé et le marqueur moléculaire ADN ITS a été amplifié puis séquencé pour permettre l'identification moléculaire des champignons identifiés selon le protocole de Cairnay et al., (2000). Des analyses statistiques et phylogénétiques ont permis l'identification moléculaire de ces champignons et de quantifier leur distribution et leur répartition selon les écosystèmes étudiés.

4.1.1.2.2. Caractérisation moléculaire de champignons ectomycorhiziens et Recherche de déterminants moléculaires de la tolérance au nickel

Suite à la caractérisation de la population de champignon ECM *Pisolithus albus* (Jourand et al., 2010a) et à l'étude de son rôle dans l'adaptation de sa plante hôte dans la tolérance au nickel (Jourand et al, 2010b), il a été prévu dans ce projet de mener l'identification des déterminants génétiques impliqués dans l'adaptation au « syndrome serpentinique », avec utilisation du nickel comme marqueur de l'ultramafisme, par analyse transcriptomique massive chez *Pisolithus albus*. A partir des souches de *P. albus* sensibles et tolérantes au nickel (isolées de sols ultramafiques) et caractérisées au LSTM (Jourand et al., 2010a,b), une étude transcriptomique par séquençage à haut-débit est développée pour mettre en évidence des marqueurs moléculaires de la tolérance au nickel.

Les souches de référence du champignon *Pisolithus albus* décrites précédemment sont cultivées *in vitro* dans des conditions contrastées d'apport de nickel, d'azote, de phosphate, de potassium et de rapport calcium/magnésium, représentatives des conditions des contraintes minérales majeures des sols ultramafiques. Les ARNm isolés dans ces différentes conditions sont séquencés par pyroséquençage 454 GS FLX version Titanium (Roche). Cette technique permet d'obtenir potentiellement la lecture de 400 millions de bases par cycle d'analyse (1 million de lectures unitaires, de taille moyenne 400bp). De plus, 12 marqueurs spécifiques sont disponibles permettant le traitement simultané de 12 échantillons (multiplexage). Le nombre de lecture par conditions expérimentales peut être évalué à >107 bp. Le nombre potentiel de gènes présents dans le génome des ECM varie approximativement de 10000 à 20000 avec une taille moyenne de 1,5-2 kb (Martin et al., 2008). Le traitement des données : assemblage des contigs, alignement des séquences (BLAST), analyses croisées permet potentiellement d'assurer une estimation quantitative de l'expression de chacun des gènes transcrits dans une condition donnée. Les résultats de ce premier criblage doivent fournir une liste de gènes candidats dont l'expression est significativement modulée en plus ou en moins selon les conditions des sols ultramafiques (Ni, N, P, K, Ca/Mg) dans les souches tolérantes au nickel des sols ultramafiques. Un nombre restreint de gènes est présélectionné sur la base de critères : (i) d'abondance, (ii) de niveau différentiel d'expression selon les conditions, (iii) de spécificité selon les conditions, (iv) d'analyse de la littérature et de connaissances sur d'autres organismes, (v) de présence de séquences homologues dans les bases de données.

Une analyse quantitative de l'expression des gènes candidats de l'adaptation ultramafique de *P. albus* a été menée. Les gènes candidats sélectionnés, ainsi que des gènes d'intérêt potentiel pour les fonctions de nutrition minérale sont utilisés pour construire une puce à ADN (DNA microarray). Cette puce permet d'analyser en parallèle l'expression d'un ensemble de gènes en priorité pour les éléments (N, P, K, Ca/Mg, Ni) pour lesquels un niveau différentiel d'expression

des gènes correspondant à cet élément (transporteurs, enzymes des voies d'assimilation) est mis en évidence dans la partie 3.1 : (i) cinétiques d'expression, (ii) modulation des concentrations de l'élément, (iii) expression en présence de la plante-hôte *Tristaniopsis* en dispositif contrôlé. Cette analyse est par la suite étendue aux autres éléments-clés du « syndrome serpentinique ». Certains gènes présentant potentiellement un comportement remarquable, par exemple très forte variation des niveaux d'expression, font ensuite l'objet d'une analyse plus quantitative par RT-qPCR.

4.1.2. TÂCHE 2 : EXPÉRIENCES DE MYCORHIZATION EN SERRE

Il s'agit de mener des tests pour des inoculations de champignons mycorhizien (ECM et AMF) en milieu contrôlé (serre).

4.1.2.1. Expériences de mycorhization en serre avec le champignon ECM *Pisolithus albus* montrant l'intérêt de la symbiose ectomycorhizienne dans l'adaptation de la plante à la contrainte édaphique.

Une expérimentation en serre sur la plante modèle *Eucalyptus globulus* de la famille des Myrtacae a été mise en place en 2011. Cette espèce est utilisée en remplacement de *Tristaniopsis* (prévu initialement dans le projet) en raison de la grande lenteur de développement des plantules de *Tristaniopsis* et du fait que les objectifs de l'expérience, ne nécessitent pas l'utilisation d'une plante endémique). 6 souches de champignons ectomycorhiziens de l'écotype ultramafique (3 souches tolérantes au nickel et 3 souches sensibles au nickel) ont été cultivées d'août à novembre 2011 pour préparer des inoculums. En novembre 2011, des semis d'Eucalyptus ont été effectués : les plants ont été repiqués en décembre et inoculés avec les champignons (le témoin est constitué d'inoculum tué par autoclavage). Les plants sont laissés tout le mois de décembre 2011 et janvier 2012 pour mycorhization. Ils sont ensuite repiqués sur substrat neutre (vermiculite) versus substrats ultramafiques pour tester le rôle des mycorhizes dans l'adaptation au substrat ultramafique. L'objectif sera de comprendre le fonctionnement de la symbiose au stade pépinière sur une plante modèle pour laquelle des données sont déjà connues afin de l'extrapoler ensuite sur les plantes endémiques.

4.1.2.2. Etude de l'influence de la fertilisation phosphatée sur la mycorhization par les AMF en serre

Cette étude concerne l'influence de la fertilisation phosphatée sur la mycorhization de 3 espèces végétales : *Costularia comosa* (cyperaceae), *Alphitonia neocaledonica* (Rhamnaceae), *Carpolepis laurifolia* (Myrtaceae). Cette étude a fait l'objet du deuxième chapitre de la thèse de doctorat de Simon Gensous (2014). Elle vise, sur le plan pratique, à déterminer les doses d'apport phosphaté favorable à la fois à la plante et aux AMF. On sait en effet que les doses fortes inhibent ces symbiotes et nos derniers travaux sur sols ultramafiques tendent à montrer que la carence en P est également défavorable à la mycorhization (Lagrange et al., 2013).

Cinq différentes concentrations de P ont ainsi été testées, en serre avec les espèces *A. neocaledonica* et *C. laurifolia*, inoculées ou non avec un mélange de 3 souches AMF isolées de sols ultramafiques : 83 mg/kg ; 207 mg/kg ; 414 mg/kg ; 827 mg/kg ; 1655 mg/kg. Pour l'espèce *C. comosa*, les doses de P utilisées sont 3 fois plus faibles, car cette espèce est moins exigeante. Des doses constantes moyennes de N et K (respectivement 300 et 163 mg/kg) ont aussi été rajoutées afin que ces éléments ne soient pas limitant. Les plantes sont cultivées dans des pots de 2 L sur sol ultramafique additionné de 25% de terreau, le tout étant stérilisé par autoclavage avant inoculation avec les souches AMF. 10 pots par espèce végétale sont

préparés pour chaque traitement testé. Divers paramètres ont ensuite été suivis (croissance, mycorhization par la technique décrite au volet 1) ou mesurés en fin d'expérience, 12 à 14 mois après la mise en pot (sporulation des AMF par la technique décrite au volet 1, biomasse des plants, teneur en eau des plants, éléments essentiels et métaux dans la plante et dans le sol : P, N, K, Ca, Mg, Fe, Ni, Co, Mn, Cr).

4.1.2.3. Enrobage de graines avec des spores AMF

Cette sous tâche a consisté à étudier l'enrobage de graines de plantes avec des spores AMF. L'étude a pour objectif de mettre au point une technique pour mycorhizer les plantes lors de revégétalisation utilisant les techniques d'ensemencement hydraulique (hydroseeding) ou sec (dryseeding). L'enrobage est réalisé en utilisant une solution d'alginate dans laquelle les spores AMF, extraites à partir d'inocula sur sol, sont mises en suspension. L'alginate (polysaccharide muqueux) se gélifie autour des graines après addition de CaCl2.

Des graines de tailles et d'aspects différents appartenant à quatre espèces végétales ont été testées (Fig. 55) : *Alphitonia neocaledonica* (Rhamnaceae), *Dodonea viscosa* (Sapindaceae), *Costularia comosa* (Cyperaceae) et *Gymnostoma deplancheanum* (Casuarinaceae).



Figure 55 : Aspects des graines des 4 espèces végétales testées pour l'enrobage des graines avec des AMF.

De nombreux essais sont réalisés afin de déterminer la bonne concentration d'alginate et les conditions d'enrobage (pH, mode d'enrobage, séchage de l'enrobage, Fig. 56), puis pour vérifier si cet enrobage n'empêche pas la germination des graines et des spores AMF. Enfin, des essais en serre, avec une plante modèle (le sorgho) sont mis en place pour vérifier si les plants issus de ces graines enrobées se mycorhizent correctement, en comparaison avec des plants inoculés en AMF par la méthode classique (spores mises au contact des racines). Les plants de sorgho sont cultivés en pots d'1 L sur un sol non-ultramafique stérilisé à l'autoclave, pour éliminer notamment les AMF présents naturellement dans le sol. 20 plants (10 pots) sont préparés pour chaque traitement.

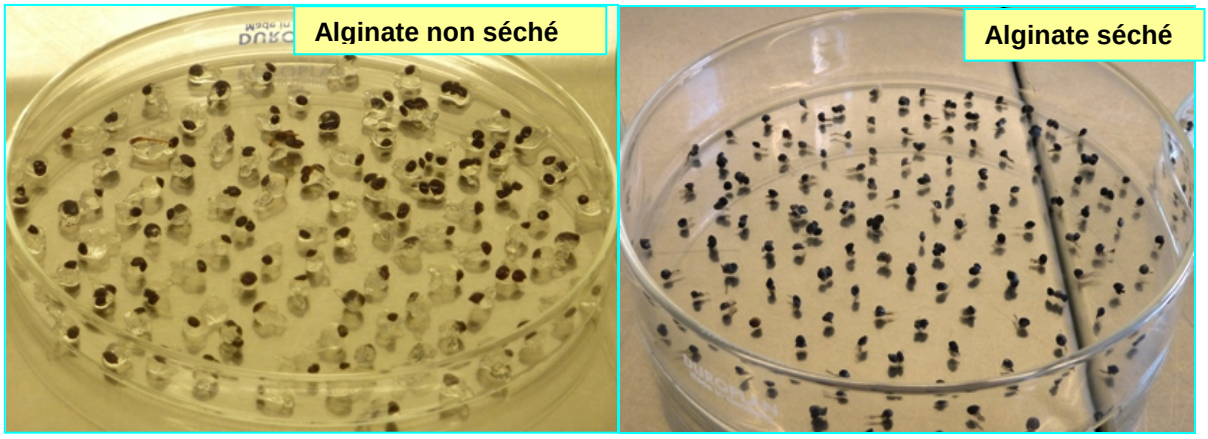


Figure 56 : Graines d'*A. neocaledonica* enrobées avec des spores inclues dans de l'alginate.

Enfin, les derniers essais consistaient à introduire les graines enrobées dans le mélange utilisé pour l'ensemencement hydraulique (hydroseeding) (mélange fourni par SIRAS-Pacifique , contenant notamment du mulch organique, des minéraux et des composés collants : nature exacte non précisée), puis les soumettre à une certaine agitation pour vérifier si l'enrobage résistait correctement et si le mélange en question n'induisait pas d'inhibition de la germination des spores et des graines ainsi enrobées.

4.1.3. TÂCHE 3 : EXPÉRIMENTATION SUR LE TERRAIN : ESSAI D'INOCULATION CONTRÔLÉE DE DEUX ESPÈCES VÉGÉTALES AVEC DES CchampignonS ECTOMYCORHIZIENS ET MYCORHIZIENS À ARBUSCULES, SUR UN TOPSOIL REPLACÉ APRÈS EXPLOITATION MINIÈRE ET AMENDÉ OU NON EN BOUE DE STATION D'ÉPURATION

4.1.3.1. Introduction

Suite aux études de laboratoire et en serre démontrant le rôle des champignons mycorhiziens dans le développement et l'adaptation aux sols ultramafiques de diverses espèces végétales (Amir et al., 2013 ; Jourand et al., 2014), ce projet nous donnait l'opportunité de passer à l'étape terrain.

Aucune expérimentation de ce type n'a été rapportée en milieu ultramafique dans le monde. Sur le plan pratique, il s'agit d'évaluer l'apport relatif d'une inoculation contrôlée avec des souches fongiques sélectionnées, en termes de croissance et d'adaptation des plantes aux maquis miniers et les effets de synergie possible avec un apport de boues de station d'épuration (boues de STEP), riches notamment en phosphore. Elle vise donc aussi à vérifier l'influence des boues de STEP sur la mycorhization des plants.

Cette expérimentation nous permet également d'étudier l'influence distincte sur la croissance des plantes des boues de STEP, même si d'autres études ont déjà été réalisées sur ce sujet en Nouvelle-Calédonie (notamment Velayoudon et al., 2014). L'importance de l'apport de matière organique dans le succès de l'installation d'une nouvelle couverture végétale lors de la restauration de sites dégradés a été démontrée. Dès la fin des années 70s, Berry et Marx (1977) montrent, dans une expérimentation en pot, que la croissance de *Pinus taeda* est améliorée lors de l'apport de boues d'épuration sur des déblais de mines de kaolin. Depuis, d'autres travaux ont été réalisés soit sur déblais de mine de Bauxite (Brofas et al., 2000) ou de cuivre (Sabey et al., 1990).

Si l'usage de ces boues augmente la production végétale, il semble diminuer, dans certains

cas, le taux de colonisation racinaire par les AMF (Sainz et al., 1998 ; Angle et Heckman, 1986). Arriagada et al. (2009) ont montré que des boues riches en métaux lourds ou un apport de boues de pH acide implique une réduction de la mycorhization tant du soja que de l'eucalyptus. Toutefois, Thorne et al. (1998) précise que, certes l'apport de boues d'épuration implique une réduction de la colonisation des herbacées utilisées dans son expérimentation, mais ne gêne en rien les plants déjà mycorhizés. Il est donc important de vérifier quelle influence ont les boues de STEP sur les AMF dans les conditions des sols ultramafiques néocalédoniens.

Cette étude vise ainsi à : i) tester l'influence des AMF sur la croissance et l'adaptation de plantes endémiques inoculées en pépinières, ii) tester l'influence des boues de STEP sur la croissance de ces plantes, iii) tester les interactions entre ces deux traitements.

4.1.3.2. Dispositif et protocole expérimentaux

4.1.3.2.1. Mise en place de l'expérimentation

L'expérimentation sur le terrain est mise en place à Goro (voir la situation du terrain en Fig. 1).

Le sol servant de support est un ancien topsoil stocké qui a été étalé plusieurs années auparavant. L'intérêt de travailler sur un topsoil ancien est d'avoir ainsi peu de compétition entre les AMF apportés par les plants inoculés et ceux du terrain. En effet, ce topsoil contenait, juste avant l'expérimentation, uniquement 22 spores d'AMF/100g de sol, alors que le sol du milieu naturel environnant comportait 4489 spores/100g.

Les espèces végétales utilisées pour cette exprimentation sont *Tristaniopsis glauca* (Myrtaceae), espèce à la fois ectomycorhizée et endomycorhizée dans la nature et *Carpolepis laurifolia* (Myrtaceae) uniquement endomycorhizée (AMF).

Sur le site de l'IAC Port-Laguerre, ont été préparées, en serre, une série de semis de *T. glauca* (en remplacement de *T. guillainii* à cause de la difficulté à obtenir des semences et des taux de germination faibles) et une série de semis de *C. laurifolia.* Les plantules sont placées dans un terreau fin stérile, en terrine. En parallèle, les souches fongiques ont été préparés pour l'inoculation: inoculum endomycorhizien à l'UNC (3 souches AMF sélectionnées, RARC1, PSB1 et PSO1, utilisées en mélange) et inoculum ectomycorhizien à l'IRD (*P. albus* souche 337, écotype ultramafique Ni-tolérant, ref : Jourand et al, 2010a). A la fin de l'année 2010, environ 500 plantules de *T. glauca* et 350 de *C. laurifiolia* ont été repiqués en sac de 1 litre contenant 750 ml d'un mélange terreau/vermiculite/sable (1/1/1). Parmi eux 150 plants de *T. glauca* ont été inoculés avec *P. albus* et 150 plants avec un mélange des 3 souches AMF. 150 plants de *C. laurifolia* ont également été inoculés avec les souches AMF.

La croissance des plants de *Tristaniopsis* en pépinière s'est révélée très lente. En effet, alors que les plants de *Carpolepis* avaient atteint la taille nécessaire pour être mis sur le terrain en 2011 (environ 20-22 cm pour les mycorhizés, 8-12 cm environ pour les témoins), les plants de *Tritaniopsis* restaient petits (8 cm pour les plants mycorhizés avec ECM, 3 à 7 cm pour les non mycrorhizés). Ces différentes mesures montrent que la mycorrhization des plants en pépinière est avantageuse. Pour doper la croissance des *Tristaniopsis,* il a été décidé de les traiter avec un amendement organique sur feuille (Cambo), en pépinière. Pour ces raisons, l'expérimentation n'a pu être mise en place à Goro qu'en mai 2012, d'autant que les conditions en novembre décembre ne sont pas sûres en termes d'humidité du sol. Les plants étant petits, une absence de pluies de plus d'une dizaine de jours aurait suffit à les tuer.

Le dispositif de terrain comporte 4 parcelles de 25 plantes pour chaque traitement ce qui

permet une étude statistique détaillée des résultats (Figs. 57, 58 et 59).

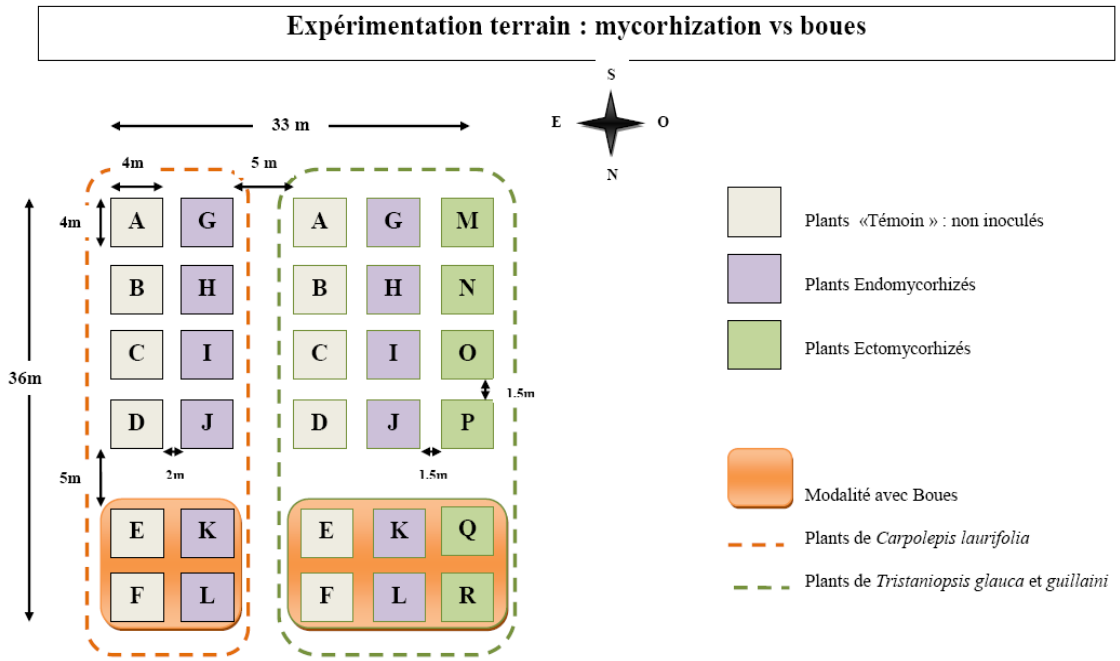


Figure 57 : Dispositif de l'expérimentation au champ sur l'influence de la mycorhization et des boues de station d'épuration (combinées ou non) sur la croissance des plants de *Carpolepis laurifolia* et *Tristaniopsis glauca*.

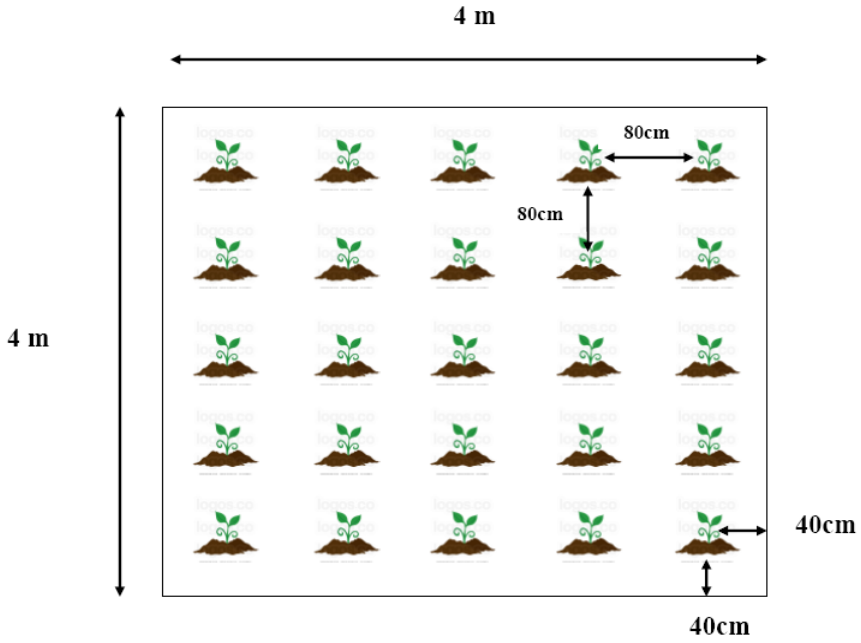


Figure 58 : Détail d'une parcelle (25 plants) du dispositif expérimental précédent.



Figure 59 : Vue du terrain et des parcelles (délimitées avec des cordons) au moment de la mise en place de l'expérimentation.

Comme il existe une très faible pente, les placettes amendées en boues de STEP sont mises en « zone basse » pour éviter d'éventuelles contaminations des placettes non amendées. Dans chacune de ces placettes 25 plants sont installés en ligne soit 5 lignes de 5 plants représentant une densité d'environ 15 500 plants par hectare.

Les placettes amendées en boues font l'objet d'un apport de 158 g de boue de STEP fraiche, directement introduits dans le trou de plantation. Ces boues sont mélangées avec une poignée d'hydrorétenteur déjà hydraté et avec le sol en place, avant d'y installer le plant avec son terreau de pépinière. Le trou est alors rebouché avec le topsoil du terrain. Dans les placettes non amendées, seul l'hydrorétenteur est introduit.

- *Caratéristiques des boues de STEP utilisées :*

Les boues de STEP utilisées proviennent des lits de séchage de l'usine VALE-NC qui traite ses eaux usées directement sur le site. La technique de traitement de l'eau est basée sur une technologie à biomembrane. Les boues liquides sont ensuite transférées dans des lits de séchage.

Les boues utilisées au cours de cette étude présentent un taux de matière sèche de 57,3±1,1 % et 87,2±0,4 % de cette matière sèche est composée de matière minérale. (Tab. 4).

Tableau 4 : Quelques caratéristiques physico-chimiques des boues utilisées

Caratéristiques	Valeur moyenne
Siccité (%)	57,3
Matière minérale (en % de la matière sèche)	87,2 ± 0,4
Matière organique (en % de la matière sèche)	12,8 ± 0,4
Azote total (mg/g)	22,73 ± 4,01
Phosphore total (mg/g)	4,44 ± 0,58
N/P	11,5 ± 1,6

Ces boues sont peu chargées en matière organique (12,8% de la matière sèche), ceci étant probablement lié à la forte proportion en graviers certainement issus des lits de séchage. Elles

contiennent 0,44±0,06% et 2,27±0,80% de phosphore total et d'azote total respectivement avec un rapport N/P de 11,5±1,6.

Ainsi, les différents plants qui ont reçu un apport de boues ont reçu, 90,8 g de matière sèche dont 11,5 g de matière organique, 0,4g et 2.1g de phosphore et d'azote total respectivement.

4.1.3.2.2. Suivi et analyses réalisées

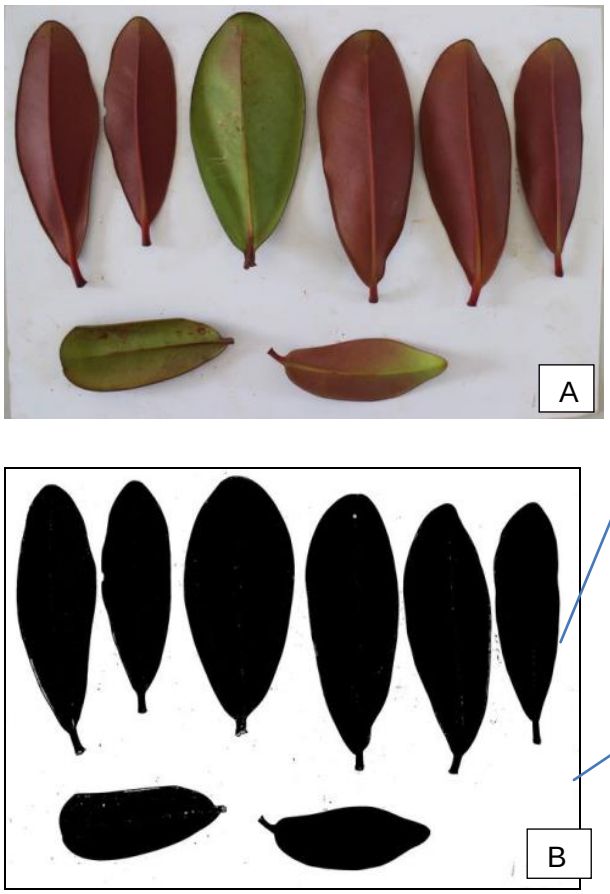
Un suivi est réalisé sur une période de 18 mois. Il comprend un suivi régulier de la croissance des plants (hauteur, ramifications) et de leur mycorhization. Le nombre de feuilles est mesuré en début puis en fin d'expérimentation. En fin d'expérience, une partie des plants est collectée en vue de réaliser des analyses précises: poids frais et poids sec (uniquement partie aérienne, la partie racinaire étant difficile à collecter dans sa totalité sur le terrain), surface foliaire, dosage des éléments importants (P, N, K, Ca, Mg) et des métaux lourds (Ni, Mn, Co, Cr).

Après prélèvements, en fin d'expérimentation, chaque plant est marqué individuellement (Fig. 60), placé dans une pochette en polyéthylène et transporté au laboratoire pour préparer les différentes analyses.



Figure 60 : Plants sacrifiés le 10 octobre 2013. Exemples de *Tristaniopsis glauca* (à gauche) et de *Carpolepis laurifolia* (à droite) issus de parcelle témoin (sans boue et sans mycorhization).

Les plants prélevés sont rincés à l'eau distillée, puis les racines, tiges et feuilles sont séparées. Les feuilles sont d'abord étalées sur une feuille de papier A4 et photographiées. La surface foliaire (utilisé comme une des mesures de croissance) est ainsi estimé en utilisant le logiciel **ImageJ.** les clichés numériques précédemment obtenus sont transformés en images bicolores où les feuilles sont transformées en pixels noirs alors que le fond est transformé en pixels blancs (Fig. 61), ce qui permet aisément de calculer la surface foliaire en se basant sur les nombres de pixels.



Couleur	Nb pixel
0	**5713461**
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
...	0
250	0
251	0
252	0
253	0
254	0
255	**7175819**

Figure 61 : Méthode pour l'estimation de la surface foliaire. A : feuille étalées sur feuille A4 ; B : transformation en image bicolore par ImageJ ; calcul du nombre de pixels de chaque couleur par ImageJ.

Une analyse de l'évolution des souches AMF au niveau des racines des plants de *Carpolepis laurifolia* par séquençage de l'ADNr 18S est également réalisée (aspects techniques en tâche 1-1 de ce volet), afin de vérifier si elles se maintiennent ou si elles sont supplantées par d'autres souches provenant du milieu.

4.2. TRAVAUX RÉALISÉS ET RÉSULTATS OBTENUS

4.2.1. TÂCHE 1 : DIVERSITÉ DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS ET ADAPTATION AU MILIEU ULTRAMAFIQUE

4.2.1.1. Diversité des champignons mycorhiziens et variation de leur diversité au cours d'un stockage de topsoil

La partie biodiversité générale des sols ultramafique ne sera pas traitée ici. Elle a fait l'objet d'un article soumis, cité dans la liste des publications produites. Ces résultats n'intéressent pas fondamentalement la problématique du projet BioTop, de sorte que nous avons préféré nous focaliser ici sur les variations de cette diversité au cours d'un stockage de sol ou d'une expérimentation sur le terrain avec les AMF.

4.2.1.1.1. Evaluation de la mycorhization

L'analyse microscopique des racines des divers plants prélevés montre que tous les échantillons racinaires présentent une colonisation de leurs tissus par des AMF (Fig. 50). En effet, les hyphes inter- et intra- cellulaires sont assez abondants et présentent une fréquence de mycorhization (F%) élevée et homogène sur les différentes espèces au niveau des deux habitats. La fréquence de mycorhization est comprise entre 80 et 100%, exceptée chez *Hibbertia sp.* dans la parcelle BS6 à 6 mois où la fréquence de mycorhization moyenne est de 60%.

Si on observe une augmentation de l'intensité globale de mycorhization à la fois sur topsoil stocké et la parcelle témoin BS6 au cours du temps, aucune différence notable de la mycorhization n'est observée entre ces 2 parcelles (Fig. 62), indiquant que le déplacement et le stockage du topsoil n'a pas affecté fortement le potentiel mycorhizogène du sol.

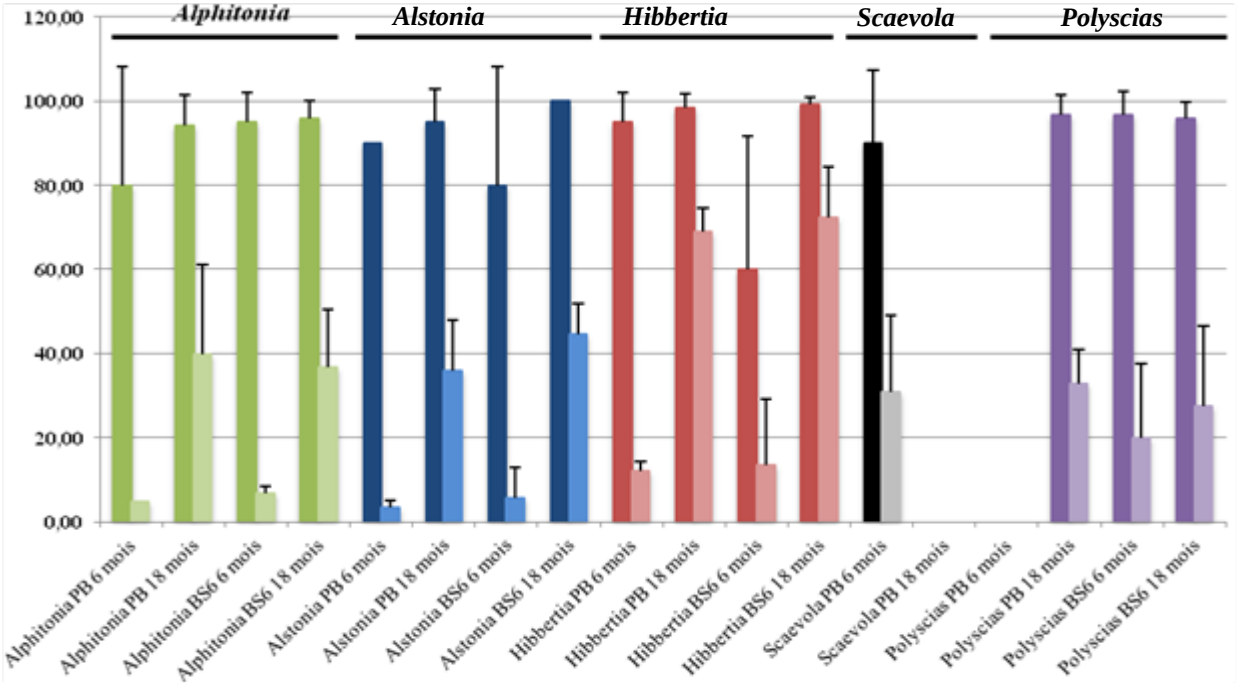


Figure 62 : Mycorhization des plants étudiés sur topsoil étalé en andain et dans la parcelle témoin. Pour chaque espèce analysée la fréquence (F%) et l'intensité globale (M%) de mycorhization sont indiquées par des barres jointes. La première représente la fréquence et la seconde (en plus clair) indique l'intensité. PB= terrain contenant le topsoil étalé (dite parcelle B) à en andain, BS6= parcelle BS6 témoin.

4.2.1.1.2. Analyse de la diversité des AMF

Afin d'analyser la diversité des AMF présente dans le topsoil stocké et dans la parcelle voisine de la zone de prélèvement de ce topsoil, l'ADN extrait de racines de 5 espèces végétales a été analysé afin d'identifier les espèces présentes.

Pour la première analyse réalisée 6 mois après l'étalement du topsoil, 427 séquences individuelles ont été obtenues. Ces 427 séquences ont été alignées à l'aide du logiciel MAFFT (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/). Ces séquences ont alors été regroupées par groupe d'homologie (OTU pour Operational Taxonomic Unit) en utilisant le logiciel MOTHUR en fixant

le taux d'homologie à 97%.

Le tableau 5 reprend les données obtenues à l'issue du séquençage des 427 clones individuels.

Tableau 5 : Diversité en AMF observée sur topsoil stocké en andain et dans la parcelle témoin (BS6)

	Topsoil en andain					Parcelle BS6 (Témoin)					
	Alphitonia	*Alstonia*	*Hibbertia*	*Scaevola*	**Tot.**	*Alphitonia*	*Alstonia*	*Hibbertia*	*Polyscias*	**Tot.**	**TOTAL**
Nombre de séquences	47	57	59	46	**209**	61	50	46	61	**218**	**427**
Nombre d'OTU	13	21	17	16	**35**	13	20	14	14	**40**	**54**
Séquences / OTU	3,62	2,71	3,47	2,88	**5,97**	4,69	2,50	3,29	4,36	**5,45**	**7,91**
Indice de Shannon	1,3	2,28	1,26	1,45		1,53	2,25	1,03	1,79		

D'après les données récapitulées dans le tableau 2, on s'aperçoit que des variations légères existent en termes de diversité globale en AMF. Néanmoins, si quelques variations sont visibles entre les espèces, la diversité générale ne semble pas affectée par un stockage de quelques mois du topsoil.

Sur les 54 OTU identifiés pour l'ensemble des séquences, 40 ont été retrouvés dans la parcelle témoin contre seulement 35 dans le topsoil étalé. Cependant, l'échantillonnage est également légèrement plus élevé sur la parcelle BS6 que sur le topsoil étalé (218 séquences contre 209, respectivement). Au total, chaque OTU identifié dans la parcelle BS6 et le topsoil stocké présente en moyenne un nombre de séquence globalement identique (5,45 contre 5,97). Ces différences ne sont pas significatives compte tenu du fait que nous n'atteignons pas encore l'identification de tous les AMF présents dans la rhizosphère des plantes étudiées. Des méthodes d'investigation plus performantes, mais plus couteuses (NGS pour Next Generation Sequencing) permettraient d'affiner ces résultats.

Nous avons donc tenté d'identifier dans une seconde approche, quelles sont les espèces, ou tout au moins, les genres de champignons endomycorhiziens que nous identifions dans les racines des plantes étudiées. Pour ce faire, les 427 séquences obtenues, regroupées en OTU ont été alignées avec les séquences des gloméromycètes isolées à partir des banques de données (Genbank – *http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank* et MaarjAM - *http://maarjam.botany.ut.ee/;* (Opik *et al*, 2010; Krüger *et al*, 2012) *).*

L'alignement obtenu a été utilisé pour reconstruire un arbre phylogénétique incluant les séquences de référence et les séquences identifiés dans nos deux parcelles. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 62 et résumés dans le tableau 6.

Les séquences issues des bases de données sont indiquées avec leur code d'accès. Les séquences notées SSUcons#XX sont extraites de Krüger *et al* (2012). Les branches regroupant les séquences appartenant au même genre sont regroupées sous une même couleur. Les familles et les ordres sont indiqués sur la droite de la figure 63. Les séquences appartenant au même ordre sont entourées par un cadre pointillé.

Les séquences correspondant aux OTU que nous avons définies sont indiquées par TOPSOIL_XX. Les OTU ne comprenant que des séquences retrouvées dans la parcelle témoin BS6 sont suivies d'un rectangle blanc. Ceux qui ne comprennent que des séquences retrouvées dans le topsoil étalé sont suivis d'un rectangle noir. Les séquences retrouvées sur les 2 sites sont suivies d'un rectangle bicolore.

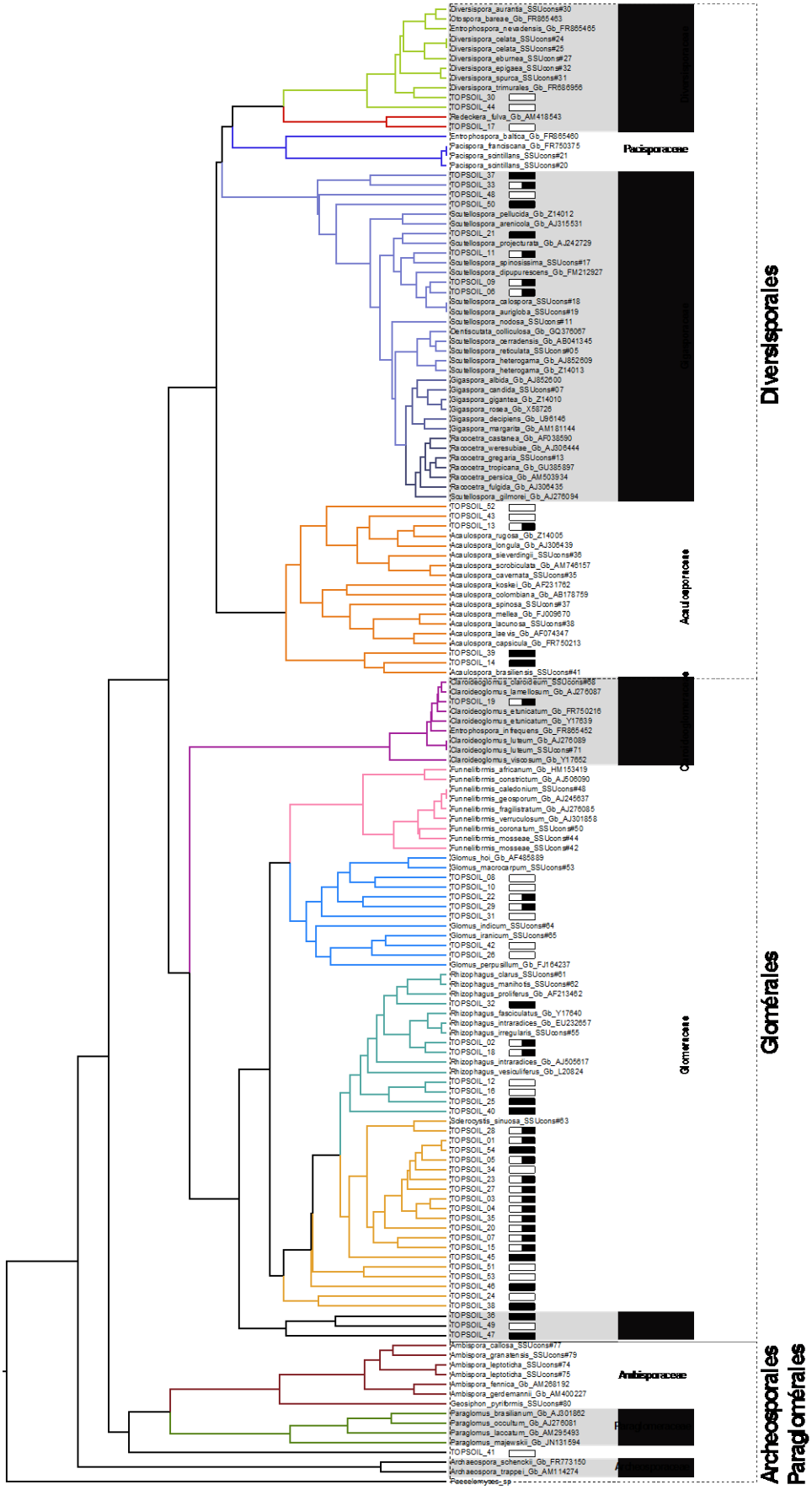


Figure 63 : Arbre phylogénétique des séquences d'AMF observées sur les 2 parcelles

d'étude

Tableau 6 : Diversité des AMF isolés des racines de plantes sur topsoil en andain et dans la parcelle témoin (BS6).

Le nombre de séquences d'AMF identifiées dans les racines des plantes étudiées pour chaque genre est indiqué. Le ligne « indéfini » correspond à des séquences situées à la racine des Glomeraceae et qu'il est donc difficile de placer de manière certaine.

				Topsoil en andain					Parcelle BS6 (Témoin)					
				Alph	Alst	Hibb	Scae	**Tot**	Alph	Alst	Hibb	Poly	**Tot**	**TOT**
Glomeromycètes	**Diversisporales**	Diversisporaceæ	*Diversispora*	0	0	0	0	**0**	0	1	2	0	**3**	**3**
			Redeckera	0	0	0	0	**0**	0	6	0	0	**6**	**6**
		Pacisporaceæ	*Pacispora*	0	0	0	0	**0**	0	0	0	0	**0**	**0**
		Gigasporaceæ	*Scutellospora*	16	6	4	15	**41**	16	0	5	1	**22**	**63**
			Gigaspora	0	0	0	0	**0**	0	0	0	0	**0**	**0**
			Racocetra	0	0	0	0	**0**	0	0	0	0	**0**	**0**
		Acaulosporaceæ	*Acaulospora*	0	11	0	5	**16**	1	2	0	1	**4**	**20**
	Glomérales	Claroideoglomeraceæ	*Claroideoglomus*	0	2	1	0	**3**	0	2	0	0	**2**	**5**
		Glomeraceæ	*Funneliformis*	0	0	0	0	**0**	0	0	0	0	**0**	**0**
			Glomus	1	2	0	0	**3**	12	5	5	16	**38**	**41**
			Rhizophagus	2	16	12	13	**43**	0	7	1	18	**26**	**69**
			Sclérocystis	28	19	41	13	**101**	32	26	32	25	**115**	**216**
			Indéfini	0	1	1	0	**2**	0	0	1	0	**1**	**3**
	Archaeo sporales	Ambisporaceae	*Ambispora*	0	0	0	0	**0**	0	0	0	0	**0**	**0**
			Géosiphon	0	0	0	0	**0**	0	0	0	0	**0**	**0**
		Archeosporaceæ	*Archeospora*	0	0	0	0	**0**	0	0	0	0	**0**	**0**
	Paraglomé rales	Paraglomeraceæ	*Paraglomus*	0	0	0	0	**0**	0	1	0	0	**1**	**1**

D'après ces données, on note une nette prédominance des Glomeraceæ et plus particulièrement des genres *Rhizophagus* et *Sclérocystis* dans les racines des plants étudiés. Il est à noter que sur la région d'ADN que nous avons étudiée, il est difficile de distinguer ces deux genres génétiquement proches. Néanmoins, pris ensemble, ils représentent 69 % des séquences identifiées dans les racines des plantes apparues dans le topsoil étalé et 65 % dans celles obtenues sur la parcelle témoin.

On note également la présence d'un nombre important de Gigasporaceae, majoritairement appartenant au genre *Scutellospora*.

Si d'une manière générale, le stockage du topsoil sur une période courte (6 mois) ne semble pas affecter la diversité globale des AMF, certains genres semblent moins représentés après ce déplacement. C'est notamment le cas des Glomus qui représentent 38 séquences dans la parcelle BS6 (17,5 %) alors que leur part n'est que de 1,5 % dans le topsoil étalé. A l'inverse, les Acaulospora qui représentaient moins de 2 % des séquences dans la parcelle BS6 sont présents à près de 8 % dans le topsoil étalé. Ces données sont évidemment à prendre avec la

plus grande prudence, car comme indiqué plus haut, l'effort d'échantillonnage ne nous permet pas encore d'atteindre une représentation exacte de la diversité des AMF.

Notons également l'absence totale de Funeliformis dans les deux parcelles étudiées. Ce fait confirme des résultats obtenus dans diverses études réalisées au sein du laboratoire. En effet, ce genre, pourtant largement répandu dans le monde semble être absent, au moins des terrains ultramafiques en Nouvelle-Calédonie, ce qui tend à démontrer que ce genre est particulièrement peu adapté à la forte contrainte édaphique rencontrée sur les sols miniers.

Ces tendances seront à confirmer avec l'analyse globale de la diversité à 18 mois. Cette étude est actuellement en cours de finalisation. Les ADN sont extraits, clonés et plusieurs clones sont déjà séquencés. Il reste encore à obtenir quelques séquences supplémentaires afin d'augmenter la représentativité statistique des résultats. L'analyse des derniers résultats permettra de confirmer ces tendances générales.

4.2.1.2. Caractérisation moléculaire de champignons ECM : étude du modèle Pisolithus albus : déterminants moléculaires impliqués dans la tolérance au nickel

4.2.1.2.1. Diversité des champignons ectomycorhiziens de sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie (UF)

Nous avons pu montrer l'importance des champignons ECM dans les forêts et maquis miniers et leur diversité importante en terme de genres rencontrés (*Boletellus, Cortinarius, Pisolithus et Russula*). L'ensemble de ces résultats a fait l'objet de 2 publications sous forme de chapitre d'ouvrage :

- Prin Y., Ducousso M., Tassin J., Béna G., Jourand P., Dumontet V., Moulin L., Contesto C., Ambrosi J.P., Chaintreuil C., Dreyfus B., Lebrun M. Ectotrophic mycorrhizal symbioses are dominant in natural ultramafic forest ecosystems of New Caledonia. New York : Nova Science, 2012, p. 25-48. (Environmental Science, Engineering and Technology). ISBN 978-1-62081-278-5.
- Jourand et al, 2014a. Jourand P., Carriconde F., Ducousso M., Majorel C., Hannibal L., Prin Y. and Lebrun M. 2014b. Diversity and adaptation of ectomycorrhizal symbioses to ultramafic soils in New Caledonia. pp 101-125. In : Amadou M. Bâ, Krista L. McGuire, Abdala G. Diédhiou (eds) Ectomycorrhizal Symbioses in Tropical and Neotropical Forests. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 300p.

Un exemplaire de chaque chapitre d'ouvrage au format pdf figure dans les annexes du rapport

Les résultats majeurs font apparaitre que la symbiose ectomycorhizienne (plante-champignon) est une symbiose dominante dans les forêts et les maquis miniers des écosystèmes ultramafique de Nouvelle-Calédonie. Les principaux genres de champignons ectomycorhiziens rencontrés appartiennent aux genres *Boletellus, Cortinarius, Pisolithus et Russula*. Certains résultats majeurs et remarquables sont exposés ci-après :

De nouvelles espèces remarquables de champignons ont pu être déterminées comme les espèces (A) *Podoserpula miranda* and (B) *Cantharellus garnieri* (Fig. 64)



Figure 64 : Nouvelles espèces de champignons décrites (A) *Podoserpula miranda* and (B) *Cantharellus garnier*i.

Certains genres comme *Pisolithus* (Fig. 65) développent des populations fongiques spécifiques (ou écotypes) adaptées aux sols ultramafiques (Jourand et al, 2010a).



Figure 65 : Illustration du champignon *Pisolithus albus* isolé en Nouvelle-Calédonie sur sol ultramafique (A) ou volcano-sédimentaire (B), avec une coupe transversale du carpophore (C) et une image illustrant les spores de ce champignon (D).

Ces *Pisolithus* groupent phylogénétiquement avec ceux d'Australie et de Nouvelle-Zélande comme le montre la figure 66 présentant l'arbre phylogénétique basé sur le séquençage du marqueur moléculaire (ADN ITS) de isolats prélevés en Nouvelle-Calédonie en comparaison à ceux des autres continents. Ce résultat majeur va dans le sens de l'hypothèse générale de la colonisation des champignons en Nouvelle-Calédonie par voie de dispersion aérienne (Jourand et al., 2010a).

De plus, un autre fait marquant a été observé pour les isolats de *Pisolithus albus* prélevés en Nouvelle-Calédonie : les isolats de *Pisolithus albus* provenant de sols ultramafiques groupent phylogénétiquement ensemble en comparaison à ceux provenant des sols volcano-sédimentaires, comme le montrent sur la figure 67 l'analyse AFLP (graphe A) et l'analyse statistique de cette AFLP en composante principale (graphe B).

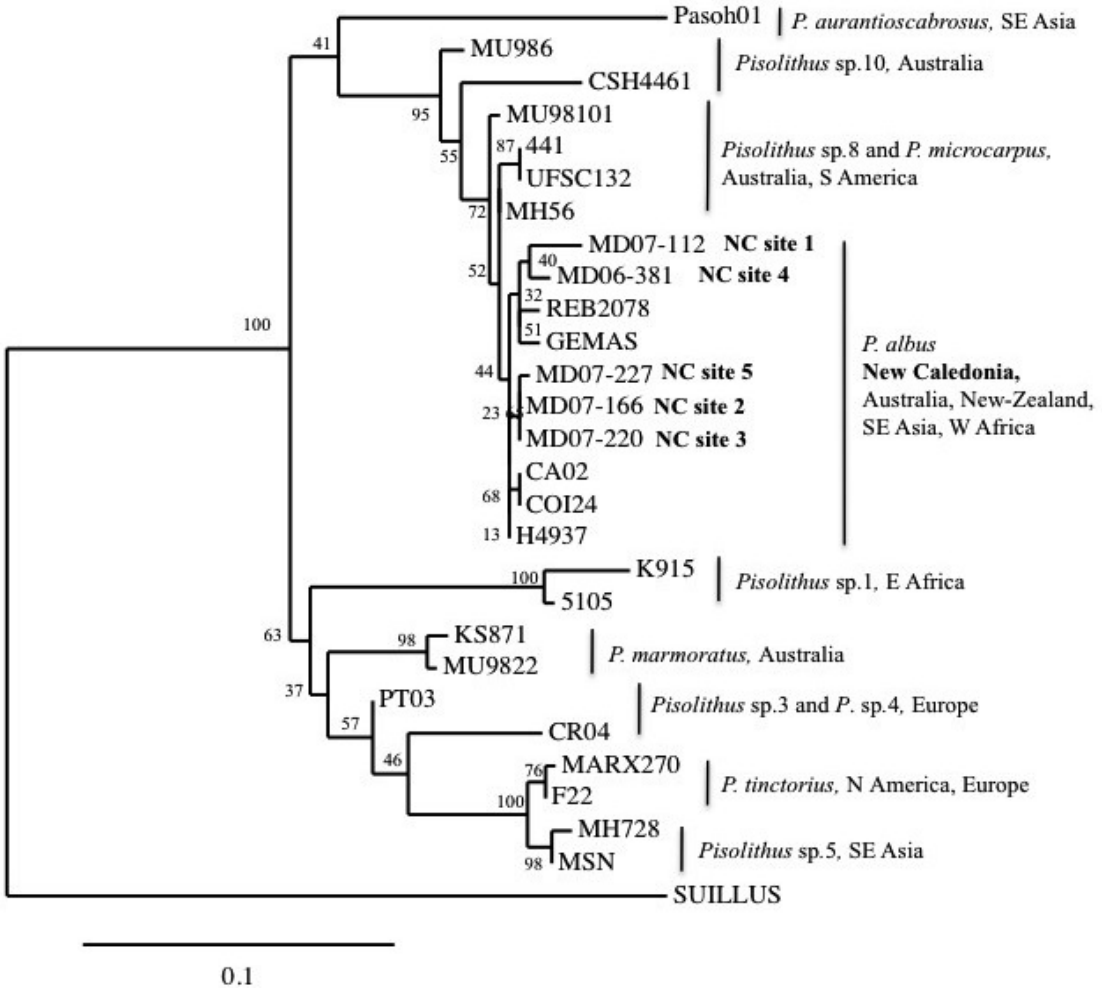


Figure 66 : Phylogénie moléculaire basée sur le séquençage de l'ADN ITS des isolats de *Pisolithus albus* provenant de Nouvelle-Calédonie en comparaison à ceux des autres continents.

Tous ces résultats sont en accord avec les travaux récents d'autres auteurs tels ceux de Urban et al (2008) ou Branco et al. (2010a,b): ces auteurs avaient décrit la diversité des champignons ectomycorhiziens (ECM) sur d'autres sols ultramafiques (USA et Europe) en insistant sur le fait que, malgré les conditions édaphiques extrêmes, cette diversité n'est pas réduite, voire même au contraire, permet le développement d'espèces d'ECM uniques (Moser et al., 2005). Dans ce sens, nos travaux confirme un point très important : les forêts et maquis des massifs ultramafiques de Nouvelle-Calédonie présentent une forte biodiversité fongique ECM et confirme le fait que la Nouvelle-Calédonie est, de ce point de vue là également (biodiversité fongique), un important lieu de biodiversité.

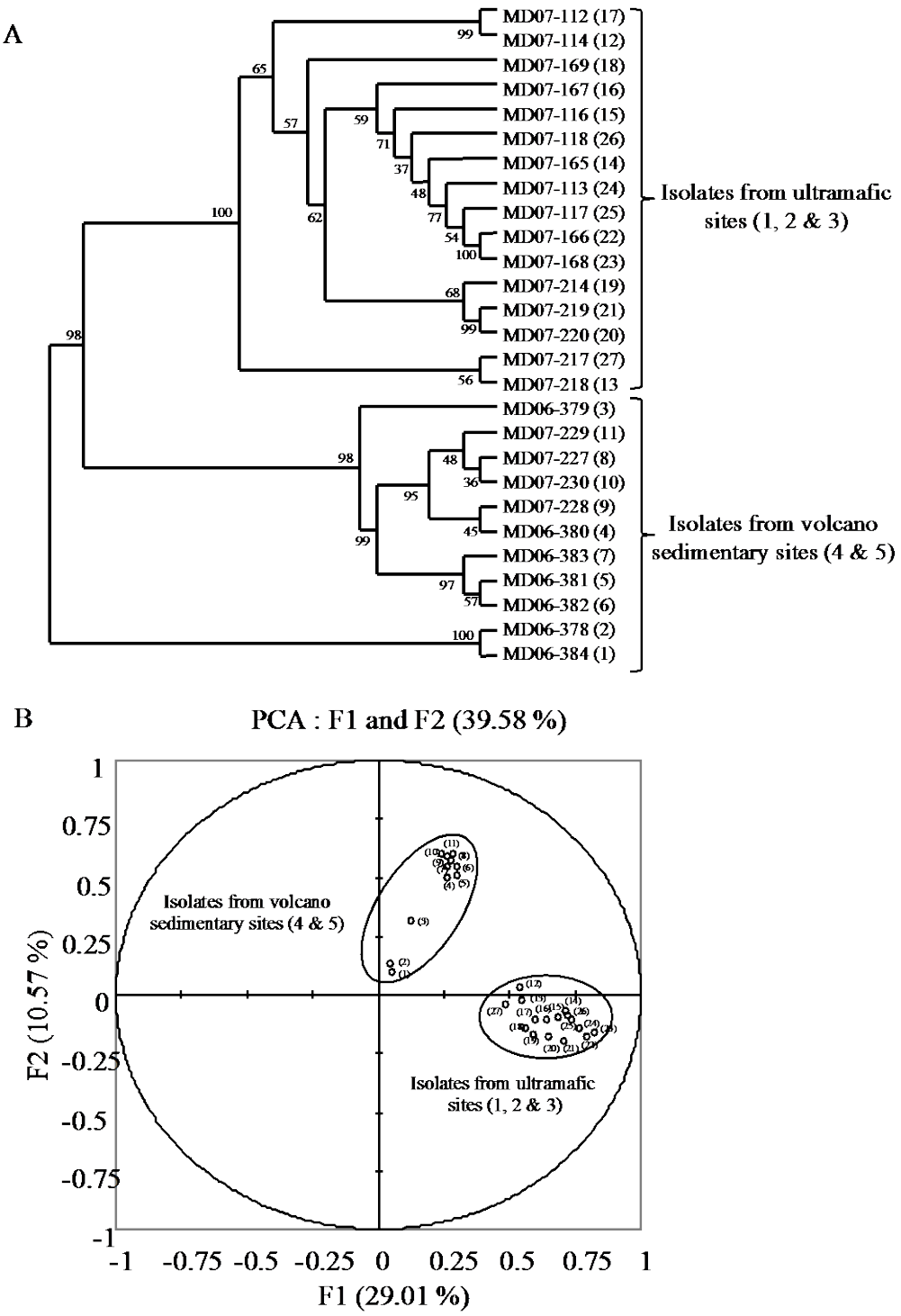


Figure 67 : analyse AFLP (A) et analyse statistique de cette AFLP en composante principale (B).

4.2.1.2.2. Caractérisation moléculaire de champignons ectomycorhiziens : recherche de déterminants moléculaires de la tolérance au nickel

Les travaux menés sur le séquençage massif du transcriptome du champignon ectomycorhizien *Pisolithus albus* écotype ultramafique et la recherche de déterminants moléculaires de la tolérance au nickel, ont fait l'objet de la rédaction d'un article scientifique paru en 2012 : Majorel C., Hannibal L., Soupe M.E., Carriconde F., Ducousso M., Lebrun M. & Jourand P. 2012.

Tracking nickel adaptive biomarkers in *Pisolithus albus* from New Caledonia using a transcriptomic approach. Molecular Ecology 21:2208-2223. Un exemplaire de l'article figure dans les annexes du rapport.

Parmi les résultats majeurs, il faut noter que la comparaison des niveaux d'expression des génomes de *P. albus* en présence ou en absence de nickel a montré que 21% des gènes identifiés sont modulées positivement (induits) par l'élément nickel, comme le montre la figure 68 d'analyse du transcriptome en présence du nickel.

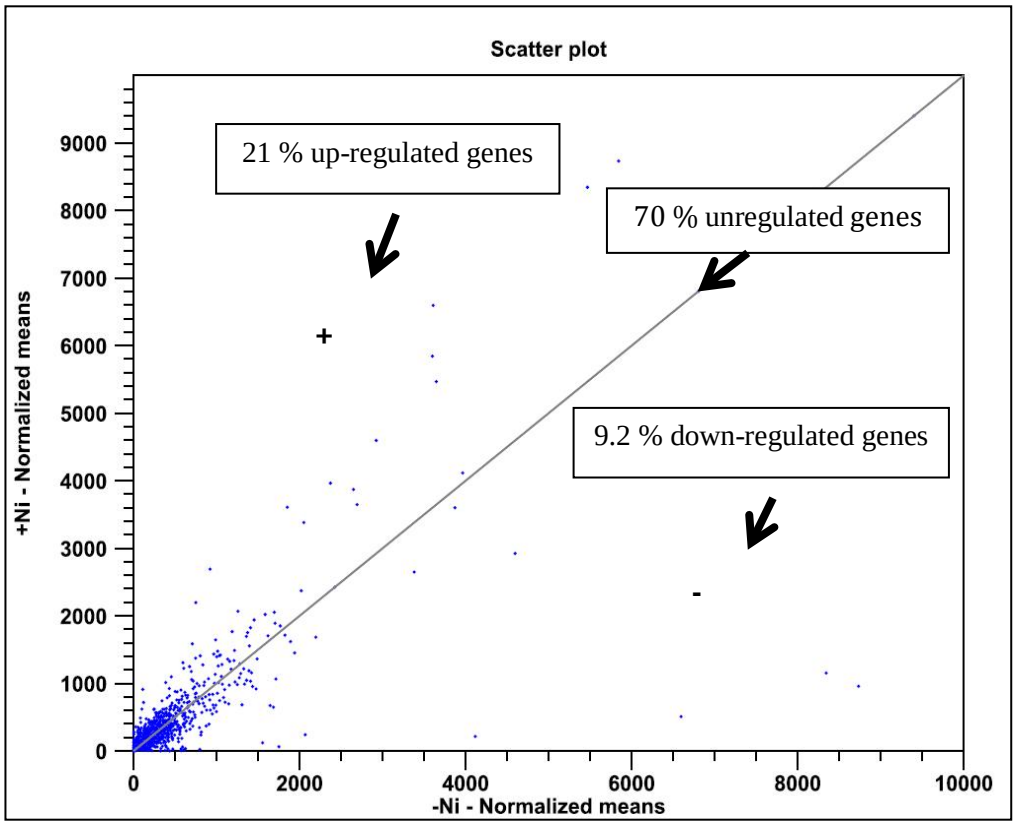


Figure 68 : Analyse du transcriptome de *Pisolithus albus* en présence du nickel.

Les gènes les plus induits codent pour des produits majoritairement impliqués dans des fonctions de modification des composants cellulaires (53%), de régulation des processus biologiques (27%) et des fonctions moléculaires (20%). Les 10 gènes les plus surexprimés par la présence du nickel ont été étudiés de manière plus approfondie chez des isolats de *P. albus* tolérants ou sensibles au nickel. Nos résultats (Fig. 69) montrent que 5 d'entre eux, sont exclusivement exprimés exclusivement chez les isolats tolérant au nickel et constituent des bio-marqueurs de la tolérance au nickel chez cette espèce.

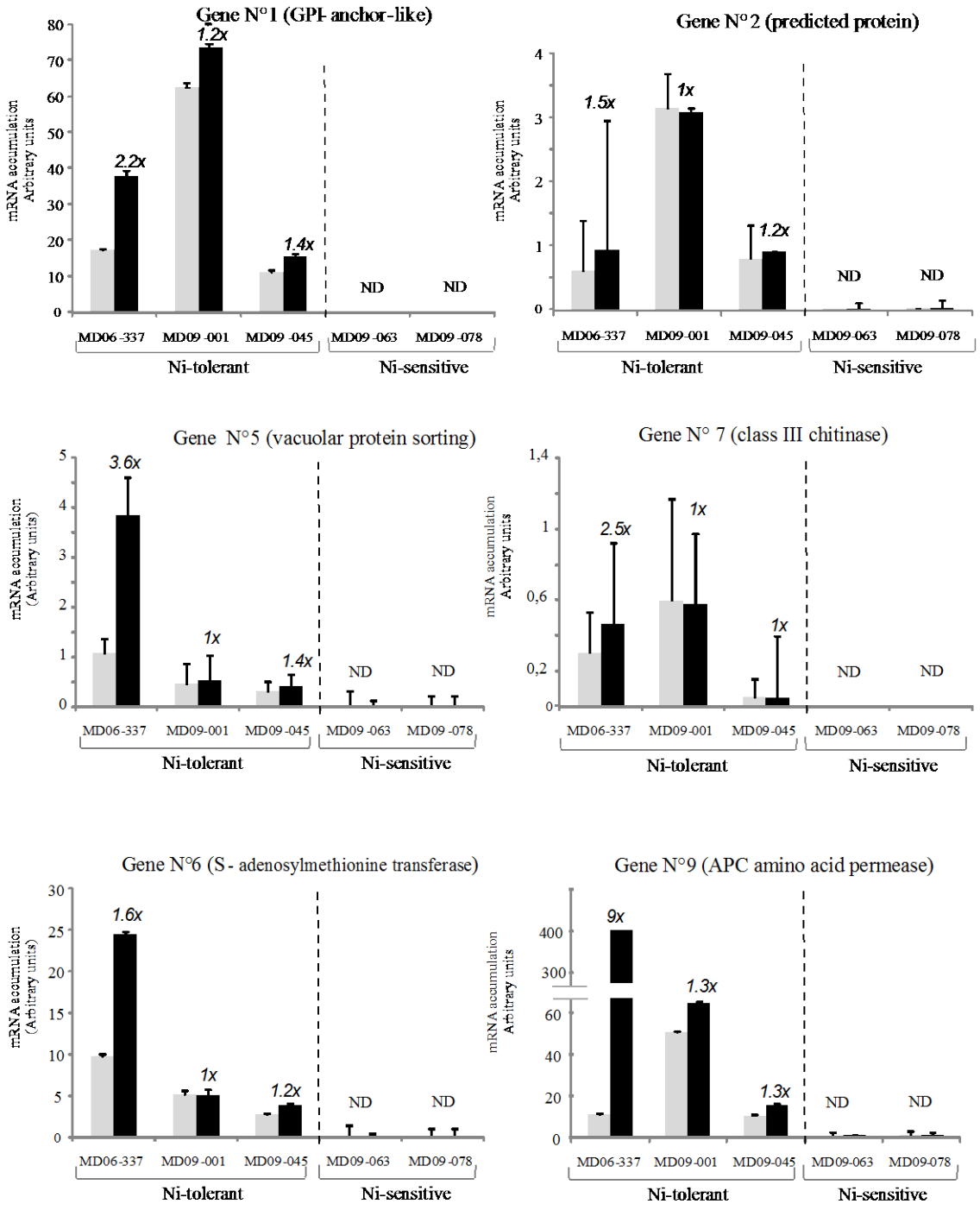


Figure 69 : Expression de gènes marqueurs de la tolérance au nickel. Les graphes représentant l'expression comparée entre isolats tolérants ou sensibles au nickel. Les taux d'induction des gènes par le nickel sont indiqués au dessus des barres.

En conclusion, nos résultats ont clairement montré qu'il existe bien une réponse transcriptomique de ce champignon à l'environnement riche en nickel.

4.2.2. TÂCHE 2 : EXPÉRIENCES DE MYCORHIZATION EN SERRE

4.2.2.1. Expériences de mycorhization en serre avec le champignon ECM Pisolithus albus montrant l'intérêt de la symbiose ectomycorhizienne dans l'adaptation de la plante à la contrainte édaphique.

Les résultats de cette expérimentation ont fait l'objet d'une publication parue en 2014 : Jourand P., Hannibal L., Majorel C., Mengant S., Ducousso M., Lebrun M. 2014b. Ectomycorrhizal *Pisolithus albus* inoculation of *Acacia spirorbis* and *Eucalyptus globulus* grown in ultramafic topsoil enhances plant growth and mineral nutrition while limits metal uptake. Journal of Plant Physiology 171:164-172.

Une copie de la version pdf de cet article est jointe en annexe à ce rapport.

L'inoculation du champignon *Pisolithus albus* écotype ultramafique à des plants d'*Eucalyptus globulus* utilisée comme Myrtacae modèle et d'*Acacia spirorbis* utilisée comme plante modèle native, toutes les deux cultivés sur substrat ultramafique, a été un succès : le taux de mycorhization moyen a été de 6,7%. (Fig. 70).

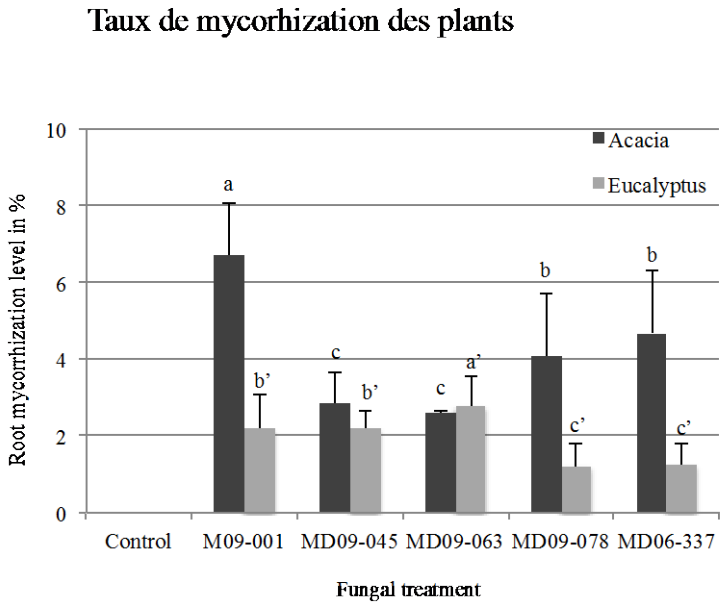


Figure 70 : Taux de mycorhization moyen des plants d'*Acacia* et d'*Eucalyptus* inoculés par des souches de *Pisolithus albus* provenant de sols ultramafiques. Les contrôles (control) sont des plants témoins non inoculés. Les barres représentent des moyennes et les barres d'erreur représentent les déviations standard des moyennes (n = 15) de 3 répétitions indépendantes. Les lettres différentes au dessus des barres indiquent les différences significatives selon le test de Tukey (P < 0.05).

La symbiose mycorhizienne a amélioré la croissance des plants (biomasse aérienne augmentée de + 20% pour Acacia et + 65% pour Eucalyptus) comme le montre la figure 71.

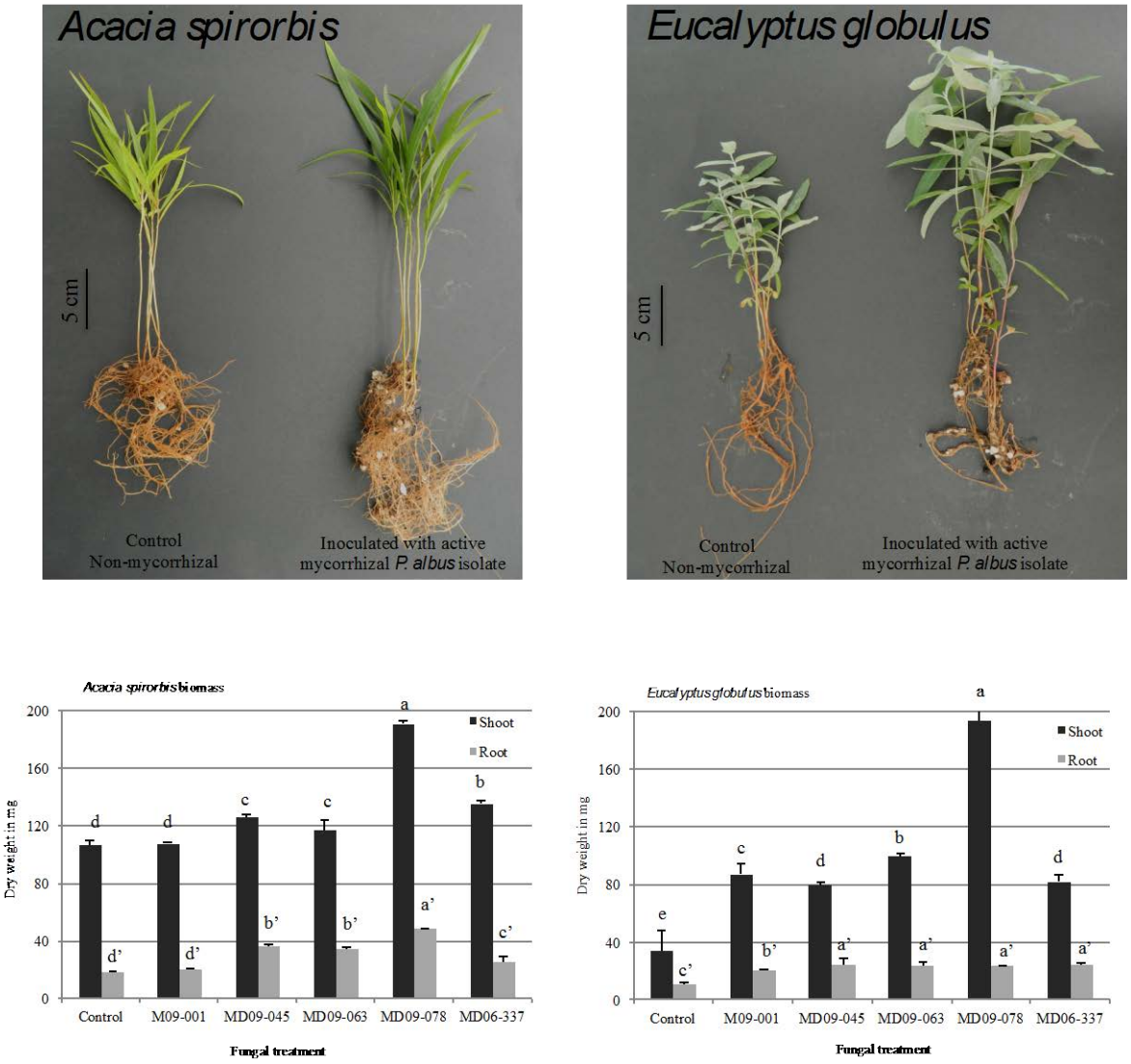


Figure 71 : Plants *Acacia spirorbis* and *Eucalyptus globulus* après 12 mois de croissance sur substrat ultramfique. Les biomasses respectivse de leurs parties aériennes (shoot) et racinaires (root) a été mesurée par mesures des poids secs des tissus exprimés en mg. Les contrôles (control) sont des plants témoins non inoculés. Les barres représentent des moyennes et les barres d'erreur représentent les déviations standard des moyennes (n = 15) de 3 répétitions indépendantes. Les lettres différentes au dessus des barres indiquent les différences significatives selon le test de Tukey (P < 0.05).

De plus, nos résultats ont montré que la symbiose ECM améliorait l'absorption des éléments majeurs pour la nutrition minérale des plantes, qui sont déficients dans le substrat ultramafique (tels que P, K et Ca), comme le montrent les résultats présentés dans la figure 72 : analyses minérales des tissus des parties aériennes des plants d'Acacia et d'Eucalyptus cultivés sur substrats ultramafique et inoculés avec des isolats de champignons *Pisolithus albus* exceptés pour le contrôle. Abréviations : N : azote, ; P : phosphore ; K : potassium ; Ca : calcium ; Mg : magnésium).

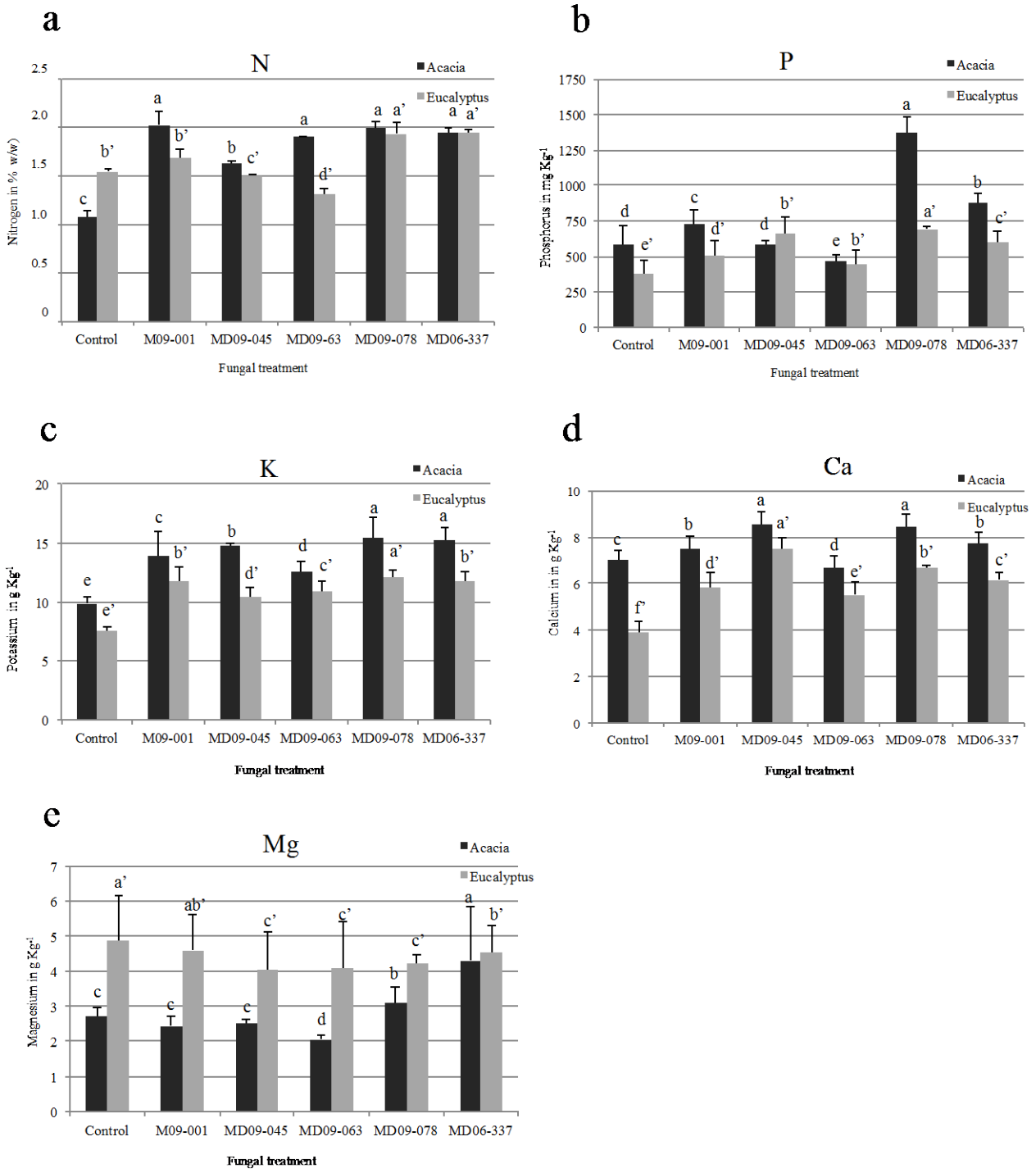


Figure 72 : analyses minérales des tissus des parties aériennes des plants d'*Acacia* et d'*Eucalyptus* cultivés sur substrats ultramafique et inoculés avec des isolats de champignons *Pisolithus albus* exceptés pour le contrôle. Abréviations : N : azote ; P : phosphore ; K : potassium ; Ca : calcium ; Mg : magnésium). Les contrôles (control) sont des plants témoins non inoculés. Les barres représentent des moyennes et les barres d'erreur représentent les déviations standard des moyennes (n = 15) de 3 répétitions indépendantes. Les lettres différentes au dessus des barres indiquent les différences significatives selon le test de Tukey (P < 0.05).

Au contraire, la symbiose ECM limite fortement le transfert des éléments fortement concentrés et toxiques tels que les métaux (Fe, Mg, Mn, Cr, Ni) comme le montrent les résultats présentés dans la figure 73 : analyses minérales des tissus des parties aériennes des plants d'Acacia et

d'Eucalyptus cultivés sur substrats ultramafique et inoculés avec des isolats de champignons *Pisolithus albus* exceptés pour le contrôle.

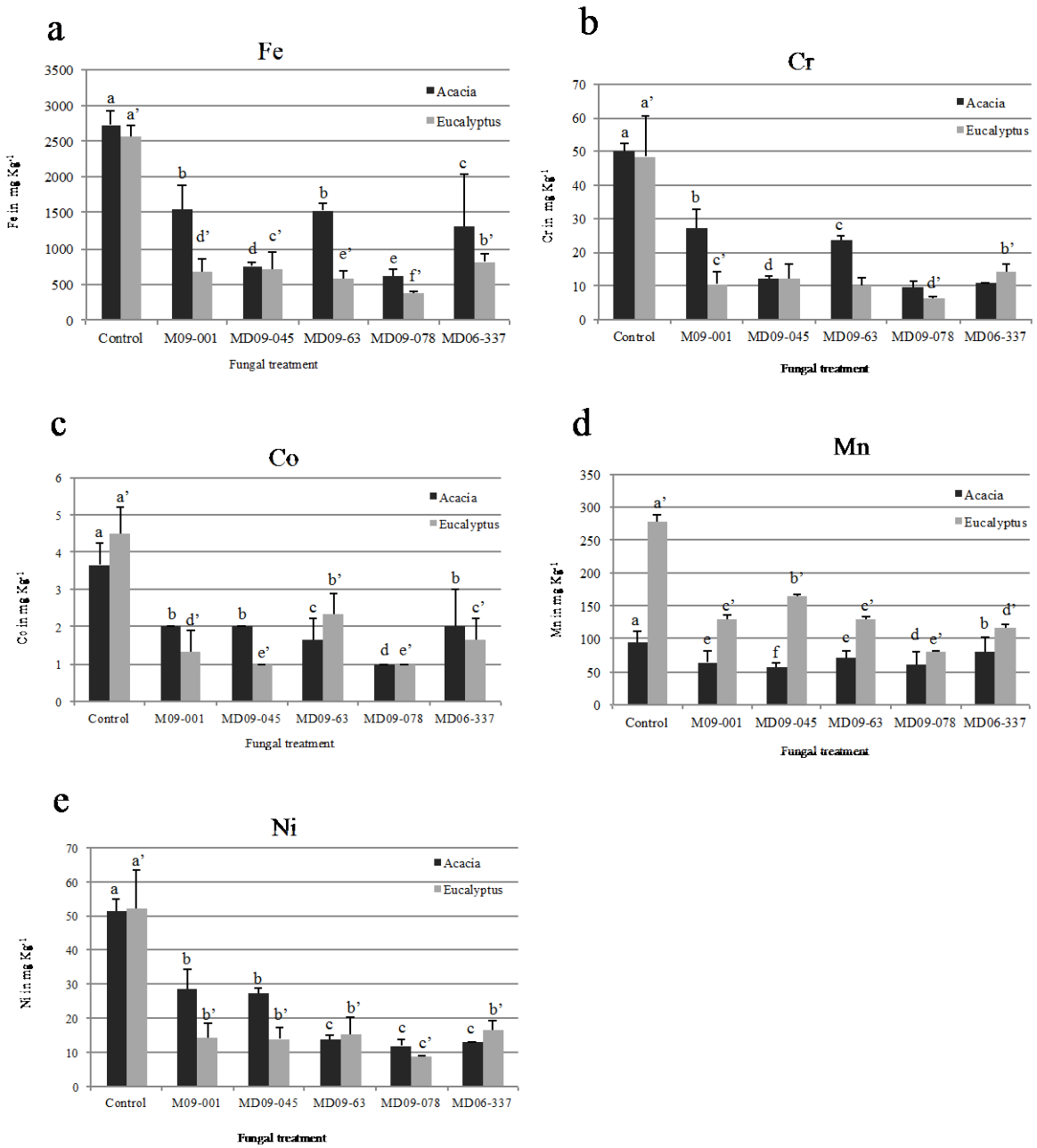


Figure 73 : Analyses minérales métalliques des tissus des parties aériennes des plants d'*Acacia* et d'*Eucalyptus* cultivés sur substrats ultramafique et inoculés avec des isolats de champignons *Pisolithus albus* exceptés pour le contrôle. Les contrôles (control) sont des plants témoins non inoculés. Les barres représentent des moyennes et les barres d'erreur représentent les déviations standard des moyennes (n = 15) de 3 répétitions indépendantes. Les lettres différentes au dessus des barres indiquent les différences significatives selon le test de Tukey (P < 0.05). Abréviations : Fe : fer ; Cr : chrome ; Co : cobalt ; Mn : manganèse ; Ni : nickel.

Ces résultats suggèrent que la sélection de souches de champignons ectomycorhiziens (ECM) adaptées aux substrats ultramafiques pourrait se révéler utile pour inoculer des plantes endémiques développant la symbiose ECM et qui sont utilisées dans les stratégies de

4.2.2.2. Etude de l'influence de la fertilisation phosphatée sur la mycorhization AMF

Trois mémoires de master 2 et 1 de master 1 (voir liste en fin de volet 2) ont été consacrés à ces expériences de 2011 à 2013, ainsi qu'un chapitre de thèse de doctorat (Gensous 2014). Nous ne pouvons pas donner ici l'ensemble des résultats, détaillés. Les principales conclusions sont les suivantes :

- Les apports de P, non seulement stimulent fortement la croissance de la plante, comme on peut s'y attendre, mais stimulent également la mycorhization pour les 3 espèces végétales testées , et ceci jusqu'à la dose de 827 mg/kg (P3, Fig. 74) . La dose maximale testée ramène le niveau de mycorhization à celui du témoin sans P. Ce résultat confirme ceux précédemment obtenus sur *C. comosa* par A. Lagrange (thèse de doctorat 2009), et confirme de manière définitive que la forte carence en P des sols ultramafiques inhibe partiellement la mycorhization de la majorité des espèces végétales.

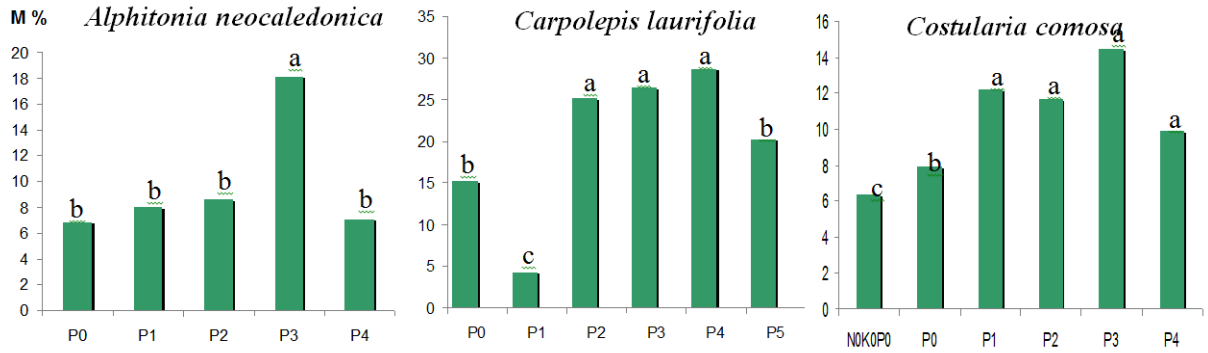


Figure 74 : Intensité de mycorhization (M en %) des 3 espèces testées, après 1 an de culture en pot, dans un sol ultramafique fertilisé avec des doses croissantes de P.

- L'effet positif de la mycorhization sur la croissance est sensible, mais est variable selon l'espèce végétale (Fig. 75): pour *A. neocaledonica*, il est net uniquement dans le traitement avec ajout maximal de P ; pour *C. laurifolia,* il est important dans le traitement sans apport de P, mais a un effet négatif pour les fortes doses de P ; pour *C. comosa*, il est net sans apport de P, mais aussi pour les fortes doses de P. Globalement la mycorhization stimule donc la croissance de ces plantes.
- L'inoculation avec des AMF améliore différents paramètres de développement ou d'adaptation des plantes : la nutrition minérale, notamment P, K et Ca (de manière inégale selon l'espèce) ; la teneur en eau (les plantes inoculées en AMF prélèvent plus d'eau, d'où une augmentation de la résistance au stress hydrique). On constate également une baisse des métaux lourds, dans les parties aériennes et/ou dans les racines.

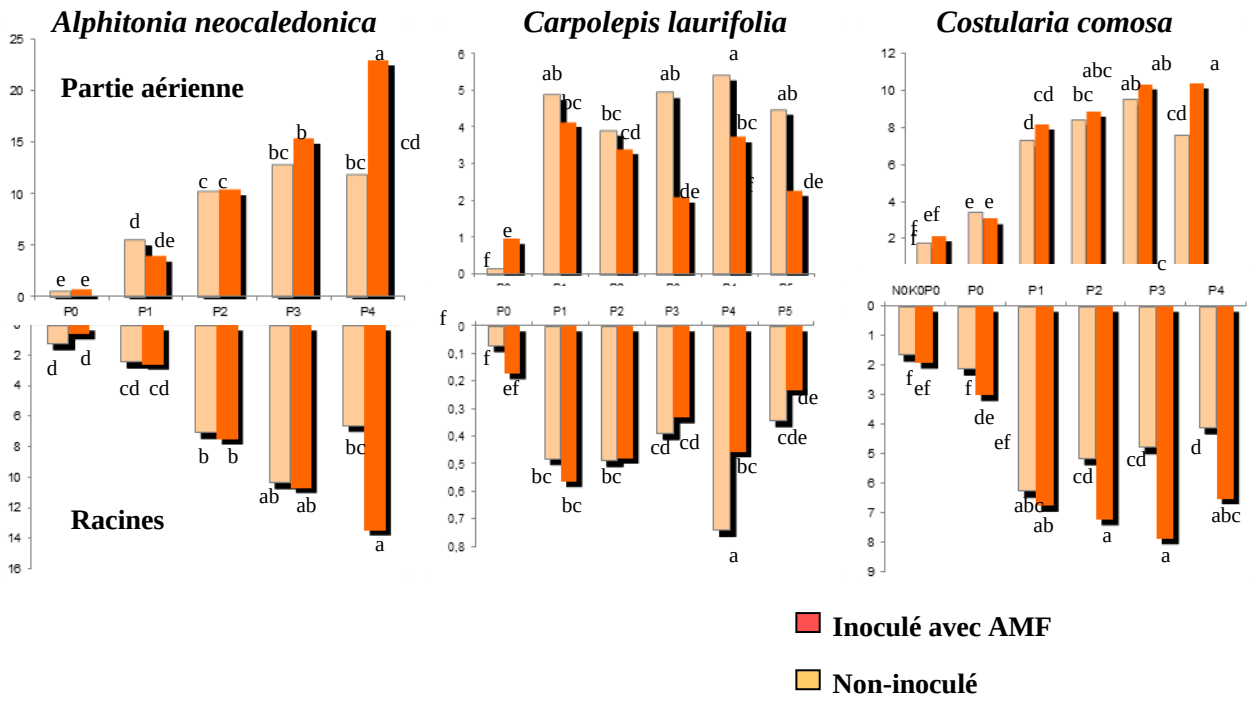


Figure 75 : Influence de la mycorhization sur la biomasse sèche (g) des plants des 3 espèces testées, après 1 an de culture en pot, sur sol fertilisé avec des doses croissantes de P.

- Le rapport Ca/Mg est très nettement amélioré par les AMF pour les traitements sans apport de P ou pour les faibles doses de cet élément (Fig. 76).
- L'apport de P, notamment aux doses les plus fortes, élimine ou réduit plusieurs effets adaptatifs liés aux AMF, notamment pour les caractères suivants : teneurs en eau, rapport Ca/Mg, réduction des métaux.

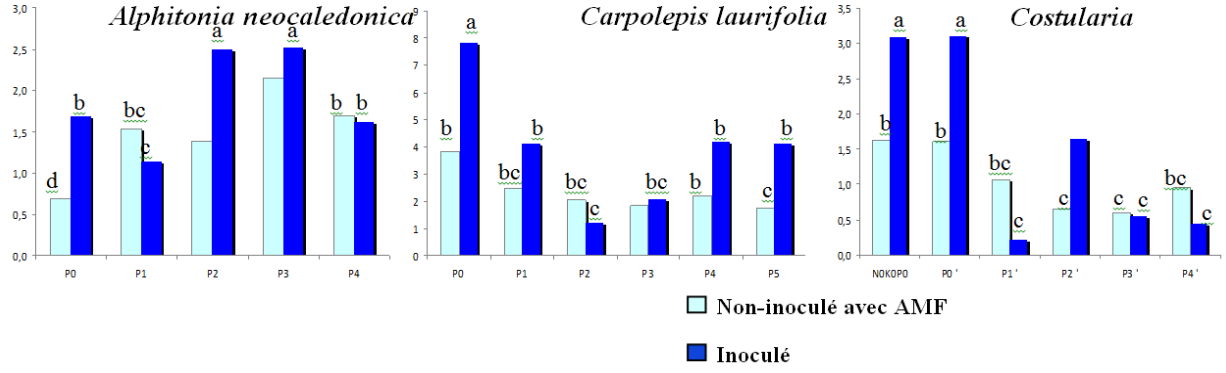


Figure 76 : Influence de la mycorhization sur les ratios Ca/Mg des parties aériennes des plants des 3 espèces testées, après 1 an de culture en pot, sur sol fertilisé avec des doses croissantes de P.

- L'espèce *C. comosa* (Cyperaceae) constitue un modèle d'un grand intérêt. En effet, la famille des Cyperaceae est habituellement considérée comme non mycorhizée (sans affinité avec les champignons mycorhiziens) ; mais dans les maquis miniers néocalédoniens, quelques espèces de cette famille se mycorhizent, bien que faiblement (Lagrange et al., 2011). Cependant, avec un taux de mycorhization bas (de l'ordre de 5-6%), le bénéfice que tire *C. comosa* de cette symbiose est important.

En résumé, les résultats démontrent que les symbiotes mycorhiziens jouent un rôle important dans l'adaptation de la plante au syndrome serpentinique. Ces résultats sont particulièrement originaux et font l'objet d'un projet d'article pour 2015. Ils ont par ailleurs des implications pratiques en termes de gestion de la fertilisation des terrains miniers pour la revégétalisation, de façon à optimiser les effets de la mycorhization, non seulement sur la croissance des plantes, mais aussi sur leur adaptation au stress hydrique, au déséquilibre du rapport Ca/Mg et à la tolérance aux métaux lourds.

4.2.2.3. Enrobage de graines avec des spores AMF

Pour cette partie également, 3 stagiaires de master 2 ou 1 ont été mis à contribution (liste ci-après). Ils ont permis d'améliorer les paramètres de production des graines enrobées avec des spores AMF. Les résultats détaillés dans les mémoires peuvent être résumés comme suit :

- - l'alginate est le meilleur composé pour l'enrobage et doit être utilisé à une concentration de l'ordre de 12,5%.
- - Le pH du substrat d'enrobage est important et doit être ajusté autour de 7,5.
- - La gélification de l'alginate est réalisée par du CaCl2 à la concentration minimale de 0,1 M.
- - Malgré une inhibition significative de la germination des spores AMF par l'alginate (Fig. 77), et un retard modéré de la germination des graines, la mycorhization des plantules produites selon cette technique est aussi importante que celle produite par la technique d'inoculation classique de dépôt des spores au niveau des racines (Fig. 78). Par ailleurs, les plants sont aussi vigoureux.

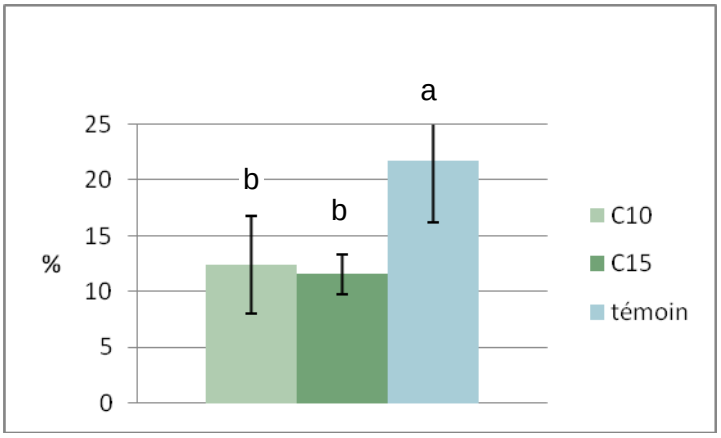


Figure 77 : Influence de la concentration de l'alginate sur le taux de germination des spores AMF enrobage des graines ou par dépôt de spores sur racines (C10 = 10g/L d'alginate ; C15 = 15g/L d'alginate ; témoin : 0g/L d'alginate).

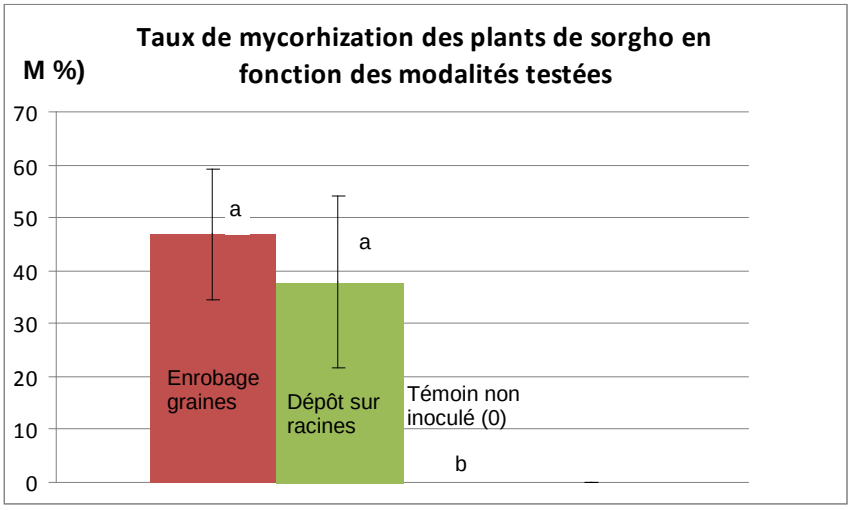


Figure 78 : Intensité de mycorhization (M %) de plants de sorgho inoculés par enrobage des graines avec des spores AMF ou par dépôt de spores sur racines.

- - Le séchage ou la conservation à 5°C de l'alginate après enrobage des graines n'affectent pas significativement la capacité de germination des graines et des spores AMF.
- - Une forte agitation des graines, après inclusion à l'intérieur du mulch utilisé pour l'ensemencement hydraulique réduit un peu le taux de germination pour *Dodonea viscosa*, mais pas pour *Costularia comosa* (Fig. 79). Le taux de germination des spores AMF n'est pas réduit significativement par ce traitement.

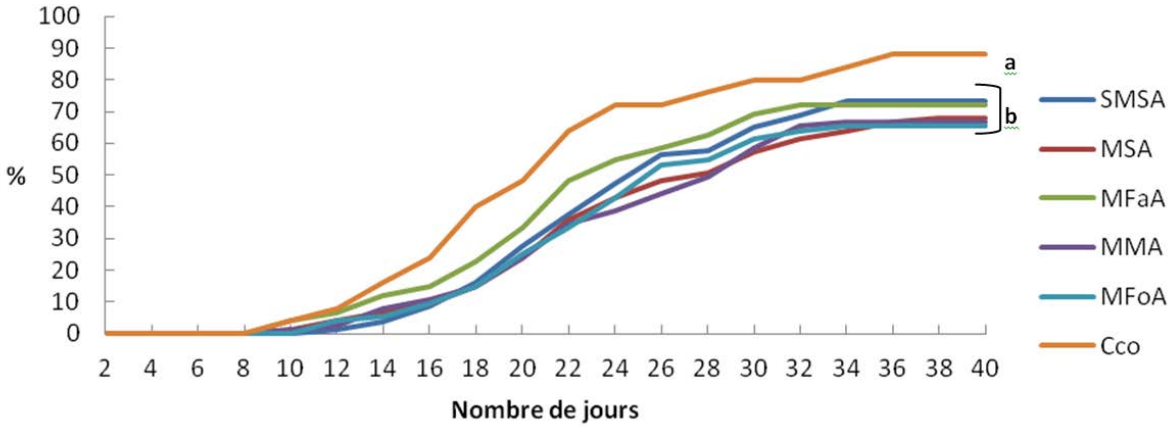


Figure 79 : Taux de germination des graines de *C. comosa* selon leurs traitements en fonction du nombre de jours. La courbe Cco correspond au test de germination effectué à la réception des graines.

En conclusion, cette étude sur l'enrobage des graines en vue de leur utilisation en semis montre que la technique est à peu près au point et devrait donner de bons résultats. Quelques essais supplémentaires seront toutefois nécessaires avant d'arriver au stade terrain. Un essai a cependant déjà été réalisé sur une mine orpheline à Dumbéa (essai non financé par le projet BioTop, mais par les Fonds Nickel). Dans cet essai, l'enrobage a été réalisé de façon globale par mixage des graines dans la suspension avec l'alginate et non graine par graine. Les résultats ne seront disponibles que dans 2 à 3 ans.

4.2.3. TÂCHE 3 : EXPÉRIMENTATION SUR LE TERRAIN : ESSAI D'INOCULATION CONTRÔLÉE DE DEUX ESPÈCES VÉGÉTALES AVEC DES CHAMPIGNONS ECTOMYCORHIZIENS ET MYCORHIZIENS À ARBUSCULES, SUR UN TOPSOIL REPLACÉ APRÈS EXPLOITATION MINIÈRE ET AMENDÉ OU NON EN BOUE DE STATION D'ÉPURATION

Les résultats de cette expérimentation font l'objet de deux parties distinctes, bien que liées, du fait qu'ils sont traités et interprétés selon deux démarches différentes. Ainsi la première partie traitera les résultats en se focalisant sur les effets des champignons mycorhiziens et l'interaction de ses effets avec ceux des boues de STEP sans développer les aspects liés directement à ce dernier traitement. La deuxième partie, à l'inverse se focalisera plus sur les effets des boues de STEP, en traitant les effets des champignons mycorhiziens uniquement en termes d'interactions avec les boues de STEP. Cette présentation peut toutefois comporter quelques redondances, mais elle a l'avantage de traiter de manière approfondie et claire chacun des deux traitements étudiés.

4.2.3.1. Influence des Champignons mycorhiziens sur la croissance des plantes ; interaction avec les boues de STEP

Après la mise en terre, les plants se sont globalement bien développés sur le terrain. Toutefois, il est important de préciser que le terrain en question s'est révélé partiellement inondable (nous n'avons pris conscience de cet effet que tardivement, alors que l'expérimentation était lancée). Goro étant une zone à forte pluviosité, dans la partie basse du terrain, le sol a été submergé plusieurs fois au cours des deux années. Des travaux sommaires ont été réalisés par VALE-NC pour réduire ces effets, mais leur impact est finalement plus important qu'on ne le soupçonnait. Ces incidents ont faussé les résultats des parcelles situées sur la partie la plus basse qui correspondent essentiellement à la zone occupée par l'espèce *Tristaniopsis glauca*. Le plan en figure 79 montre les parties qui ont été inondées. La partie la plus fréquemment et fortement submergée (la plus basse) est précisément celle comportant les traitements avec boue de STEP et mycorhization de l'espèce *T. glauca* (parcelles E, F, K, L, Q, R). Les parcelles ectomycorhizées et endomycorhizées de cette espèce ont également subies des inondations plus ou moins importantes. Il est donc préférable de considérer les résultats obtenus pour cette espèce avec beaucoup de précaution.

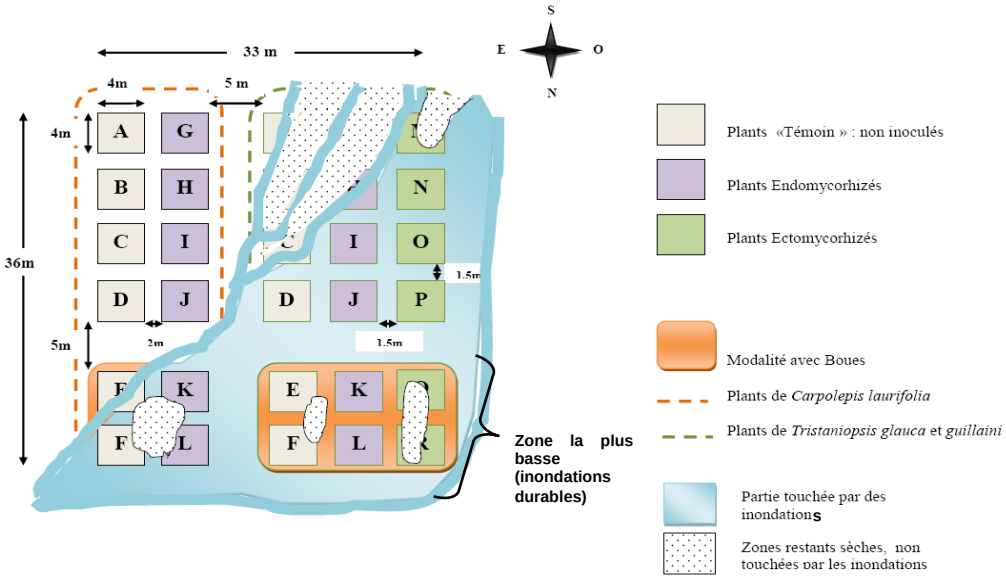


Figure 80 : Plan des parcelles d'expérimentation montrant les zones qui ont été inondées de temps en temps (voir plan complet initial au parag. 2-a, tâche 3).

A la vue des résultats généraux de croissance des plants sur le terrain, en fonction du temps, on peut d'abord faire 3 constats principaux importants:

1 - Les AMF ont un effet positif très net sur la croissance de *Carpolepis laurifolia*. Cet effet est visible dès la plantation (T0) en termes de hauteur des plants (Fig. 81), puisque les plantules inoculées en AMF ont été élevées en pépinière un peu plus d'une année avant la mis en terre. Les différences avec les témoins non inoculés restent importantes jusqu'en fin d'expérience, bien que les parcelles témoins contiennent des AMF et que les plants y sont aussi mycorhizés (voir plus loin).
2 - Si les boues de STEP ont un effet positif net, mais prévisible, sur la croissance de *C. laurifolia* (l'effet étant déjà connu), l'effet combiné des AMF et des boues de STEP sur la croissance de cette espèce est très important. Les effets des deux traitements s'additionnent.

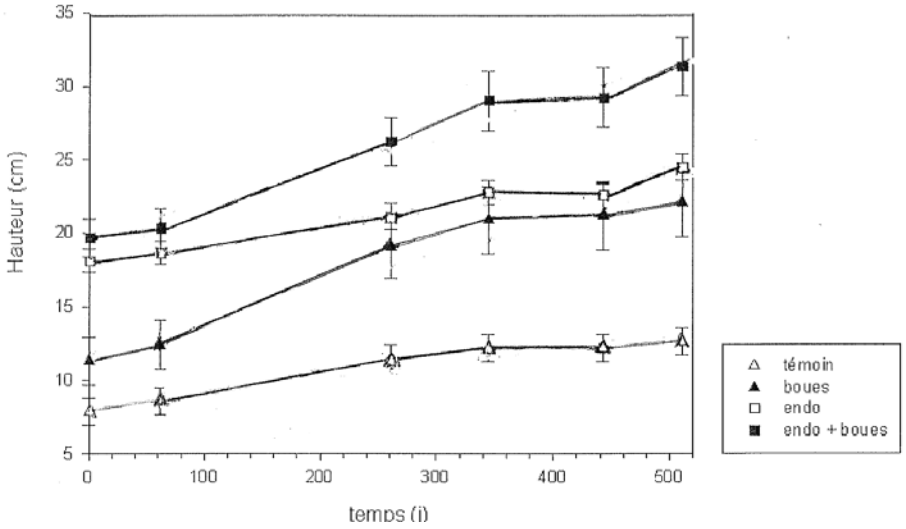


Figure 81 : Influence de l'inoculation en AMF (endo) et des boues de station d'épuration (boues), et leur combinaison, sur l'évolution de la croissance en hauteur de *C. laurofolia*.

3 - L'effet des champignons ECM et des AMF sur la croissance en hauteur de *Tristaniopsis glauca* apparaît négatif et ce malgré que les plants mycorhizés avaient globalement une certaine avance de croissance au moment de la plantation (Fig. 82). L'effet des boues de STEP et la combinaison des deux traitements semblent également avoir un effet négatif. Il est évident que ces résultats sont aberrants et directement lié à la submersion par les eaux de pluies des parcelles traitées de *T. glauca*. Il a en effet été constaté en fin 2012 que les plants de cette espèce, situés en zone inondable ont été totalement submergés (donc partiellement asphyxiés) à certaines périodes (Fig. 80), car ils étaient au départ beaucoup plus petits que les plants de *C. laurifolia* comme on le voit sur les figures (environ 5 cm de hauteur en moyenne au départ). C'est donc probablement ce qui explique l'effet négatif constaté, puisque les plants témoins, par contre, ont été très peu touchés par l'inondation comme le montre la figure 80.

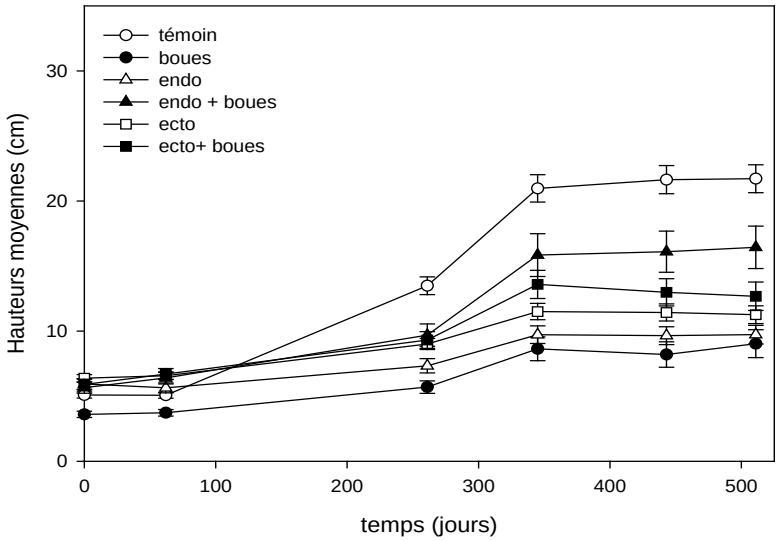


Figure 82 : Influence de l'inoculation en ECM (ecto) ou en AMF (endo) et des boues de station d'épuration (boues), et leurs combinaisons, sur l'évolution de la croissance en hauteur de *Tristaniopsis glauca*.

Nous allons maintenant discuter plus en détail les résultats obtenus en fin d'expérience.

4.2.3.1.1. Effets des AMF sur la croissance de Carpolepis laurifolia ; interaction avec les boues de STEP

Comme le montre la figure 83, l'inoculation avec des AMF permet de stimuler très fortement la croissance de *Carpolepis.* Le poids des parties aériennes des plantes est en effet multiplié par 4,1 chez les plants inoculés.

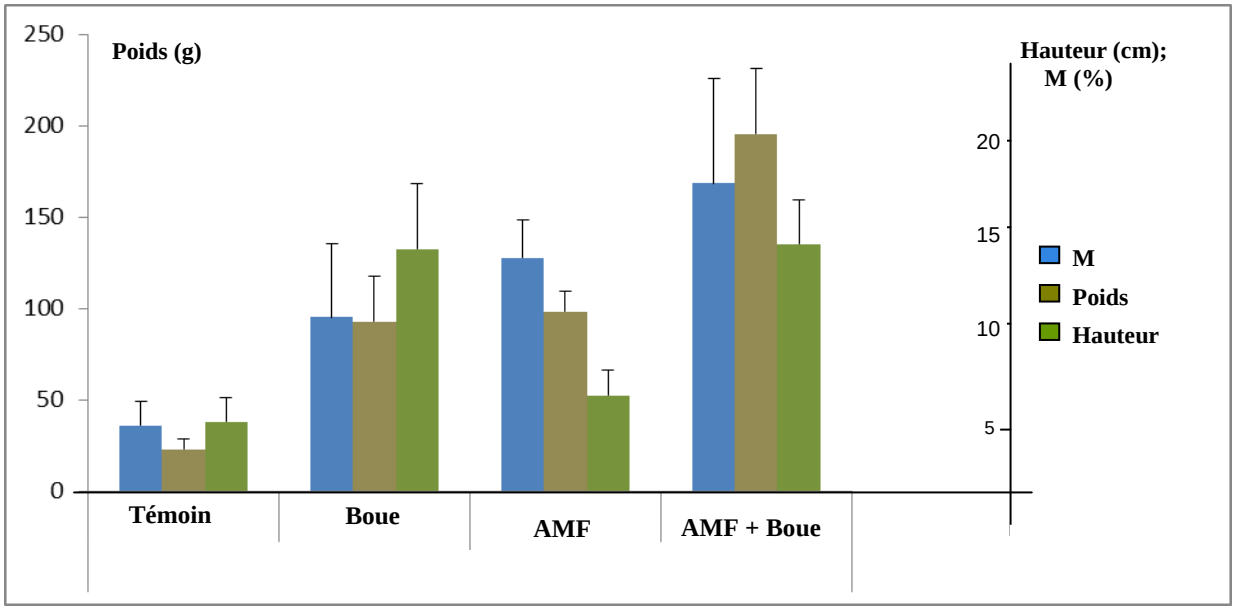


Figure 83 : Influence de l'inoculation en AMF et des boues de station d'épuration (Boue) sur la croissance (poids de la partie aérienne et gain en hauteur des plants depuis la plantation) et la mycorhization (M) de *Carpolepis laurofolia* sur le topsoil dégradé (valeurs mesurées 18 mois après plantation)

Cette stimulation forte apparaît liée à un taux de mycorhization plus élevé chez les plants inoculés en AMF (Figs. 83 et 84), même si les plants témoins sont également mycorhizés puisque le topsoil, bien que dégradé, s'est enrichi en spores AMF avec le temps. L'effet stimulant des AMF sur la croissance des plants exprimée en poids est similaire à celui des boues de STEP. L'effet combiné des boues et des AMF est encore plus important, avec un poids des parties aériennes 7,7 fois plus important que celui des plants témoins. Les effets positifs des deux traitements se cumulent donc clairement.

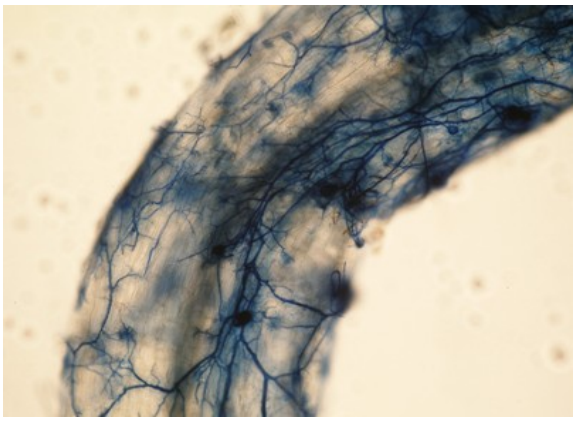


Figure 84 : Racine de *Carpolepis laurifolia* fortement colonisée par les AMF dans une parcelle dont les plants ont été inoculés en AMF à Goro.

On remarque par ailleurs que le taux de mycorhization (M) est stimulé par les boues (Fig. 83) ce qui explique, en partie au moins, les effets cumulatifs de ces deux traitements. Il faut préciser que les boues de STEP sont notamment riches en phosphore. Or comme nous l'avons vu précédemment, l'apport de P dans les sols miniers favorise la mycorhization, car il permet une meilleure nutrition phosphatée de la plante (par l'intermédiaire notamment des AMF), ce qui améliore la photosynthèse et donc en retour permet à la plante de mieux nourrir ses symbiotes.

La figure 85 montrent la différence nette, directement perceptible à l'oeil, entre une parcelle témoin et les autres parcelles : inoculées en AMF, amendées en boue et surtout inoculées et amendées.

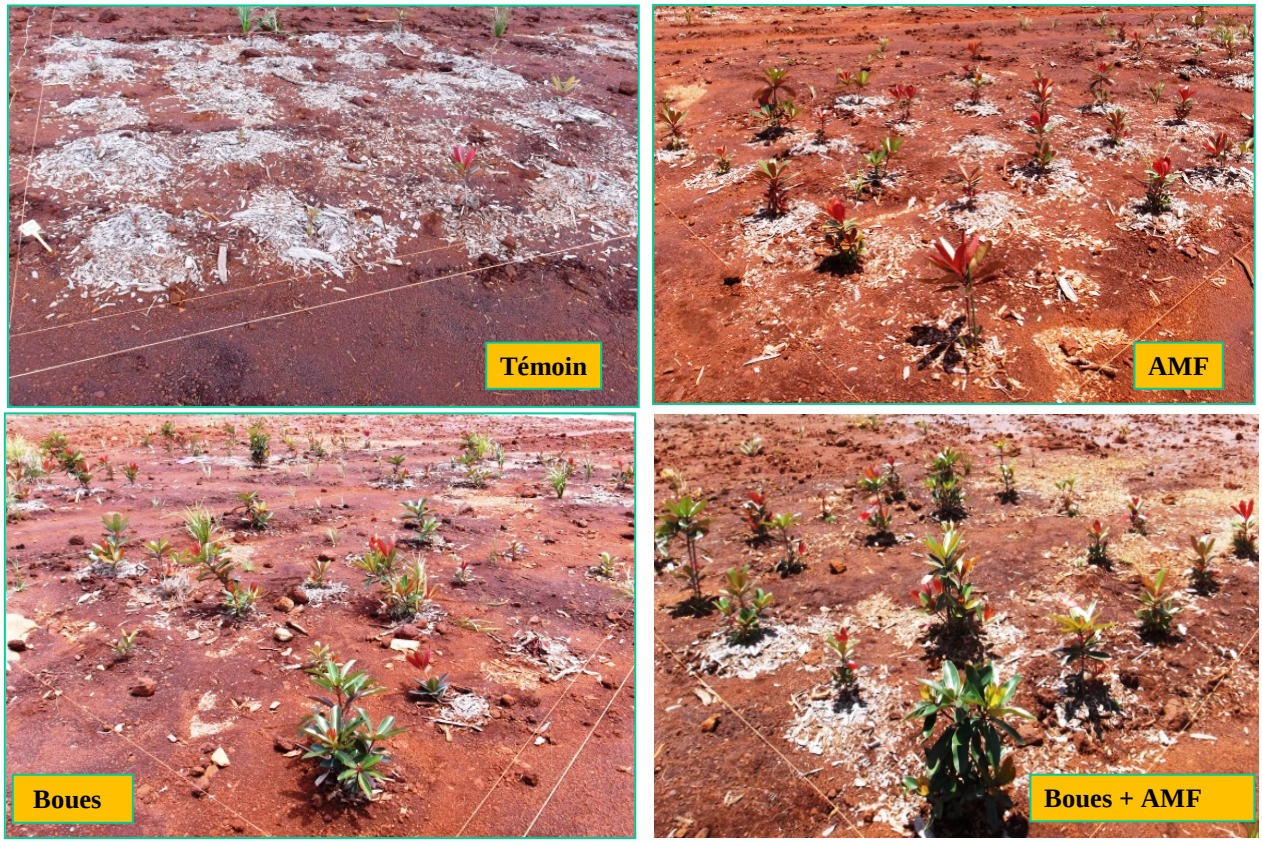


Figure 85 : Aspects comparés des plants de *Carpolepis laurofolia* correspondants aux 4 traitements différents : témoins non inoculé (Témoin) , inoculation en AMF (AMF), boues de STEP (Boues) et inoculation en AMF combinée à l'apport de boues de STEP (Boues + AMF).

4.2.3.1.2. Effets des AMF sur les teneurs en eau des plants de Carpolepis laurifolia ; interaction avec les boues de *STEP*

La figure 86 Montre les teneurs en eaux dans les plantes soumises aux différents traitements testés (différence entre poids frais et poids sec exprimé en %).

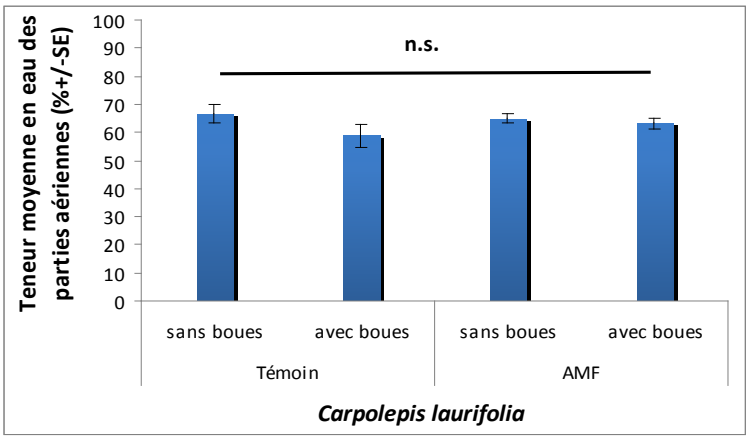


Figure 86 : Variation des teneurs en eau des plants de *Carpolepis laurifolia* en fonction des traitements testés.

On ne note aucune différence significative entre les 4 traitements pour ce paramètre. Ce résultat ne va pas dans le sens des résultats obtenus en serre qui montrent clairement que les

AMF augmentent les teneurs en eau des plants, et ceci permet une meilleure adaptation aux fluctuations de l'humidité (dessèchements périodique des sols), en relation avec la collecte efficace de l'eau par le mycvélium extra-racinaire des AMF. Cet absence d'effet sur la teneur en eau s'explique par le fait que Goro est une zone particulièrement humide ; il est donc vraissemblable que les plantes n'aient pas subies de stress hydrique suffisant pour induire des différences entre les traitements.

4.2.3.1.3. Effets des AMF sur la nutrition minérale de Carpolepis laurifolia ; interaction avec les boues de STEP

- **Phosphore :**

Le phosphore étant un élément très limitant dans les sols ultramafiques et étant souvent directement influencé par la mycorhization, il est traité ici séparément. La figure 87 donne les teneurs en phosphore dans les feuilles et les tiges de la plante pour les 4 traitements testés. Les tiges des plants traités montrent toutes une teneur en P significativement plus élevée que le témoin. C'est particulièrement le cas pour la combinaison « boue + AMF » dont les valeurs sont 4 fois plus élevées que celles du témoin. Les tiges des plants inoculés avec des AMF montrent des teneurs deux fois supérieures au témoin. Les teneurs en P dans les feuilles des plants inoculés ne sont pas différentes de celles des témoins, mais elles sont significativement supérieures à celles des témoins pour les plants inoculés avec boue ou non inoculés avec boue. Ainsi d'une façon générale la nutrition phosphatée est améliorée par les deux traitements testés et leur combinaison. Il faut souligner par ailleurs que, s'agissant ici de taux en % de matière sèche, les quantités de P réellement absorbées par les plants inoculés ou amendés sont beaucoup plus élevées que les témoins étant donné l'augmentation de poids des plants en relation avec ces traitements.

Il est connu que la mycorhization améliore souvent la nutrition phosphatée de la plante ; c'est le cas ici. Il s'agit là d'un effet important, car le phosphore est l'élément le plus limitant sur le plan nutritionnel, dans les sols miniers néo-calédoniens et il est bien connu que cet élément conditionne fortement la croissance des plantes.

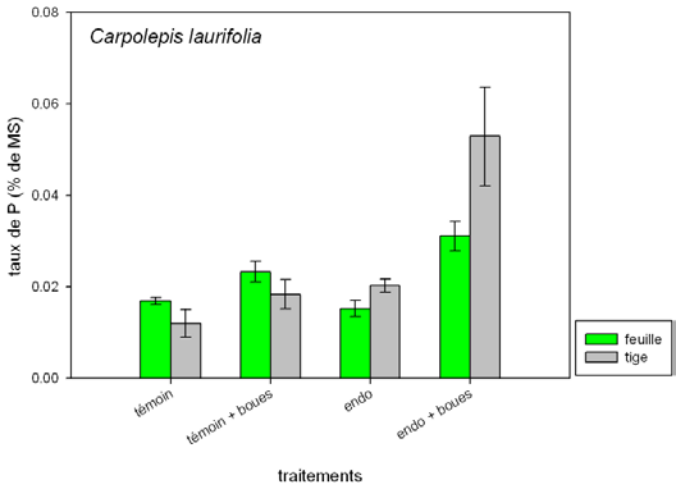


Figure 87 : Teneurs en phosphore des feuilles et tiges de *Carpolepis laurifolia* soumis à un amendement en boue de STEP (boue), inoculée en AMF (endo) ou à la combinaison des deux traitements.

- **Azote, potassium et calcium :**

Le tableau 7 montre également que les taux d'azote dans les feuilles ne sont pas

significativement différents pour les 4 traitements. Par contre, les valeurs obtenues pour les tiges sont supérieures en présence d'AMF ou de boue ou de la combinaison des deux traitements. Compte-tenu, par ailleurs, de l'amélioration de la biomasse des plantes, il est évident que la nutrition azotée est globalement favorisée par les deux traitements.

Les valeurs obtenues pour le potassium sont toujours supérieures dans les traitements avec AMF ou boues ou leur combinaison, notamment au niveau des racines, même si toutes les différences ne sont pas significatives.

En ce qui concerne le calcium, par contre, on ne constate pas d'amélioration claire des teneurs au niveau des feuilles par les traitements testés. Au niveau des racines, les valeurs des 2 traitements sont significativement supérieures à celles du témoin, mais leur combinaison ne l'est pas.

Tableau 7 : Teneurs totales en éléments N, K et Ca dans les racines et les feuilles de *Carpolepis laurifolia* en fin d'expérience.

N (%)	Feuilles	Tiges
Témoin	0,412 ± 0.07	0,173 ± 0,042
+Boues	0,487 ± 0,129	0,276 ± 0,066
+AMF	0,351 ± 0,095	0,268 ± 0,073
+Boues +AMF	0,349 ± 0,132	0,278 ± 0,076
K (mg/g)	Feuilles	Racines
Témoin	1,6 ± 0,5	0,5 ± 0,2
+Boues	2,7 ± 1,2	1,3 ± 0,7
+AMF	2,2 ± 1,0	1,1 ± 0,3
+Boues +AMF	2,5 ± 2,0	2,0 ± 1,3
Ca (mg/g)	Feuilles	Racines
Témoin	12,8 ± 5,5	3,0 ± 0,1
+Boues	9,9 ± 5,2	6,7 ± 3,2
+AMF	12,2 ± 6,7	5,5 ± 2,0
+Boues +AMF	8,3 ± 2,2	3,7 ± 2,0

- **Ratio Ca/Mg :**

La figure 88 donne les ratios Ca/Mg obtenus pour les différents organes de *C. laurifolia* :

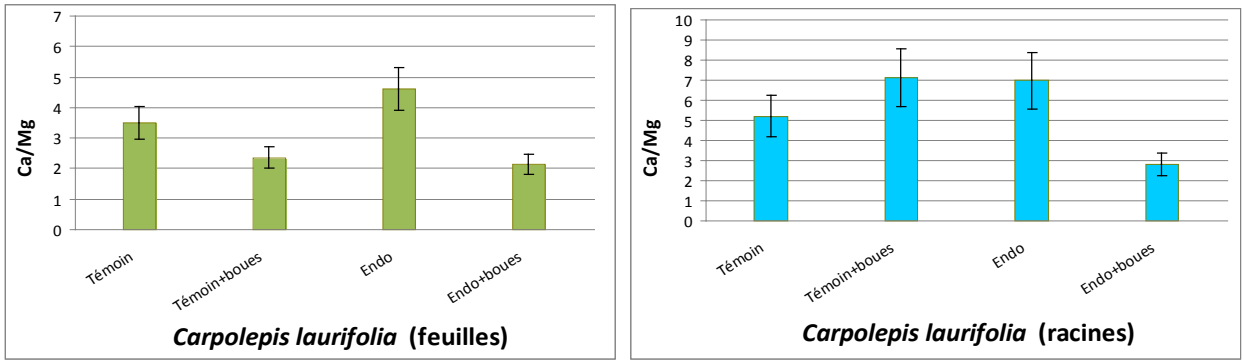


Figure 88 : Influence des boues de STEP (témoin+boues) ; des AMF (endo) et de leur combinaison (Endo+boues) sur le ratio Ca/Mg dans les différents organes de *Carpolepis laurifolia*, en fin d'expérience.

Le ratio Ca/Mg est le plus souvent déséquilibré dans les sols ultramafiques au profit de Mg et aux dépens de Ca, de sorte qu'il est souvent inférieur à 1 ou proche de 1. Dans notre cas, il est

plutôt autour de 3 dans les feuilles. Les boues de STEP ont tendance à réduire ce ratio dans les feuilles. A l'inverse, l'inoculation en AMF, en absence de boues, augmentant significativement ce ratio, ce qui permet à la plante de récupérer plus facilement le calcium, élément rare dans les sols ultramafiques et qui rentre en compétition avec Mg, souvent abondant dans ces sols.

Teneurs en métaux des plantes :

Les teneurs totales en métaux (Fe, Mn, Ni, Co) dans les feuilles et racines de la plante sont rapportées dans le tableau 8. Les teneurs en Fe sont plus basses pour les 3 traitements testés, mais non significativement différentes du témoin. Par contre, on constate que les racines ont accumulé des teneurs en fer supérieures à celles du témoin lorsque les plants sont inoculés en AMF. Ces teneurs sont en effets, 12 fois à 23 fois plus élevées dans les racines que dans les feuilles

Le même type de résultats est obtenu pour le manganèse et le nickel : pas de différences dans les feuilles ; taux plus élevés dans les racines des plants inoculés en AMF. En ce qui concerne le cobalt, on constate une nette diminution des teneurs dans les feuilles des plants inoculés en AMF ou amendés en boues. Les racines de ces traitements ont, à l'inverse, plus de Co que le témoin, bien que les valeurs soient très hétérogènes, donc non significatives.

Tableau 8 : Teneurs totales en métaux dans les racines et les feuilles de *Carpolepis laurifolia* en fin d'expérience.

Fe (µg/g)	Feuilles	Racines
Témoin	232,3 ± 112,9	331,1 ± 66,7
+Boues	210,8 ± 72,7	596,2 ± 297,6
+AMF	172,6 ± 98,0	2169,8 ± 1668,1
+Boues +AMF	202,5 ± 64,9	4785,0 ± 5179,2
Mn (µg/g)		
Témoin	497,0 ± 178,8	62,2 ± 26,3
+Boues	390,4 ± 183,7	138,4 ± 91,4
+AMF	397,3 ± 114,4	121,9 ± 26,0
+Boues +AMF	487,9 ± 186,9	247,1 ± 164,0
Ni (µg/g)		
Témoin	8,7 ± 3,1	9,0 ± 4,0
+Boues	7,6 ± 2,7	9,6 ± 3,8
+AMF	6,5 ± 2,3	19,9 ± 4,5
+Boues +AMF	9,8 ± 4,0	83,7 ± 80,2
Co (µg/g)		
Témoin	1,1 ± 0,4	1,3 ± 0,2
+Boues	0,3 ± 0,1	1,6 ± 0,6
+AMF	0,4 ± 0,2	4,2 ± 3,0
+Boues +AMF	0,6 ± 0,3	17,9 ± 16,0

Ces résultats indiquent donc que le facteur de translocation des métaux (rapport entre la quantité transférée dans les parties aériennes et la quantité présente dans les racines) est réduit en présence d'AMF.

Ainsi d'une façon générale, il apparaît que l'augmentation de l'absorption des minéraux essentiels dans les traitements avec boue ou/et AMF, induit une certaine accumulation des métaux dans les racines et ceci en raison d'une filtration sélective des minéraux acheminés

vers les feuilles (translocation). Il est probable que cette accumulation ait lieu dans le mycélium des AMF intraracinaires.

Teneurs en métaux extractibles des sols rhizosphériques :

Des analyses des teneurs en métaux extactibles au DTPA dans la rhizosphère des plantes ont été également réalisées à 2 périodes. Le tableau 9 montre uniquement celles obtenues pour la deuxième période (après 18 mois), les autres valeurs peuvent être trouvées en annexe du volet 3.

On constate que les sols rhizosphériques sont généralement plus riches en métaux (en comparaison avec le témoin rhizospéhrique), même si les différences ne sont pas toujours significatives. Ce résultat est en adéquation avec les résultats de Amir et Pineau (2003) qui ont montré que cette augmentation des métaux extractibles dans la rhizosphère est liée à l'activité microbienne plus forte dans ce microsite. Cette plus forte activité est due à la disponibilité des composés énergétiques (rhizodéposition) stimulant la capacité à oxyder et libérer les métaux de certaines bactéries.

Tableau 9 : Teneurs en métaux extractibles au DTPA dans les sols rhizosphériques entourant les racines des plants de *Carpolepis laurifolia* soumis à différents traitements, en comparaiosn avec le sol non rhizosphérique (hors influence des racines).

Mn µg/g	après 18 mois
Sol non rhizosphérique	**21,2 ± 3,9**
Témoin rhizosphérique	**24,2 ± 3,2**
+Boues	**26,0 ± 7,0**
+AMF	**18,6 ± 6,3**
+Boues +AMF	**20,2 ± 4,8**
Fe µg/g	
Sol non rhizosphérique	**7,0 ± 3,1**
Témoin rhizosphérique	**8,0 ± 1,8**
+Boues	**7,4 ± 2,1**
+AMF	**4,7 ± 1,2**
+Boues +AMF	**6,9 ± 2,2**
Cr ng/g	
Sol non rhizosphérique	**12,6 ± 6,0**
Témoin rhizosphérique	**15,0 ± 5,2**
+Boues	**17,7 ± 3,9**
+AMF	**15,3 ± 3,8**
+Boues +AMF	**15,9 ± 3,8**

Ni µg/g	après 18 mois
Sol non rhizosphérique	**3,0 ± 1,0**
Témoin rhizosphérique	**5,1 ± 1,3**
+Boues	**4,3 ± 1,3**
+AMF	**3,2 ± 0,7**
+Boues +AMF	**4,5 ± 1,7**
Co µg/g	
Sol non rhizosphérique	**3,2 ± 1,3**
Témoin rhizosphérique	**3,0 ± 0,9**
+Boues	**3,1 ± 1,2**
+AMF	**1,9 ± 0,6**
+Boues +AMF	**2,8 ± 0,9**
Mg µg/g	
Sol non rhizosphérique	**2,0 ± 0,5**
Témoin rhizosphérique	**2,9 ± 0,7**
+Boues	**2,3 ± 0,6**
+AMF	**2,5 ± 0,8**
+Boues +AMF	**2,1 ± 0,3**

Par ailleurs, les plants mycorhizés en pépinière possèdent généralement moins de métaux dans leur rhizosphère (à l'exception de Cr), bien que là encore les différences ne sont pas toujours significatives. Cette réduction des métaux dans la rhizosphère nous permet de discuter le mécanisme d'action des champignons mycorhiziens sur la réduction du facteur de translocation des métaux (transfert vers les feuilles). On a constaté en effet, que les plantes inoculées avaient généralement moins de métaux lourds dans leurs feuilles, alors que leurs racines en accumulaient nettement plus. Or y a 2 hypothèses possibles concernant le mécanisme d'action des AMF : un effet barrière (de filtration) dans les racines qui supposerait qu'il y ait accumulation des métaux dans la rhizosphère (autour des racines) ; ou une

accumulation des métaux dans le mycélium même des AMF, induisant ainsi une réduction des métaux également dans la rhizosphère. Cette dernière hypothèse est donc fortement confortée par ces résultats.

4.2.3.1.4. Effets des ECM et des AMF sur la croissance de Tristaniopsis glauca ; interactions avec l'effet des boues de STEP

Comme noté plus haut, les résultats obtenus pour l'espèce *T. glauca* ont malheureusement été faussés par les inondations ayant touchés plusieurs traitements. Ils sont donc difficiles à interpréter tout au moins en termes de croissance, puisque les parcelles inoculées en AMF ou ECM ou/et amendées avec des boues sont touchées par les inondations, alors que les parcelles témoins ne le sont pas, ce qui explique l'effet globalement négatif des traitements (Fig. 80, voir précédemment). Nous ne discuterons donc pas plus le détail de ces résultats.

La figure 89 indique cependant, qu'en termes de poids, la combinaison « AMF + boues de STEP » montre une amélioration par rapport au témoin. Ceci signifie donc quoiqu'il en soit que l'inoculation en AMF combiné à l'amendement avec des boues de STEP produit, malgré l'inondation, une stimulation de la croissance et cela même si les taux de mycorhization sont relativement faibles pour cette plante qui a plus d'affinité avec les champignons ECM qu'avec les AMF.

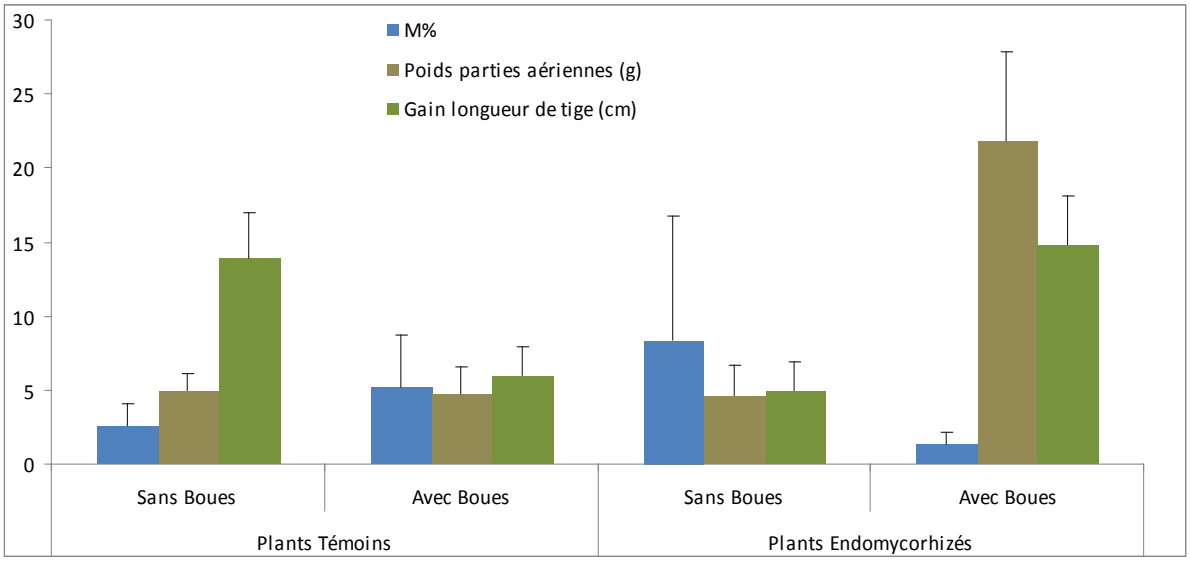


Figure 89 : Influence de l'inoculation en AMF (endomycorhizés) et des boues de station d'épuration (Boues) sur la croissance (poids de la partie aérienne et gain en hauteur des plants depuis la plantation) et la mycorhization par les AMF (M %) de *Tristaniopsis glauca* sur le topsoil dégradé.

L'effet des champignons ECM sur le poids des plants, en fin d'expérimentation, n'est pas significatif et n'est pas représenté ici. Compte-tenu du biais lié à l'inondation, on ne peut pas prendre en considération ce résultat.

En ce qui concerne les taux de mycorhization ECM des plants inoculés, ils sont également très faibles et varient de 0,36% à 1,6% (Fig. 90).

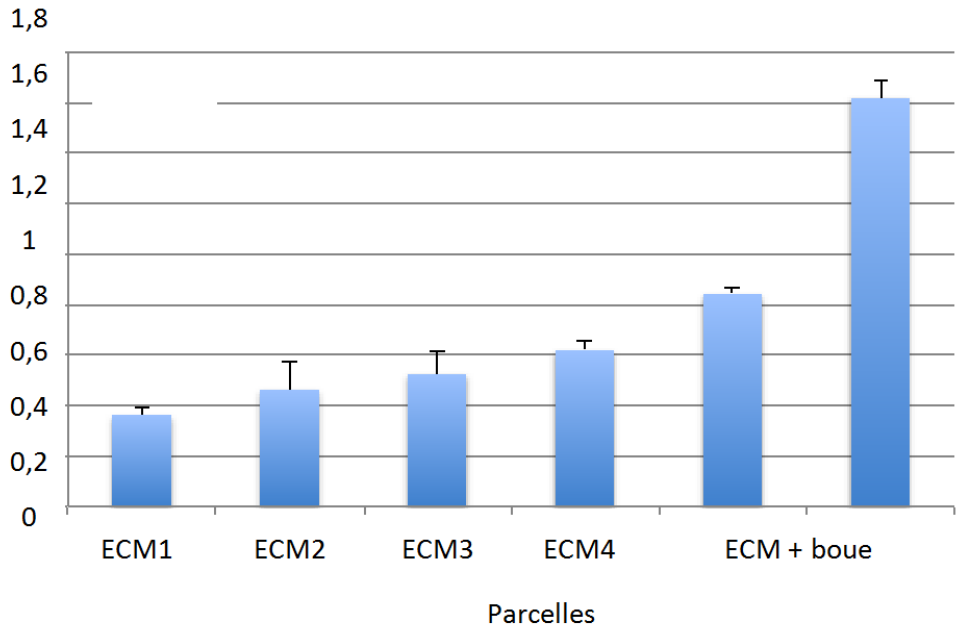


Figure 90 : Pourcentage de mycorhization des plants de *Tristaniopsis glauca* inoculé avec la souche 336 de *Pisolithus Albus*. Ici seuls les plants inoculés en ECM ont été mesurés : ECM 1 à 4 = plants inoculés des 4 parcelles MNOP ; ECM+ boue = plants des 2 parcelles inoculées et amendées en boue de STEP.

Des racines ont été prélevées sur les plants de *Tristaniopsis* et une analyse qualitative des ECM trouvés a été évaluée par extraction de l'ADN et séquençage du marqueur moléculaire fongique ITS. Cette analyse montre la colonisation des racines de *Tristaniopsis* par un champignon ectomycorhizien. Cet ECM est non déterminé, et ne correspond pas à la souche inoculée (*Pisolithus albus*). Cela suggère que le champignon inoculé 2 ans auparavant a disparu et a été remplacé par un autre ECM présent dans le sol de l'expérimentation réalisée *in situ*. L'une des explications probables serait que l'engorgement régulier des sols du site expérimental a été nocif à *Pisolithus albus* adapté à des sols plus aérés. En conséquence il n'a pas été possible d'effectuer les essais complémentaires de validation des marqueurs moléculaires tels prévus dans la tâche 1 (sous tâche 1.2).

4.2.3.1.5. Effets des ECM et des AMF sur la nutrition minérale de Tristaniopsis laurifolia ; interactions avec l'effet des boues de STEP

Teneurs en phosphore

Malgré les perturbations de la croissance liée aux inondations, les teneurs en phosphore sont globalement améliorées par les boues de STEP et la mycorhization (Fig. 91). Cette amélioration est plus nette au niveau des tiges. En ce qui concerne les feuilles, l'effet des boues, des AMF et surtout de leur combinaison est significatif.

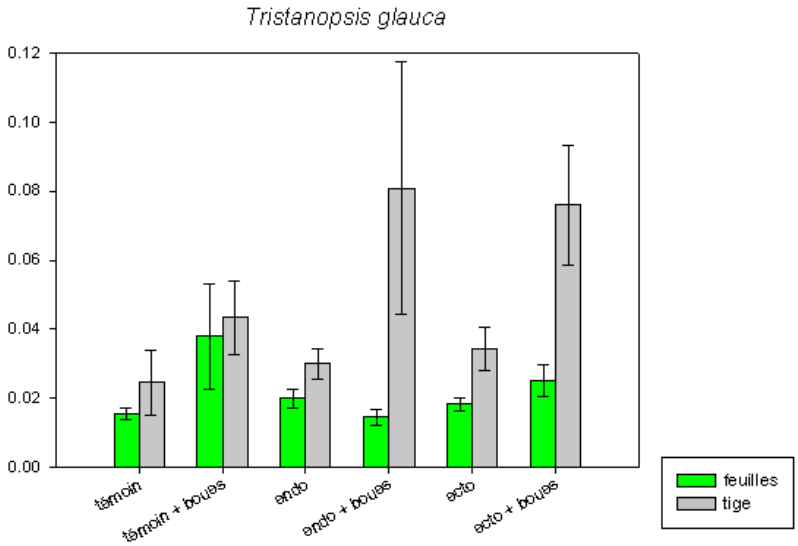


Figure 91 : Teneurs en phosphore des feuilles et tiges de *Tristaniopsis glauca* soumis à un amendement en boue de STEP (boue), inoculée en AMF (endo), ou en ECM (ecto) ou à la combinaison de 2 traitements (endo + boues ou ecto+ boues).

Azote et calcium

Le dosage du potassium n'a pas pu être réalisé dans ce cas. Les teneurs en N et Ca dans les feuilles et les tiges des plants de *T. glauca* amendées en boues ou inoculés avec des champignons mycorhiziens sont toujours supérieures à celles obtenus pour le témoin (Tab. 10). Toutefois les différences ne sont pas toujours significatives. L'effet des boues est le plus net.

Ainsi, d'une façon générale, et cela malgré les perturbations introduites par les inondations, une amélioration de la nutrition minérale des plants de *T. glauca* par les boues et les symbiotes fongiques est obtenue.

Tableau 10 : Teneurs totales en éléments N et Ca (K n'a pas pu être déterminé ici) dans les racines et les feuilles de *Tristaniopsis glauca* en fin d'expérience.

N (%)	Feuilles	Tiges
Témoin	0,430 ± 0,158	0,342 ± 0,038
+Boues	0,642 ± 0,195	0,485 ± 0,143
+AMF	0,543 ± 0,084	0,360 ± 0,113
+Boues +AMF	0,558 ± 0,155	0,496 ±0,127
ECM	0,516 ± 0,135	0,426 ± 0,171
+ECM+Boues	0,474 ± 0,143	0,369 ± 0,145
Ca (mg/g)	5,9 ± 1,6	5,6 ± 0,8
Témoin	15,9 ± 1,2	7,9 ± 4,0
+Boues	6,2 ± 1,7	6,4 ± 1,4
+AMF	10,8 ± 4,5	6,2 ± 3,4
+Boues +AMF	9,6 ± 7,2	4,9 ± 0,6
+ECM	17,2 ± 2,2	6,0 ± 2,3
+ ECM+Boues	5,9 ± 1,6	5,6 ± 0,8

Teneurs en métaux des plantes

En ce qui concerne, l'effet des traitements sur l'absorption des métaux (Tab. 11), aucune

différence significative n'est constatée pour le fer au niveau des feuilles. On note par contre, une réduction des teneurs en Fe dans les racines pour les plants inoculés en AMF. Il en est de même pour le manganèse et le nickel : pas d'effet clairs, même si les valeurs moyennes sont plus faibles dans les racines pour les traitements AMF et ECM (pour Mn) et AMF et ECM+boues (pour Ni). Le cobalt donne des résultats similaires, avec juste une différence significativement plus faible dans les racines pour le traitement avec les boues.

Tableau 11 : Teneurs totales en métaux dans les feuilles et les racines de *Carpolepis laurifolia* en fin d'expérience.

Fe (µg/g)	Feuilles	Racines
Témoin	513,0 ± 274,6	1955,3 ± 870,5
+Boues	701,3 ± 291,8	916,1 ± 403,1
+AMF	573,5 ± 174,3	660,5 ± 265,8
+Boues +AMF	547,2 ± 375,5	794,6 ± 344,7
+ECM	591,1 ± 72,9	1312,1 ± 392,4
+ ECM+Boues	861,7 ± 403,6	967,8 ± 590,2
Mn (µg/g)		
Témoin	403,6 ± 105,5	64,9 ± 23,5
+Boues	409,7 ± 178,1	50,0 ± 58,4
+AMF	376,6 ± 155,4	37,7 ± 21,7
+Boues +AMF	422,6 ± 209,1	49,3 ± 19,7
+ECM	382,3 ± 74,6	32,8 ± 12,1
+ ECM+Boues	516,9 ± 242,9	61,4 ± 19,9
Ni (µg/g)		
Témoin	11,5 ± 1,4	27,1 ± 12,0
+Boues	17,6 ± 7,0	19,3 ± 9,7
+AMF	15,0 ± 5,2	14,3 ± 4,6
+Boues +AMF	12,4 ± 5,4	17,2 ± 7,3
+ECM	15,4 ± 4,8	29,9 ± 12,4
+ ECM+Boues	19,7 ± 14,8	17,7 ± 8,7
Co (µg/g)		
Témoin	5,0 ± 0,7	3,1 ± 1,2
+Boues	9,1 ± 4,1	1,4 ± 0,6
+AMF	6,9 ± 4,0	2,0 ± 0,5
+Boues +AMF	4,7 ± 4,7	2,4 ± 1,4
+ECM	8,0 ± 3,0	5,5 ± 5,9
+ ECM+Boues	9,9 ± 8,9	4,0 ± 1,2

Une amélioration de la nutrition minérale de *T. glauca*, est donc notée pour P, N et Ca , en relation avec la mycorhization et l'apport de boues de STEP, mais l'interférence des effets des inondations suggère que les effets, auraient probablement été plus nets en absence de ce phénomène, comme c'est le cas pour *C. laurifolia*.

En termes de perspective, dans le cadre de cette expérimentation de terrain avec des ECM, seule l'espèce *Pisolithus albus* a pu être bien étudiée, car facilement récoltable et cultivable. Les inondations ayant faussé les résultats, il serait utile que des expérimentations similaires *in situ* soient refaites prochainement. En effet, l'importance et le rôle de l'ECM dans la croissance et la vigueur des jeunes plants cultivés en pépinière a été démontré dans de nombreuses autres études d'inoculation de champignons ECM, (Rai & Ajit, 2011). Il serait également souhaitable d'identifier et de rechercher d'autres espèces fongiques ECM cultivables pour élargir les connaissances et valider les résultats obtenus avec *P. albus* à ces autres espèces fongiques. De plus, il faut compléter ces études par des travaux sur la spécificité de la

symbiose entre plante hôte, espèces fongique et écotype, afin d'établir les couples champignon ECM/ plante hôte les plus performants. L'objectif à terme est de pouvoir constituer une collection d'ECM cultivables à des fins d'exploitation comme inoculum fongique dans les stratégies de restauration écologiques utilisant des plantes endémiques à statut ECM.

4.2.3.1.6. Conclusion

L'expérimentation au champ sur l'influence des champignons mycorhiziens, des boues de STEP et de leur combinaison, démontre de façon claire l'intérêt d'une inoculation des plants en pépinière avec des champignons mycorhiziens adaptés, en particulier lorsque le topsoil utilisé a été stocké. Cette expérimentation démontre aussi clairement la complémentarité des effets des symbiotes fongiques et des boues de STEP. On constate que les boues de STEP stimulent la mycorhization et que les effets des 2 traitements en termes d'amélioration de la croissance s'additionnent. Cette expérimentation sur le terrain mériterait cependant d'être refaite sur d'autres espèces, car les résultats obtenus pour la deuxième espèce testée ici ne sont pas valides et bien que de nombreux travaux en serre démontrent l'intérêt de l'inoculation en AMF sur diverses espèces végétales, la vérification sur plus d'une espèce au champ serait utile.

4.2.3.2. Influence des boues de STEP sur la croissance des plantes ; interaction avec les champignons mycorhiziens

4.2.3.2.1. Qualité de la boue

Les boues utilisées au cours de cette expérience sont assez caractéristique de boues issues de lit de séchage. En effet, les boues issues des stations d'épuration à boues activées de Nouvelle-Calédonie présentent généralement des valeurs supérieures à 60% de matière organique lorsqu'elles proviennent de la sortie de filtres presse. Lors de l'utilisation des anciennes techniques de séchage sur lit, ces teneurs étaient de 20 à 35% de la matière sèche. Cette variable n'est pas souvent rapportée dans la littérature. Toutefois (Brofas, et al., 2000), la boue utilisée est supérieure à cette présente étude avec 39% de la matière sèche. Si la teneur en azote est dans l'ordre de grandeur des boues utilisées sur les sites miniers 2 à 4% de la matière sèche, il n'en est pas de même pour le phosphore. En effet, avec seulement 0,4% de phosphore total dans les boues utilisées pour cette expérience, on est très loin des valeurs couramment observées dans la littérature avec 1,5 à 2% de MS (Topper and Sabey, 1986 ; Brofas et al., 2000 ; Stehouwer, Sutton, Fowler, and Dick, 1995 ; Sabey, Pendleton, and Webb, 1990).

Ces différents éléments indiquent que les boues testées dans cette expérimentation apportent gobalement moins de carbone et de phosphore que celles issues des stations à boues activées (cas le plus fréquent).

4.2.3.2.2. Evolution de la croissance en hauteur des plants

La figure 92 représente la croissance moyenne des plants pour les 4 traitements testés au cours de cette expérimentation. Les droites de régression obtenues sont toutes significatives ($P<0,001$) et tous les paramètres sont significativement différent de « 0 ».

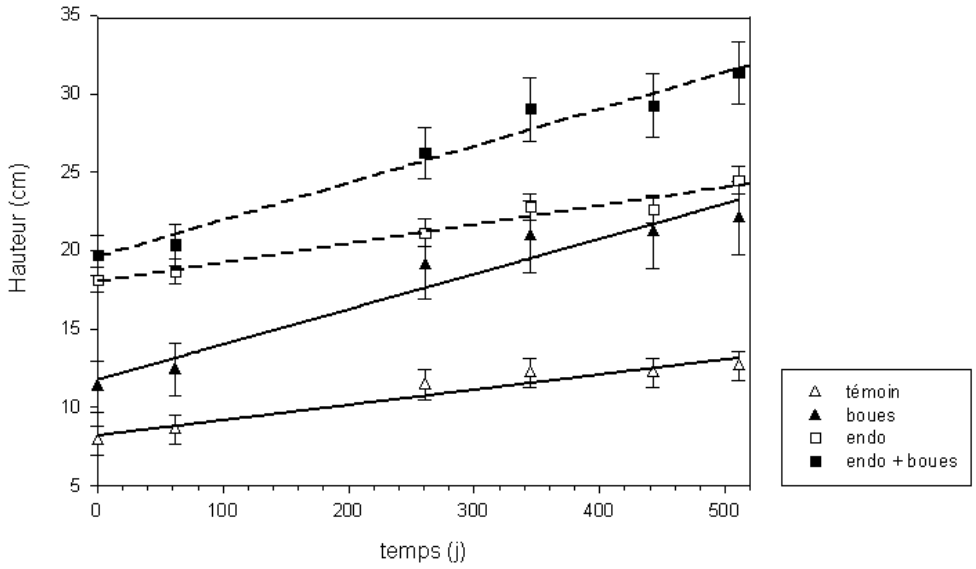


Figure 92 : représentation linéaire de la croissance de *Carpolepis laurifolia* dans les différents traitements

La comparaison de ces droites entre elles (par méthode Ancova) montre qu'il n'y a aucune différence significative entre les pentes des traitements « boues seules » et « boues et plants mycorhizés ». De la même manière, il n'y a aucune différence significative entre les pentes des traitements « témoins » et « plants mycorhizés sans boues », leur différence étant forte avant plantation. Par contre il y a une différence significative entre ces deux groupes de pentes. Cela signifie que les plants en présence de boues montrent une vitesse de croissance significativement plus rapide que les plants non amendés en boues. Il semble que l'apport de nutriments (par les boues de station d'épuration) est en grande partie responsable de la rapide croissance en hauteur de *C. laurifolia* en présence de boues, tandis que l'effet de la mycorhization sur les plants est en grande partie lié à leur avantage initial provenant du développement en pépinière après inoculation en AMF.

Dans le cas de *Tristaniopsis glauca*, aucune évolution linéaire de la croissance n'a pu être mise en évidence. L'évolution de la croissance de cette espèce est plutôt sigmoïdale et peut être représentée par une courbe de Chapman Richard dont la relation générale est la suivante :

$$H = H_0 + a(1 - e^{bt})^c$$

ou

H : la hauteur (en cm)

$H_{0:}$: la hauteur initiale (en cm)

t : le temps (en jours)

a, b, c : les paramètres ajustés du modèle

L'ajustement à une courbe de Chapman-Richard est un modèle couramment utilisé pour simuler la croissance individuelle d'un arbre. Ces relations dont les paramètres sont présentés dans le Tableau 12 sont significatives. Toutefois, tous les paramètres ne le sont pas et il faut prendre ces relations avec précaution. De cette relation générale, le paramètre « a » représente le gain maximal que peut prétendre l'arbre en cours de croissance. Aussi, il semble que *Tristaniopsis glauca*, a atteint sa croissance maximale et que, dans les conditions dans lesquelles se trouve cette espèce, elle peut gagner au mieux 16,6 cm (pour les témoins) et de 4 à 10cm pour les autres traitements. Il semble par ailleurs que l'apport d'amendement avec ou sans mycorhisation soit défavorable à la croissance en hauteur de cette espèce (Fig. 93). Ces

résultats sont aberrants et sont liés aux inondations subies par les parcelles de *T. glauca* avec boues et/ou AMF (voir Fig. 80).

Tableau 12 : listes des paramètres obtenus pour les relations de Chapman-Richard pour *Tristaniopsis glauca* (SigmaPlot).

paramètre	témoin	boues	endomychorhize	endomychorhize + boues	ectomycorhizes	ectomycorhizes + boues
H0	5,08	3,66	5,79	6,03	6,48	6,30
a	16,61	4,98	3,92	10,25	4,93	6,80
b	0,03	0,05	0,06	0,04	0,06	0,06
c	3173,15	1059966,89	10684176,35	18054,72	6859567,62	8477458,70
P	*<0,0001*	*0,017*	*0,004*	*0,004*	*0,003*	*0,021*

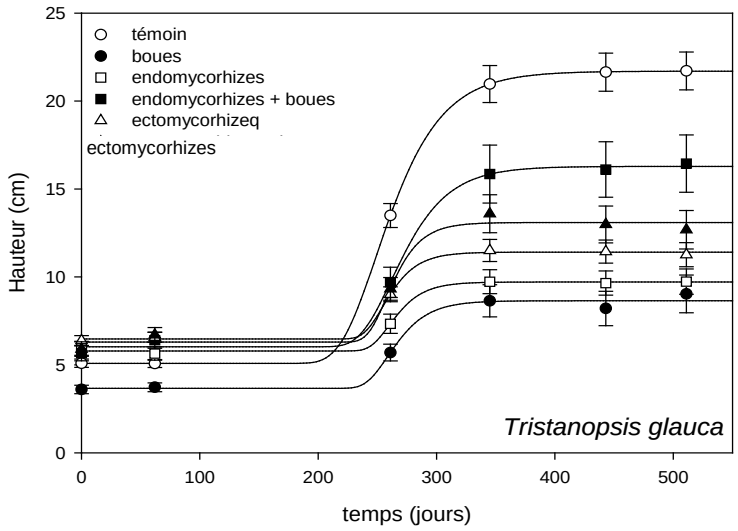


Figure 93 : évolution des croissances moyennes de *Tristaniopsis glauca* et leur représentation selon un modèle de croissance Chapman-Richard

4.2.3.2.3. Effet sur la biomasse aérienne

Rapport feuille-tige

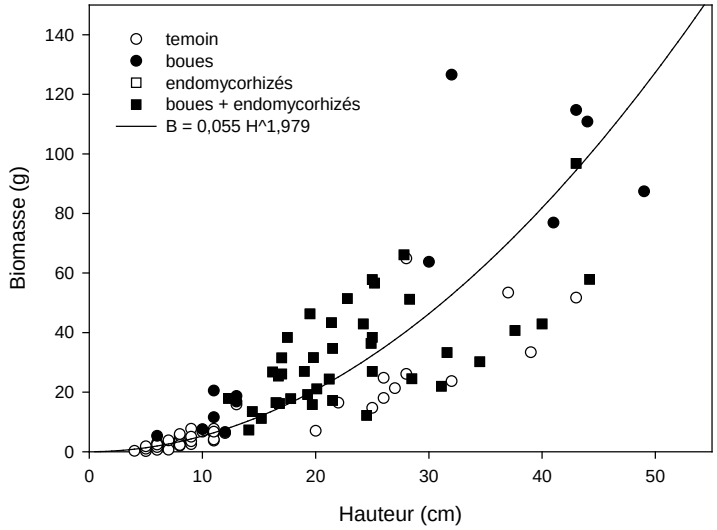
Dans le volet 2 du présent projet, il a été montré que la biomasse aérienne de *Carpolepis laurifolia* était significativement augmentée en présence de boues et/ou de mycorhization. Cette biomasse aérienne est représentée par 81,6±1.2% de feuilles dans le cas des plants témoins. L'apport de boues d'épuration implique une diminution de la proportion de feuillage au profit de la partie ligneuse (78,1±2,1% et 75,2±2.0% pour les traitements boues et boues + mycorhization respectivement).

Dans le cas de *Tristaniopsis glauca*, seul le traitement « boues + mychorization des plants » montre une tendance à l'augmentation de la biomasse aérienne (voir Fig. 89). Toutefois, à l'inverse de *C. laurifolia*, le traitement témoin, avec 69,6±1.3%, présente une proportion significativement plus faible de la partie foliaire. Les autres traitements ne présentent pas de différence entre eux avec des valeurs entre 75,3±1,4 et 79,2±1,3% de biomasse foliaire.

Relation Hauteur-Biomasse

Il est possible de trouver des relations empiriques entre la biomasse de la partie aérienne (qui ne peut être mesurée qu'après sacrifice des plants) et la hauteur qui est une variable facilement accessible sur le terrain tout au long de l'expérimentation. Une relation positive significative (P<0,001) a pu être mise en évidence. Il semblerait qu'il soit possible d'estimer la biomasse de *Carpolepis laurifola* par rapport à la hauteur individuelle de l'arbre (pour des arbres inférieurs à 50 cm). La variable hauteur expliquerait 84% de la variabilité de la biomasse (Fig. 94).

Dans le cas de *Tristaniopsis glauca*, ce même type de relation semble exister. Cependant la hauteur seule ne semble expliquer que 50% de la variabilité.



$$B = 0{,}055H^{1{,}979}$$

ou

B : biomasse d'un arbre (en g)

H : la hauteur (en cm)

Figure 94 : courbe d'estimation de la biomasse d'un individu *C. laurifolia* en fonction de sa hauteur

4.2.3.2.4. Effet sur la surface foliaire

A l'instar de la biomasse aérienne, la surface foliaire de *Carpolepis laurifolia* se trouve significativement améliorée en présence de boue et/ou de plants mycorhizés (Fig. 95). La présence combinée de boues pour des plants mycorhizés présente la surface foliaire la plus importante sans toutefois être significativement plus forte que le traitement avec boues seules. Dans le cas de *Tristaniopsis glauca*, seuls les plants endomycorhizés et ectomycorhizés, en présence de boue présentent des performances au moins égales aux plants témoins. Les autres traitements (boues, plants endomycorhizés et ectomycorhizés seuls) semblent être impactés négativement sur la production foliaire (Fig. 96), en relation avec les inondations subies par les parcelles correspondantes.

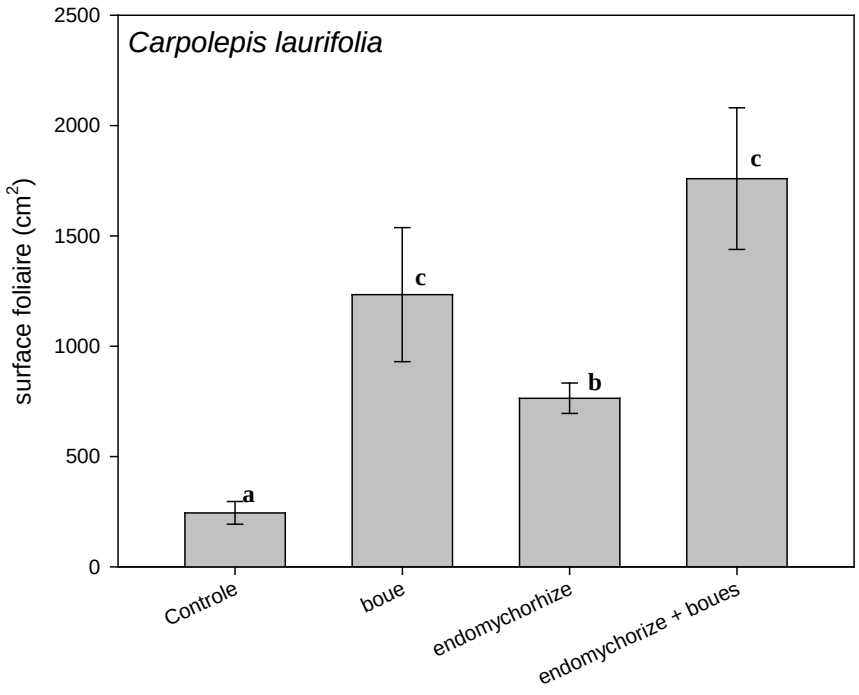


Figure 95 : surface foliaire moyenne par plants de *Carpolepis laurifolia*

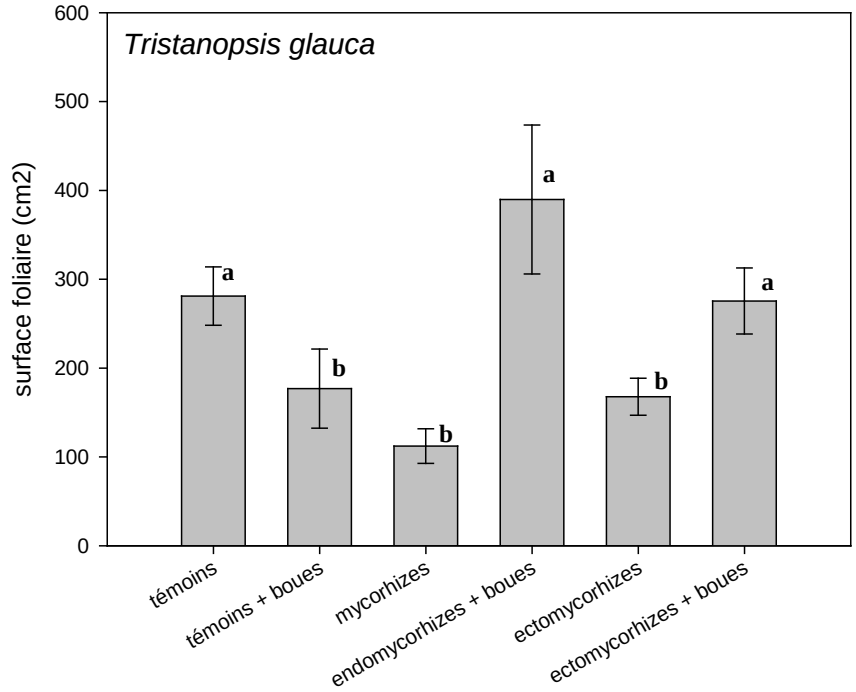


Figure 96 : surface foliaire moyenne par plants de *Tristaniopsis glauca*

4.2.3.2.5. Effet sur les nutriments N et P

Les quantités d'azote et de phosphore moyennes stockées par plant tendent à augmenter dans les plants en présence de boues. Cette tendance semble amplifiée par la mycorhization. Cependant, la variabilité est importante, de sorte que ces différences ne sont pas partout

significatives (Fig. 97).

Les quantités de nutriments observées dans la biomasse des plants exposés aux boues d'épuration représentent près de 10% de la quantité apportée par les boues pour *Carpolepis laurifolia* et c'est encore plus faible pour *Tristaniopsis glauca*. Ceci laisse supposer que la matière organique est difficilement minéralisable et est donc peu disponible pour les plantes. En effet, le taux de minéralisation des boues peut être variable avec des valeurs qui s'étendent de 1 à 50% de l'azote (Parker et Sommers, 1983 ; Chae et Tabatabai, 1986 ; Voos et Sabey, 1987 ; Adegbidi and Briggs, 2003).

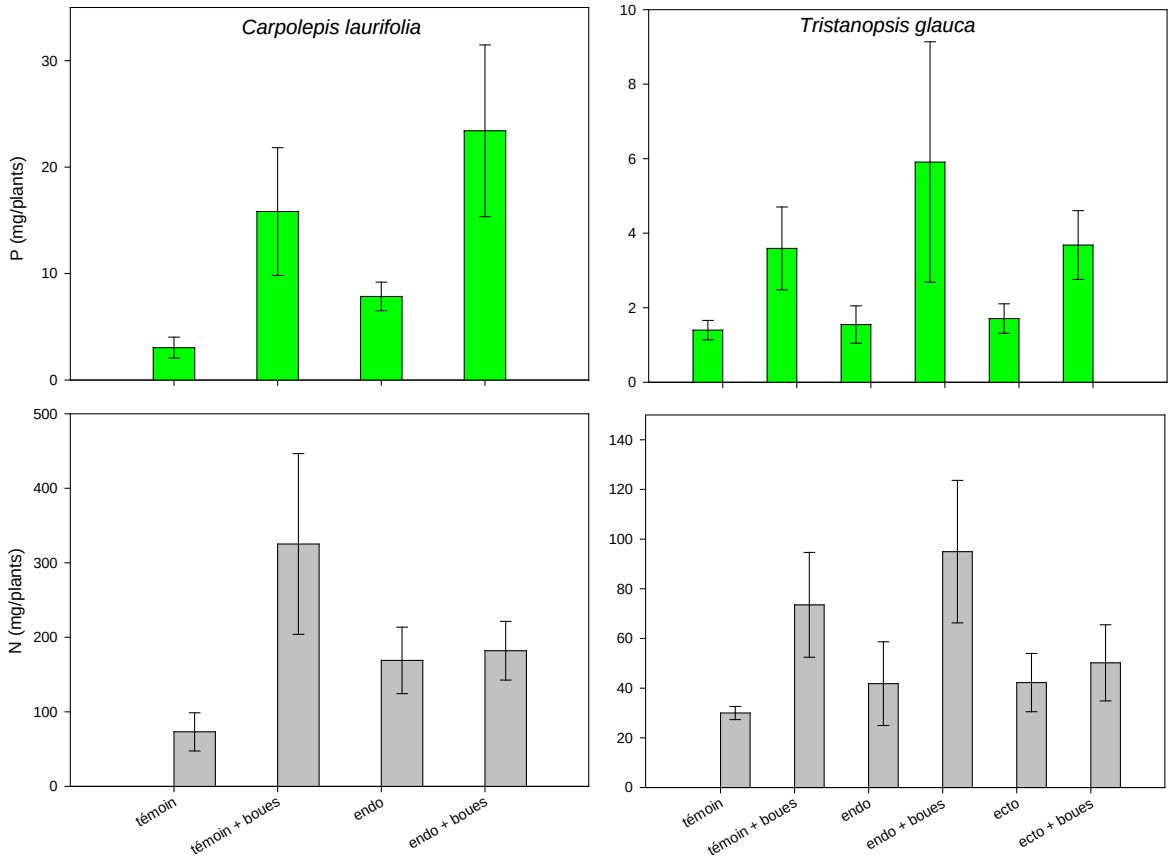


Figure 97 : quantité d'azote et de phosphore moyen dans les plants de *C. laurifolia* et *T. glauca*

Cependant, plus que la quantité de nutriment dans la plante, c'est le rapport N/P qui peut représenter une variable importante. En effet, selon Koerselman et Meuleman (1996), les valeurs N/P>16 indique une certaine limitation par le phosphore. Dans le cadre de notre étude, ces rapports dans les feuilles sont nettement supérieurs à cette valeur seuil. Ceci semble indiquer que les plants présentent une certaine déficience en phosphore et que cet élément représente le facteur limitant de la croissance de ces plantes. Cependant, il est remarquable que l'apport de boues montre une certaine tendance à réduire ce rapport N/P chez *C. laurifolia*, cette tendance étant amplifiée en présence de champignons mycorhiziens (Fig. 98).

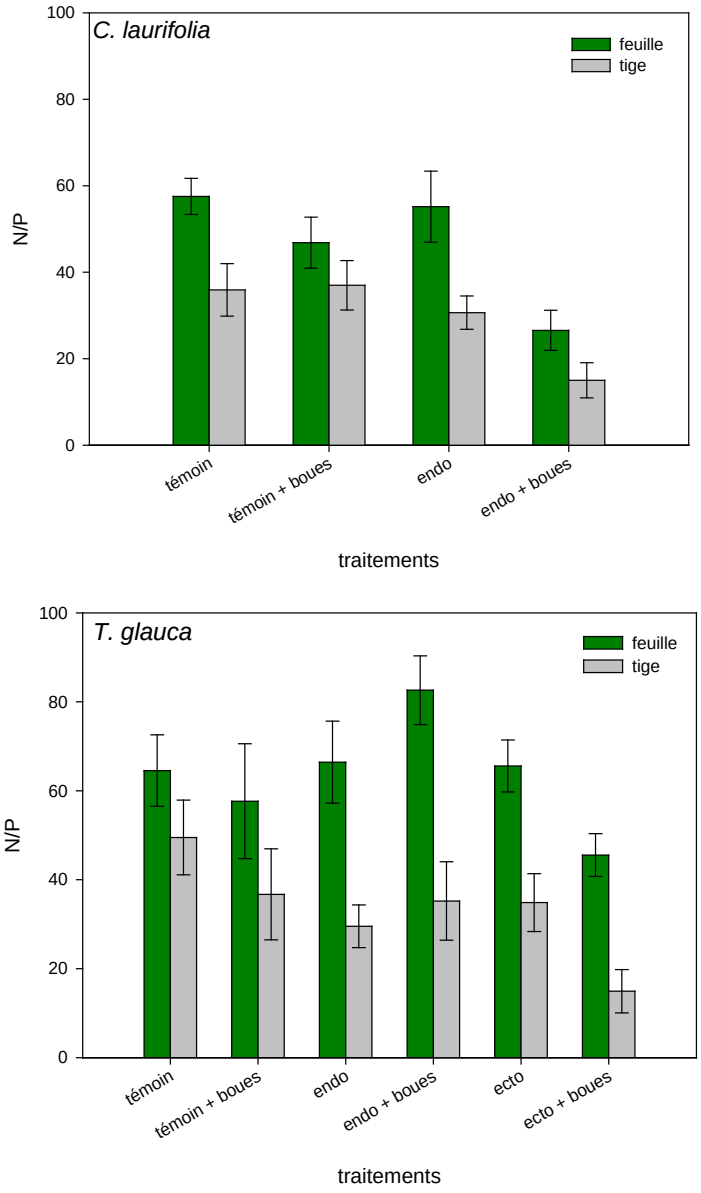


Figure 98 : rapport N/P dans les différentes parties des plants de *C. laurifolia* et *T. glauca*

4.2.3.3. Influence des divers traitements sur la diversité des AMF

Onze mois après le début de l'expérimentation, l'ADN des racines de 4 plants de carpolepis pour chaque modalité a été extrait. Après clonage dans la bactérie E. coli, les clones individuels ont été séquencés pour procéder à l'identification taxonomique des isolats fongiques.

Au total, 157 séquences ont été analysées et regroupées en 32 OTU, soit une moyenne de 4,91 séquences par OTU identifié. Le tableau 13 reprend les résultats de l'analyse globale de la diversité.

Tableau 13 : Diversité en AMF associés aux racines de *Carpolepis laurifolia* 11 mois après le début de l'expérimentation

	Traitement				
	Non Inoculé (NI)	*Inoculé (I)*	*Non Inoculé + Boue (NIB)*	*Inoculé + Boue (IB)*	**Total**
Nombre de séquences	37	58	31	31	**157**
Nombre d'OTU	9	25	8	8	**32**
Séquences / OTU	4,11	2,32	3,88	3,88	**4,91**
Indice de Shannon	1,46	2,42	1,15	1,15	

Le premier point marquant qui apparaît sur ces résultats est la très nette augmentation de la diversité en AMF dans les racines des plants inoculés par rapport aux plants témoins. L'inoculation serait donc un vecteur important pour la mise en place d'un cortège racinaire fongique de grande diversité.

D'autre part, l'amendement avec les boues de STEP agit en réduisant fortement la diversité des AMF présents. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que l'enrichissement du sol en matière organique rend les végétaux moins dépendants de la présence de champignons endomycorhiziens.

Il était également intéressant d'observer la diversité taxonomique des champignons endomycorhiziens rencontrés dans les racines de carpolepis en fonction des différents traitements. Plus particulièrement, nous avons cherché à savoir si les souches utilisées pour l'inoculation initiale étaient toujours présentes dans les racines des plants inoculés. Rappelons que trois souches d'AMF ont été utilisées pour cette inoculation : RARC2 et PSO1 sont des diversisporales du genre Acaulospora génétiquement et morphologiquement proches d'*Acaulospora longula* ou d'*Acaulospora rugosa* ; PSB1 appartient à l'ordre des glomérales et est un *Claroideoglomus etunicatum*.

L'ensemble des séquences des 32 OTU obtenus a été aligné avec des séquences de références issues des bases de données afin de reconstruire l'arbre phylogénétique présenté dans la figure 99 et résumé dans le tableau 14.

Figure 99 (page suivante) : Arbre phylogénétique des séquences d'AMF observées dans les racines de *Carpolepis laurifolia*

Les séquences issues des bases de données sont indiquées avec leur code d'accès. Les séquences notées SSUcons#XX sont extraites de Krüger *et al* (2012). Les branches regroupant les séquences appartenant au même genre sont regroupées sous une même couleur. Les familles et les ordres sont indiqués sur la droite de la figure. Les séquences appartenant au même ordre sont entourées par un cadre pointillé. Les séquences correspondant aux OTU que nous avons définies sont indiquées par CARPO_XX. Les OTU représentés dans les racines des plants non inoculés sont repérés par un cercle blanc, ceux retrouvés dans les racines des plants inoculés sont indiqués par un cercle noir. Les OTU correspondants aux plants non inoculés amendés par des boues de STEP sont suivis d'un carré blanc et les OTU présents dans les mêmes plants mais ayant été préalablement inoculés sont indiqués par un carré noir.

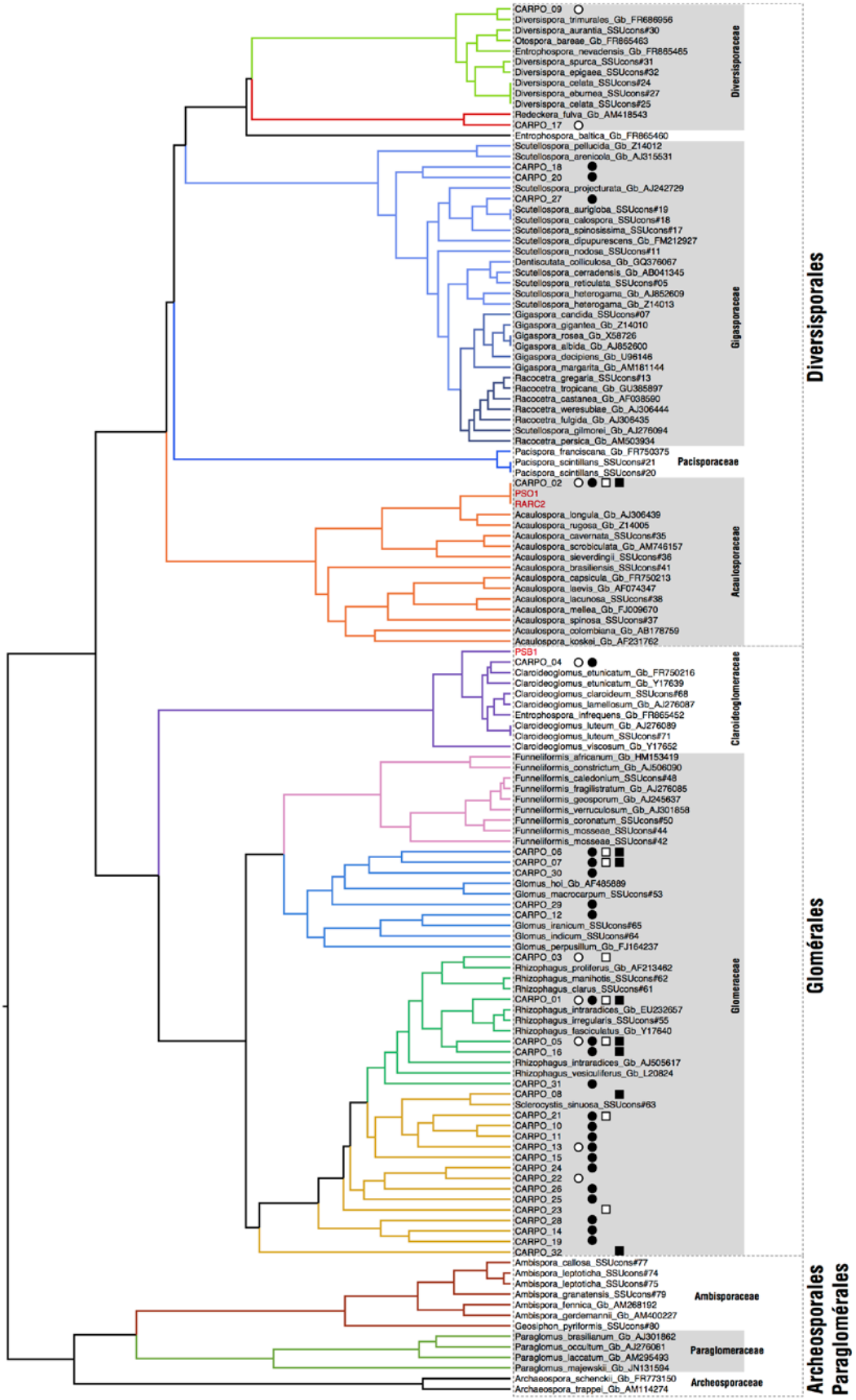

CARPO_09
Diversispora_trimurales_Gb_FR686956
Diversispora_aurantia_SSUcons#30
Otospora_bareae_Gb_FR865463
Entrophospora_nevadensis_Gb_FR885465
Diversispora_spurca_SSUcons#31
Diversispora_epigaea_SSUcons#32
Diversispora_celata_SSUcons#24
Diversispora_eburnea_SSUcons#27
Diversispora_celata_SSUcons#25
Redeckera_fulva_Gb_AM418543
CARPO_17
Entrophospora_baltica_Gb_FR865460
Diversisporaceae
Scutellospora_pellucida_Gb_Z14012
Scutellospora_arenicola_Gb_AJ315531
CARPO_18
CARPO_20
Scutellospora_projecturata_Gb_AJ242729
CARPO_27
Scutellospora_aurigloba_SSUcons#19
Scutellospora_calospora_SSUcons#18
Scutellospora_spinosissima_SSUcons#17
Scutellospora_dipurpurescens_Gb_FM212927
Scutellospora_nodosa_SSUcons#11
Dentiscutata_colliculosa_Gb_GQ376067
Scutellospora_cerradensis_Gb_AB041345
Scutellospora_reticulata_SSUcons#05
Scutellospora_heterogama_Gb_AJ852609
Scutellospora_heterogama_Gb_Z14013
Gigaspora_candida_SSUcons#07
Gigaspora_gigantea_Gb_Z14010
Gigaspora_rosea_Gb_X58726
Gigaspora_albida_Gb_AJ852600
Gigaspora_decipiens_Gb_U96146
Gigaspora_margarita_Gb_AM181144
Racocetra_gregaria_SSUcons#13
Racocetra_tropicana_Gb_GU385897
Racocetra_castanea_Gb_AF038590
Racocetra_weresubiae_Gb_AJ306444
Racocetra_fulgida_Gb_AJ306435
Scutellospora_gilmorei_Gb_AJ276094
Racocetra_persica_Gb_AM503934
Gigasporaceae
Pacispora_franciscana_Gb_FR750375
Pacispora_scintillans_SSUcons#21
Pacispora_scintillans_SSUcons#20
Pacisporaceae
CARPO_02
PSO1
RARC2
Acaulospora_longula_Gb_AJ306439
Acaulospora_rugosa_Gb_Z14005
Acaulospora_cavernata_SSUcons#35
Acaulospora_scrobiculata_Gb_AM746157
Acaulospora_sieverdingii_SSUcons#36
Acaulospora_brasiliensis_SSUcons#41
Acaulospora_capsicula_Gb_FR750213
Acaulospora_laevis_Gb_AF074347
Acaulospora_lacunosa_SSUcons#38
Acaulospora_mellea_Gb_FJ009670
Acaulospora_spinosa_SSUcons#37
Acaulospora_colombiana_Gb_AB178759
Acaulospora_koskei_Gb_AF231762
Acaulosporaceae
Diversisporales
PSB1
CARPO_04
Claroideoglomus_etunicatum_Gb_FR750216
Claroideoglomus_etunicatum_Gb_Y17639
Claroideoglomus_claroideum_SSUcons#68
Claroideoglomus_lamellosum_Gb_AJ276087
Entrophospora_infrequens_Gb_FR865452
Claroideoglomus_luteum_Gb_AJ276089
Claroideoglomus_luteum_SSUcons#71
Claroideoglomus_viscosum_Gb_Y17652
Claroideoglomeraceae
Funneliformis_africanum_Gb_HM153419
Funneliformis_constrictum_Gb_AJ506090
Funneliformis_caledonium_SSUcons#48
Funneliformis_fragilistratum_Gb_AJ276085
Funneliformis_geosporum_Gb_AJ245637
Funneliformis_verruculosum_Gb_AJ301858
Funneliformis_coronatum_SSUcons#50
Funneliformis_mosseae_SSUcons#44
Funneliformis_mosseae_SSUcons#42
CARPO_06
CARPO_07
CARPO_30
Glomus_hoi_Gb_AF485689
Glomus_macrocarpum_SSUcons#53
CARPO_29
CARPO_12
Glomus_irranicum_SSUcons#65
Glomus_indicum_SSUcons#64
Glomus_perpusillum_Gb_FJ164237
CARPO_03
Rhizophagus_proliferus_Gb_AF213462
Rhizophagus_manihotis_SSUcons#62
Rhizophagus_clarus_SSUcons#61
CARPO_01
Rhizophagus_intraradices_Gb_EU232657
Rhizophagus_irregularis_SSUcons#55
Rhizophagus_fasciculatus_Gb_Y17640
CARPO_05
CARPO_16
Rhizophagus_intraradices_Gb_AJ505617
Rhizophagus_vesiculiferus_Gb_L20824
CARPO_31
CARPO_08
Sclerocystis_sinuosa_SSUcons#63
CARPO_21
CARPO_10
CARPO_11
CARPO_13
CARPO_15
CARPO_24
CARPO_22
CARPO_26
CARPO_25
CARPO_23
CARPO_28
CARPO_14
CARPO_19
CARPO_32
Glomeraceae
Glomérales
Ambispora_callosa_SSUcons#77
Ambispora_leptoticha_SSUcons#74
Ambispora_leptoticha_SSUcons#75
Ambispora_granatensis_SSUcons#79
Ambispora_fennica_Gb_AM268192
Ambispora_gerdemannii_Gb_AM400227
Ambisporaceae
Geosiphon_pyriformis_SSUcons#90
Paraglomus_brasilianum_Gb_AJ301862
Paraglomus_occultum_Gb_AJ276061
Paraglomus_laccatum_Gb_AM295493
Paraglomus_majewskii_Gb_JN131594
Paraglomeraceae
Archaeospora_schenckii_Gb_FR773150
Archaeospora_trappei_Gb_AM114274
Archeosporaceae
Archeosporales
Paraglomérales

Tableau 14 : Diversité des AMF dans les racines de Carpolepis

Pour chaque modalité (NI= Non Inoculé, I= Inoculé, NIB= Non Inoculé + Boue, IB= Inoculé + Boue), le nombre de séquences obtenues pour chaque genre d'AMF est indiqué.

CLASSE	ORDRE	FAMILLE	GENRE	NI	I	NIB	IB	Total
Glomeromycètes	Diversisporales	Diversisporaceæ	*Diversispora*	4	0	0	0	4
			Redeckera	2	0	0	0	2
		Pacisporaceæ	*Pacispora*	0	0	0	0	0
		Gigasporaceæ	*Scutellospora*	0	5	0	0	5
			Gigaspora	0	0	0	0	0
			Racocetra	0	0	0	0	0
		Acaulosporaceæ	*Acaulospora*	1	2	5	9	17
	Glomérales	Claroideoglomeraceæ	*Claroideoglomus*	10	1	0	0	11
		Glomeraceæ	*Funneliformis*	0	0	0	0	0
			Glomus	0	11	4	4	19
			Rhizophagus	17	17	20	11	65
			Sclérocystis	3	22	2	7	34
	Archeosporales	Ambisporaceae	*Ambispora*	0	0	0	0	0
			Géosiphon	0	0	0	0	0
		Archeosporaceæ	*Archéospora*	0	0	0	0	0
	Paraglomérales	Paraglomeraceæ	*Paraglomus*	0	0	0	0	0
			TOTAL	37	58	31	31	157

Comme dans l'expérience précédente, réalisée sur le topsoil étalé en andain, on note une nette prédominance des AMF appartenant aux genres *Sclerocystis* et *Rhizophagus* puisque ces deux genres représentent 63% des séquences totales identifiées. Un nombre important de séquences, notamment dans le genre *Sclerocystis* ne présente pas d'homologie claire avec les séquences présentes dans les bases de données. Ce fait est à approfondir car il peut indiquer la présence d'espèces originales qui présentent un intérêt d'autant plus grand que ce genre est largement représenté sur les terrains ultramafiques.

Nous avons vu que les plants préalablement inoculés présentent la diversité d'association avec les AMF la plus large. Pourtant, 11 mois après l'inoculation, on ne retrouve que très peu de séquences correspondant aux souches utilisées pour l'inoculation. En effet, sur les 58 séquences identifiées dans les racines des plants inoculés sans amendement, seulement 1 correspond à la souche PSB1 (*Claroideoglomus*) et 2 correspondent aux souches RARC2 et PSO1 (*Acaulospora*), soit environ 5%. Ainsi, si on note un effet de l'inoculation préalable sur la croissance des végétaux et sur la mise en place d'un cortège fongique diversifié, on observe un remplacement rapide des souches utilisées initialement. Il semble que l'inoculation préalable favorise l'installation des espèces que l'on retrouve plus couramment dans les milieux ultramafiques, à savoir des *Scutellospora*, des *Sclerocystis*. Les *Rhizophagus* sont également assez bien représentés dans les milieux ultramafiques, mais leur implantation ne semble pas dépendante de l'inoculation préalable puisqu'on les retrouve implanté dans toutes les racines, quelles que soient les modalités utilisées.

On observe une différence qualitative dans la représentation en AMF entre les plants non inoculés dans lesquels on retrouvera majoritairement des *Rhizophagus*, des *Claroideoglomus* et des *Diversispora*, alors que les plants inoculés présentent majoritairement des *Sclerocystis*, *Rhizophagus* et *Glomus*.

De la même façon, l'amendement avec les boues de STEP diminue très fortement la diversité des AMF associés avec les racines, mais cet amendement semble également influer sur la

représentation de chaque genre. Ainsi, l'implantation d'AMF du genre *Acaulospora* est fortement augmentée en présence de ces boues passant de 3,2% des séquences totales chez les plants non amendés à 22,6% chez les plants amendés.

Il semble donc clair que l'association avec les AMF est un phénomène extrêmement dynamique. Si on note un effet nettement positif de l'inoculation préalable des plants, il semble que cette inoculation avec des souches d'AMF à installation rapide (*Acaulospora*, *Claroideoglomus*) permet la mise en place rapide d'espèces plus performantes pour la croissance des plantes sur terrain ultramafique, comme les *Sclerocystis*. La mise en place d'un cortège varié de champignons, présents dans le topsoil permet une croissance efficace des végétaux. Néanmoins, en présence de quantités importantes de matière organique (amendement par les boues de STEP), des champignons moins adaptés aux sols miniers, comme les *Acaulospora* s'installeront. Cet apport de matière organique a un effet négatif sur la mise en place d'une forte diversité fongique.

4.3. CONCLUSION POUR LE VOLET 2

Ce volet comporte plusieurs types d'expérimentations sur les champignons mycorhiziens ECM et AMF.

Les résultats obtenus sont globalement satisfaisants et permettent une bonne appréhension des fonctions de ces symbiotes dans les écosystèmes ultramafiques, et corrélativement une meilleure visibilité des recommandations à émettre pour améliorer les techniques de revégétalisation dans une perspective de restauration écologique.

Les travaux sur la diversité des champignons ECM et AMF et l'étude du rôle des symbioses correspondantes dans l'adaptation des plantes aux conditions édaphiques extrêmes des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie, avaient déjà été initiés, notamment dans le cadre du projet ANR Ultrabio (2007-2010). Parmi les résultats importants, nous pouvons relever notamment, les points suivants:

1) Diversité et fonctions des champignons ECM des sols ultramafiques :

Nous avons pu montrer l'importance des champignons ECM dans les forêts et maquis miniers et leur diversité importante en termes de genres rencontrés (*Boletellus, Cortinarius, Pisolithus et Russula*) (Prin et al., 2012 ; Jourand et al, 2014b). Certains genres comme *Pisolithus*, développent des populations fongiques spécifiques (ou écotypes) adaptées aux sols ultramafiques (Jourand et al, 2010a). Des marqueurs moléculaires (gènes) de cette adaptation ont pu être mis en évidence, notamment dans le cas précis de la tolérance au nickel (Majorel et al., 2012).

Ces résultats sont en accord avec les travaux récents d'autres auteurs tels ceux de Urban et al (2008) ou Branco et al. (2010a,b): ces auteurs avaient décrit la diversité des ECM sur d'autres sols ultramafiques (USA et Europe) en insistant sur le fait que, malgré les conditions édaphiques extrêmes, cette diversité n'est pas réduite, voire même au contraire, permet le développement d'espèces d'ECM uniques (Moser et al., 2005). Dans ce sens, nos travaux confirme un point très important : les forêts et maquis des massifs ultramafiques de Nouvelle-Calédonie présentent une forte biodiversité fongique ECM et confirme le fait que la Nouvelle-Calédonie est, de ce point de vue là également (biodiversité fongique), un important lieu de biodiversité.

D'autre part, nous avons pu montrer, et pour la première fois, le rôle important de ces symbioses dans l'adaptation des plantes au substrat ultramafique (Jourand et al., 2014a) : non seulement la symbiose ECM améliore la croissance de la plante, mais en

plus elle permet de faciliter la nutrition de plante en éléments déficients mais indispensables (P, K et Ca), alors qu'elle limite la toxicité des éléments en concentrations élevés dans le sol tels que les métaux (Fe, Mg, Ni, Cr, Co, Mn).

2) Diversité et fonctions des champignons AMF des sols ultramafiques :

Les travaux réalisés avant et pendant le projet Ecomine BioTop ont permis de montrer, comme pour les ECM, l'importance de la biodiversité des AMF dans les sols miniers néocalédoniens et son importante originalité.

Nous avons ensuite comparé la diversité de topsoils stockés sur le terrain avec le même type de sol dans le milieu naturel. Les résultats montrent que la diversité n'a pas diminué sensiblement, mais que certains genres semblent moins représentés après stockage ; ces résultats restent toutefois à compléter. D'autres travaux en cours (Bordez 2015), indiquent une baisse de la diversité des champignons AMF dans les topsoils stockés, baisse plus forte en profondeur.

L'expérimentation au champ sur des plants inoculés avec des AMF en pépinière, à Goro, révèle que les plants de l'espèce végétale *Carpolepis laurifolia* comportent dans leurs racines, après 18 mois sur terrain, une diversité similaire à celle observée en milieu naturel, ce qui montre la capacité de vieux topsoils, restés sans végétation, à se revitaliser lorsqu'ils sont remis dans de bonnes conditions.

Une étude détaillée du lien entre concentration en phosphore dans le sol et mycohization AMF confirme une hypothèse que nous avions avancée précédemment : la forte carence en P des sols miniers néocalédoniens empêche une bonne mycorhization des plantes. Cependant, comme nous l'avons vu pour *Costularia comosa*, de faibles taux de mycorhization peuvent parfois suffire à induire une bonne amélioration de la croissance et une bonne adaptation des jeunes plants au syndrome serpentinique (ratio Ca./Mg faible et teneur élevée en métaux). Quoiqu'il en soit, un apport modéré de P (fertilisation minérale ou organique lors de la revégétalisation), permet d'améliorer l'impact positif des AMF, même si ces doses, au-delà d'un seuil variant selon les espèces, tendent à perturber les fonctions générales des AMF.

Enfin, les essais d'enrobage de graines avec des spores AMF en vue d'une utilisation en hydroseeding (ou en dryseeding) se sont révélés prometteurs (enrobage réussi, mycorhization fonctionnelle dans ces conditions), même si quelques travaux de finalisation sont encore nécessaires. Un essai (hors projet Ecomine Biotop) a d'ailleurs été réalisé sur terrain dans une mine orpheline. Les résultats seront connus dans 2 ans environ.

3) Expérimentation de mycorhization (ECM et AMF) de deux espèces végétales sur topsoil, au champ, dans les conditions habituelles de revégétalisation, avec ou sans amendement organique (boues de STEP).

Cette expérimentation sur le terrain, la première du genre au monde, à notre connaissance en milieu ultramafique, a mobilisé une dizaine de personne de 2011 à fin 2013. Les résultats obtenus sont importants et prometteurs sur le plan pratique. Une partie a fait notamment l'objet d'une communication au colloque SERA (Nouméa 17-20 novembre 2014) et fera prochainement l'objet d'une publication de rang A. On montre notamment que : i) les AMF ont des effets très importants sur la croissance, la nutrition minérale et l'adaptation de *Capolepis laurifiolia* au champ ; pourtant les parcelles témoins contiennent également des spores mycorhiziennes et les plants y sont mycorhizés, bien qu'en moindre intensité. Ceci suggère qu'une bonne mycorhization des plants en pépinière est un gage de développement rapide et adapté des plants, notamment sur des topsoils non frais, ou sur stériles ; ii) les boues de STEP ont

également un effet important sur la croissance et la nutrition des plantes, ce qui confirme des travaux déjà réalisés ailleurs ; iii) la combinaison « inoculation en AMF + Boues de STEP » donne des résultats spectaculaires (biomasse plus de 7 fois supérieure à celle du témoin), avec une amélioration de nombreux paramètres de croissance, de nutrition et d'adaptation ; iiii) malheureusement, en ce qui concerne la deuxième espèce testée (*Tristaniopsis glauca*), des inondations ayant touché les parcelles ont faussé les résultats qui sont peu interprétables.

Les travaux menés dans le cadre du projet Ecomine Biotop sur les fonctions des champignons mycorhiziens et l'identification de marqueurs moléculaires de l'adaptation à la contrainte édaphique ultramafique, seront repris et poursuivis dans le projet CNRT Bioindic « Identification d'indicateurs biologiques du fonctionnement des écosystèmes miniers restaurés », sous la coordination de l'IAC. Certains travaux sur les variations de la diversité des champignons AMF et de leurs fonctions selon les conditions de revégétalisation seront également complétés dans le cadre de ce projet.

4.4. RÉFÉRENCES CITÉES

Adegbidi, H. G. and Briggs, R. D., 2003. Nitrogen mineralization of sewage sludge and composted poultry manure applied to willow in a greenhouse experiment. *Biomass and Bioenergy*, 25(6), 665–673.

Amir H., Pineau R., 2003. Relationships between extractable Ni, Co and other metals and microbiological characteristics of different ultramafic soils from New Caledonia. *Australian Journal of Soil Research*, **41**: 1-14.

Amir H., Hassaine N, Lagrange A., 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi, from New Caledonian ultramafic soils, improve tolerance to nickel of endemic plant species. *Mycorrhiza*, 23 : 585-595.

Angle, J. S. and Heckman, J. R., 1986. Effect of soil pH and sewage sludge on VA mycorrhizal infection of soybeans. *Plant and Soil*, 93, 437–441.

Arriagada, C., Sampedro, I., Garcia-Romera, I., and Ocampo, J., 2009. Improvement of growth of Eucalyptus globulus and soil biological parameters by amendment with sewage sludge and inoculation with arbuscular mycorrhizal and saprobe fungi. *Science of the Total Environment*, 407(17), 4799–4806.

Berry, C. R. and Marx, D. H., 1977. Growth of Loblolly Pine Seedlings in Strip-Mined Kaolin Spoil as Influenced by Sewage Sludge. *J Environ Qual*, 6(4), 379–381.

Bordez Laurent. Etude sur les potentiels biologiques des topsoils et leur gestion en vue de leur utilisation pour la restauration écologique des milieux dégradés. Application au massif du Koniambo. Thèse Université de la Nouvelle-Calédonie. Soutenance septembre 2015.

Brofas, G., Michopoulos, P., and Alifragis, D., 2000. Sewage Sludge as an Amendment for Calcareous Bauxite Mine Spoils Reclamation. *J Environ Qual*, 29(3), 811–816.

Branco S., 2010a. Serpentine soils promote ectomycorrhizal fungal diversity. *Mol Ecol* 19:5566-76.

Branco S, Ree RH., 2010b. Serpentine Soils Do Not Limit Mycorrhizal Fungal Diversity. *PLoS ONE* 5, e11757.

Chae, Y. M. and Tabatabai, M. A., 1986. Mineralization of Nitrogen in Soils Amended with

Organic Wastes. *J Environ Qual*, 15, 193–198.

Gensous S., 2014. Les champignons mycorhiziens à arbuscules des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie : Diversité, rôle dans l'adaptation des plantes à la contrainte ultramafique et interactions avec des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes. Thèse doctorat, Université de la Nouvelle-Calédonie.

Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH & Young J, 1998. Ploughing up the wood-wide web? *Nature* 394: 431

Jourand P., Hannibal L., Majorel C., Mengant S., Ducousso M., Lebrun M., 2014. Ectomycorrhizal *Pisolithus albus* inoculation of *Acacia spirorbis* and *Eucalyptus globulus* grown in ultramafic topsoil enhances plant growth and mineral nutrition while limits metal uptake*. Journal of Plant Physiology* 171:164-172.

Koerselman, W. and Meuleman, A. F. M., 1996. The vegetation N/P ratio: a new tool to detect the nature of nutrient limitation. *Journal of Applied Ecology*, 1441–1450.

Krüger M, Krüger C, Walker C, Stockinger H & Schüssler A., 2012. Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytol.* **193:** 970–84

Lagrange A., Amir H.**,** L'Huillier L., 2013. Mycorrhizal status of Cyperaceae from New Caledonian ultramafic soils: effects of phosphorus availability on arbuscular mycorrhizal colonisation of *Costularia comosa* in field conditions, *Mycorrhiza*, 23:655-661.

Lagrange A., Ducousso M., Jourand P., Majorel C., Amir H., 2011. New insights into the mycorrhizal status of Cyperaceae from ultramafic soils in New Caledonia. *Canadian Journal of Microbiology*, 57:21-28.

Lee J, Lee S & Young JPW (2008) Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* **65:** 339–49

Moser AM, Petersen CA, D'Allura JA, Southworth D., 2005. Comparison of ectomycorrhizas of *Quercus garryana* (*Fagaceae*) on serpentine and non serpentine soils in southwestern Oregon. *Am J Bot*, 92: 224-30.

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GA, Kent J, 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853-858.

Opik M, Vanatoa a, Vanatoa E, Moora M, Davison J, Kalwij JM, Reier U & Zobel M, 2010. The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytol.* **188:** 223–41.

Parker, C. F. and Sommers, L. E., 1983. Mineralization of Nitrogen in Sewage Sludges. *J Environ Qual,* 12, 150–156.

Rai M & Ajit ., 2011. Diversity and biotechnology of ectomycorrhizae. Soil biology series (vol25), Springer, Heidelberg, Germany. 459p.

Sabey, B. R., Pendleton, R. L., and Webb, B. L., 1990. Effect of Municipal Sewage Sludge Application on Growth of Two Reclamation Shrub Species in Copper Mine Spoils. *J Environ Qual*, 19, 580–586.

Sainz, M. J., Taboada-Castro, M. T., and Vilarino, A., 1998. Growth, mineral nutrition and mycorrhizal colonization of red clover and cucumber plants grown in a soil amended with

composted urban wastes. *Plant and Soil*, 205(1), 85–92

Simon L, Lalonde M & Bruns TD, 1992. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **58:** 291–295

Tang, Z. C. and Kozlowski, T. T., 1982. Physiological, morphological, and growth responses ofPlatanus occidentalis seedlings to flooding. *Plant and Soil*, 66(2), 243–255

Thorne, M. E., Zamora, B. A., and Kennedy, A. C., 1998. Sewage Sludge and Mycorrhizal Effects on Secar Bluebunch Wheatgrass in Mine Spoil. *J Environ Qual*, 27, 1228–1233.

Topper, K. F. and Sabey, B. R. (1986) Sewage Sludge as a Coal Mine Spoil Amendment for Revegetation in Colorado. *J Environ Qual*, 15, 44–49.

Velayoudon P, Pagand P, Winterton P, Guiresse M, 2014. Sewage sludge application for spontaneous plant restoration of New Caledonian ferralsol. *Soil research*: 52, 76-86.

Voos, G. and Sabey, B. R., 1987. Nitrogen Mineralization in Sewage-sludge-Amended Coal Mine Spoil and Topsoils. *J Environ Qual*, 16, 231–237.

Urban A, Puschenreiter M, Strauss J, Gorfer M. Diversity and structure of ectomycorrhizal and co-associated fungal communities in a serpentine soil. *Mycorrhiza* 18: 339-54.

4.5. PUBLICATIONS, COMMUNICATIONS ET MÉMOIRES DE L'ÉQUIPE, LIÉES AU VOLET 2 :

4.5.1. PUBLICATIONS RÉALISÉES DANS LE CADRE DU PROJET OU DIRECTEMENT LIÉES AU SUJET ABORDÉ DANS CE PROJET:

Amir H, Jourand P, Cavaloc Y, Ducousso M, 2014. Role of mycorrhizal fungi on the alleviation of heavy metal toxicity on plant. *In:* Mycorrhizal fungi: Use in sustainable agriculture and forestry. Z. Solaiman; L. Abbott and A. Varma Eds, Soil Biology Series, Springer Ed. (chapitre d'ouvrage), sous presse.

Amir H., Hassaine N, Lagrange A., 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi, from New Caledonian ultramafic soils, improve tolerance to nickel of endemic plant species. *Mycorrhiza*, 23 : 585-595.

Bordez L, Jourand P, Ducousso M, Cavaloc Y, Amir H. Structure and diversity of bacterial and fungal communities of ultramafic topsoils on Koniambo massif, determined by 454 sequencing. Soumis à *Molecular Ecology*.

Gensous S., Amir H., Veron V., Cavaloc Y. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with some plant species in New Caledonian serpentine and non-serpentine ecosystems. Soumis à *FEMS Microbial Ecol* (octobre 2014, re soumis après corrections en mai 2015).

Gonin M., Gensous S., Lagrange A., Ducousso M., Amir H., Jourand P. 2013. Rhizosphere bacteria of *Costularia* spp. from ultramafic soils in New Caledonia: diversity, tolerance to extreme edaphic conditions, and role in plant growth and mineral nutrition. *Canadian Journal of Microbiology*, sous presse, DOI: 10.1139/cjm-2012-0570

Jourand P., Hannibal L., Majorel C., Mengant S., Ducousso M., Lebrun M. 2014a.

Ectomycorrhizal *Pisolithus albus* inoculation of *Acacia spirorbis* and *Eucalyptus globulus* grown in ultramafic topsoil *enhances plant growth and mineral nutrition while limits metal uptake. Journal* of Plant Physiology 171:164-172.

Jourand P., Carriconde F., Ducousso M., Majorel C., Hannibal L., Prin Y. and Lebrun M. 2014b. Diversity and adaptation of ectomycorrhizal symbioses to ultramafic soils in New Caledonia. pp 101-125. In : Amadou M. Bâ, Krista L. McGuire, Abdala G. Diédhiou (eds) Ectomycorrhizal Symbioses in Tropical and Neotropical Forests. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 300p

Jourand P., Carriconde F., Ducousso M., Majorel C., Hannibal L., Prin Y. and Lebrun M. Diversity and Adaptation of Ectomycorrhizal Symbioses to Ultramafic Soils in New Caledonia. In: Ectomycorrhizal Symbioses in Tropical and Neotropical Forests. Ba A. Ed. Science Publishers (An Imprint of Edenbridge Ltd, British Channel Islands) Enfield, New Hampshire 03748, USA (http://www.scipub.net).

Lagrange A., Amir H., L'Huillier L., 2013. Mycorrhizal status of Cyperaceae from New Caledonian ultramafic soils: effects of phosphorus availability on arbuscular mycorrhizal colonisation of *Costularia comosa* in field conditions, *Mycorrhiza* , 23:655-661.

Lagrange A., Ducousso M., Jourand P., Majorel C., Amir H., 2011 New insights into the mycorrhizal status of Cyperaceae from ultramafic soils in New Caledonia. *Canadian Journal of Microbiology*, 57:21-28 (je suis auteur pour correspondance).

Majorel C., Hannibal L., Soupe M.E., Carriconde F., Ducousso M., Lebrun M. & Jourand P. 2012. Tracking nickel adaptive biomarkers in *Pisolithus albus* from New Caledonia using a transcriptomic approach. *Molecular Ecology*

Prin Y., Ducousso M., Tassin J., Béna G., Jourand P., Dumontet V., Moulin L., Contesto C., Ambrosi J.P., Chaintreuil C., Dreyfus B., Lebrun M.. Ectotrophic mycorrhizal symbioses are dominant in natural ultramafic forest ecosystems of New Caledonia. New York : Nova Science, 2012, p. 25-48. (Environmental Science, Engineering and Technology). ISBN 978-1-62081-278-5.

Waseem M., Galiana A., Prin Y., Domergue O., Jourand P., Ducousso M. 2014. Ectomycorrhizal fungal diversity associated with endemic *Tristaniopsis* spp. (Myrtaceae) in ultramafic and volcano-sedimentary soils in New Caledonia. À re-soumettre à *Mycorrhiza* après révision au format short note.

4.5.2. COMMUNICATIONS

Amir H, Laurent A, Cavaloc Y, Pagand P, Gunkel P, Lemestre M, Médevielle V. Improving growth and adaptation of Carpolepis laurifolia, an endemic plant species used on ecological restoration of mined areas in New Caledonia. Field experiment on the combined effects of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and organic amendment. Second International Conference of the Society for Ecological Restoration Australasia, Noumea, New Caledonia; 17-21 november 2014.

Amir H., Gensous S. Combined effects of arbuscular mycorrhizal colonization and phosphorous concentration level on growth and adaptation to ultramafic soil of three endemic plant species. 8th International Conference on Serpentine Ecology, Sabah, Malaisie, 9-13 June 2014.

Amir H., Leclerc N., Saintpierre D. Coating seeds with arbuscular mycorrhizal fungi spores for use in ecological restoration of mined areas by hydroseeding. 5Th World Conference on

Ecological Restoration, Madidon, USA; October 2013 - Cavaloc Y., Gensous S., Amir H. Diversity of AMF in different soils of New Caledonia. Conference of Australian Mycological Society, Adelaïde 10-12 July 2013.

Amir H., Fogliani B. and L'Huillier L., 2012. The "CNRT BioTop" project: the biological potential of New Caledonian ultramafic topsoils and its management for ecological restoration of degraded mining areas. Inaugural conference of the Society for Ecological Restoration Australasia (SERA), Perth, Western Australia, 27-30 November 2012.

Amir H., Lagrange A., L'Huillier L. Mycorrhizal status of *Costularia comosa* (Cyperaceae) from New Caledonian ultramafic maquis; influence of soil phosphorus content on the mycorrhizal colonization. 7th International Conference on Serpentine Ecology, 12-16 juin 2011, Coimbra, Portugal.

Bordez L, Jourand P, Ducousso M, Carriconde F, Cavaloc Y, L'Huillier L, Fogliani B, Santini S, Mozar M, Leveau A, Amir H. Selective topsoil management of mined lands for vegetation communities restoration. Second International Conference of the Society for Ecological Restoration Australasia, Noumea, New Caledonia; 17-21 november 2014.

Bordez L,. Jourand P., Ducousso M., Carriconde F., Cavaloc Y., Santini S., Mozar M., Leveau A., Amir **H**. Selective topsoil management of mined lands for vegetation communities restoration. 8th International Conference on Serpentine Ecology, Sabah, Malaisie, 9-13 June 2014.

Ducousso M., Jourand P., Majorel C., Hannibal L., Prin Y., Lebrun M. Ectomycorrhizal diversity within New Caledonian ultramafic ecosystems and role of *Pisolithus albus* in host plant adaptation toward Nickel toxicity. International workshop: «Mycorrhizae : a biological tool for sustainable development in Africa ». Dakar, Senegal, february 21-23, 2011.

Gensous S., Hascoet E., Pierrart A., Amir H. Effects of mycorrhiza on adaptation and growth of endemic plant *Alphitonia neocaledonica* and their variations in relation to increasing P concentrations. International Conference of the Society for Ecological restoration Australasia, Perth 28-30 novembre 2012.

Jourand P., Ducousso M., Reid R., Majorel C., Hannibal H., Prin Y., Lebrun M. 2011. Diversité des Pisolithus albus de Nouvelle-Calédonie et rôle dans l'adaptation de la plante hôte à la toxicité au nickel. 1er congrès international sur les symbioses mycorhiziennes dans les écosystèmes et environnements des Etats insulaires de l'Ocean Indien « MYCOROI » : 21-23 Novembre 2011, Antananarive, Madagascar. Communication orale et poster.

Lagrange A, Guillamaud A, Blanchard B, Amir H, Fogliani B, L'Huillier L. Methodology for assessing the success of after-mining restoration schemes in New Caledonia. Second International Conference of the Society for Ecological Restoration Australasia, Noumea, New Caledonia; 17-21 november 2014; Poster.

Lagrange A., Amir H., Delrieu M.H, L'Huillier L. *Costularia comosa* (Cyperaceae) responses to phosphate and nitrogen fertilization: effects on plant growth and development on New Caledonia's lateritic soils. 8th International Conference on Serpentine Ecology, Sabah, Malaisie, 9-13 June 2014.

- Majorel C., Hannibal L., Soupe M-E., Carriconde F., Ducousso M., Lebrun M. and Jourand P. Etude transcriptomique de la réponse adaptative au nickel entre isolats sensibles et tolérants de l'écotype ultramafique de Pisolithus albus. Journées Francophones des Mycorhizes, 5-7 septembre 2012, INRA, Nancy, France. Poster.

4.5.3. THÈSE DE DOCTORAT (PARTIE):

Simon Gensous, 2014. Les champignons mycorhiziens à arbuscules des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie. Diversité, rôle dans l'adaptation des plantes à la contrainte ultramafique et interaction avec des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes. Thèse doctorat, Univ. Nouvelle-Calédonie. Directeur H. Amir. Le principal chapitre de la thèse concerne le projet BioTop.

4.5.4. MÉMOIRES DE MASTER 1 ET 2 DANS LE CADRE DU PROJET:

Alexandre Bourles, 2014. Influence des champignons mycorhiziens à arbuscules et des bactéries PGPR sur la croissance et l'adaptation de plants de *Carpolepis laurifolia* sur sols ultramafiques. Master 1, Univ. Montpellier II. Encadrement H. Amir et S. Gensous.

Alrick Talatini, 2014. Enrobage de graines endémiques à la Nouvelle-Calédonie par des spores de champignons mycorhiziens à arbuscules dans l'optique d'une revégétalisation par hydroseeeding. Master 1, Univ. Montpellier II. Encadrement H. Amir et D. Saintpierre (SIRAS-Pacifique).

Olivia Le Pioufle. 2013. Impact de la fertilisation phosphatée sur les variations qualitatives et quantitatives de mycorhization chez l'espèce pionnière *Carpolepis laurifolia var. laurifolia*. Mémoire Master 2, Univ. Strasbourg. Encadrement H. Amir et S. Gensous.

Emilie Hascoet, 2012. Relations entre nutrition phosphatée, mycorhization et tolérance au nickel pour *Alphitonia neocaledonica*, espèce végétale endémique des sols ultramafiques. Master 2, Univ.de Perpignan Via Domitia. Encadrement H. Amir et S. Gensous.

Nathanaelle Leclerc, 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. Master 2, CFR Angers, Agro-campus Ouest.. Encadrement H. Amir en partenariat avec SIRAS-Pacifique.

Antoine Pierart, 2012. Interactions entre mycorhization, nutrition en phosphore et adaptation de la plante à la toxicité du nickel sur substrat ultramafique. Vers une optimisation de la Mycorhization d'*Alphitonia neocaledonica*. Master 2, CFR Angers, Agro-campus Ouest. Encadrement H. Amir et S. Gensous.

Hélène Barraille, 2011. Caractérisation et expression des déterminants moléculaires chez *P. albus* impliqués dans la tolérance au nickel. Master 1, Université Montpellier II. Encadrement P. Jourand.

Christophe Zilliox. 2011: Rôle des champignons mycorhiziens à arbuscules dans l'adaptation des espèces végétales aux milieux ultramafiques en Nouvelle-Calédonie. Enrobage de graines et effets du phosphore sur la mycorhization *chez Alphitonia neocaledonica.* Mémoire de Master 2, Agro-Paris Tech. (ENGREF). Encadrement H. Amir, en partenariat avec SIRAS-Pacifique (C. Grymonprez).

5. VOLET 3 « DYNAMIQUE DES MÉTAUX ET DE LA MATIÈRE ORGANIQUE IN SITU»

Intervenants :

UNC-PPME: Peggy Gunkel-Grillon ; Monika Lemestre technicienne ; Christophe Martins-Bernard (master 1), Antoine Deffay (M1, Université de Paris-sud) : tâche 2 : 1ère partie « Suivi de la dynamique et de la spéciation des éléments métalliques au cours du stockage du topsoil ».

INRA/CNRS : Guillaume ECHEVARRIA, Liane-Clarisse MOUCHON, Marie-Laure BONIS – LSE UMR UL INRA 1120 ; Emmanuelle MONTARGES-PELLETIER – LIEC UMR UL CNRS

Audrey Laurent : Contractuelle IAC/UNC

5.1. OBJECTIFS, ORGANISATION ET DESCRIPTION DES TRAVAUX

Ce volet traîte des variations de quelques caractéristiques physico-chimiques dans les topsoils stockés ou non, notamment des aspects liés à la spéciation des métaux dans ces topsoils et à la caractérisation de leur matière organique.

Les analyses de métaux liés à l'essai de mycorhization sur le terrain à Goro et l'étude sur l'effet des boues de STEP en combinaison avec les mycorhizes, sur le même terrain, sont traitées directement dans le volet 2, afin de garder la cohérence générale de cette expérimentation.

C'est pourquoi ce volet commence par la tâche 2 (la tâche 1 étant transférée) ; nous avons préféré ne pas changer ce numéro de tâche afin de garder les mêmes appélations que dans le texte du projet.

5.1.1. TÂCHE 2-1 : DISTRIBUTION DES ÉLÉMENTS MÉTALLIQUES ; VARIATION DU POTENTIEL REDOX, DU PH ET DE LA CONDUCTIVITÉ ÉLECTRIQUE AU COURS DU STOCKAGE DU TOPSOIL.

5.1.1.1. Rappel des objectifs

Les sols décapés sont stockés en plein air et donc soumis aux aléas climatiques. La chimie du sol est alors susceptible d'évoluer au cours du stockage. De plus les variations des activités biologiques sont souvent corrélées à des variations physico-chimiques du sol. Les activités biologiques peuvent elles aussi induire des variations des propriétés physico-chimiques (Huang et *al*., 2002). Les modifications des propriétés physico-chimiques du sol ont des effets sur la mobilité des éléments métalliques (Gäbler, 1997 ; Quantin et *al.*, 2002 ;Weng, et *al*., 2004 ; Hellerich et Nikolaidisa, 2005 ; Acosta et *al*., 2011 ; Rocha et *al*., 2011 ; Zhao et *al*., 2013 ; Zeng et *al*., 2011). Si la mobilité des éléments métalliques est accrue au cours du stockage, la qualité du topsoil peut s'en retrouver alors diminuée car les éléments métalliques mobiles peuvent être assimilés par les plantes et être préjudiciables pour le processus de revégétalisation. Pour

suivre l'évolution de la dynamique des éléments métalliques des topsoils stockés, les analyses suivantes ont été réalisées :

- suivi des paramètres physico-chimiques du sol : pH, conductivité électrique et potentiel d'oxydoréduction
- suivi des concentrations pseudo-totales en éléments métalliques au cours du stockage afin de vérifier que les concentrations restent constantes. Elles pourraient en effet diminuer avec le temps suite à un lessivage intense des sols ou être significativement modifiées si les particules de sol subissent un tri granulométrique et que les fractions granulométriques ont des concentrations différentes.
- suivi de la distribution des éléments métalliques dans les fractions du sol par extractions séquentielles. Le suivi des concentrations totales est essentiel mais ne donne pas de renseignement sur la mobilité ou la biodisponibilité des éléments métalliques. Les extractions séquentielles mettent en évidence les fractions chimiques du sol susceptibles de libérer les éléments métalliques et sont couramment utilisées pour déterminer l'étude de la biodisponibilité des métaux (Xiao-Quan et al., 1993 ; Qian et al, 1996, Kabata-Pendias, 2004 ; Bacon et Davison, 2008). Les métaux sont extraits successivement par action de solution d'extraction de nature différente sur un même échantillon de sol. Les fractions ainsi obtenues ne sont pas définies minéralogiquement, mais par le mode opératoire utilisé (choix de l'extractant et conditions d'extractions). Ces fractions ont cependant pour objectif de se rapprocher le plus possible des grandes classes des constituants du sol.
- suivi des concentrations en Ni, Co et Cr(VI) solubles dans l'eau car l'eau est le réactif des conditions naturelles de lessivage du sol. De plus, l'eau que renferme le sol constitue l'un des compartiments dans lequel les racines puisent les éléments nutritifs nécessaires au développement de la plante (Mench et *al.*, 1992). L'eau est alors un réactif utilisé pour l'évaluation des risques écotoxicologiques des éléments métalliques des sols (Shtiza et *al*., 2005 ; Kabata-Pendias, 2004 ; Rocha et *al.*, 2011). L'étude de l'évolution de la concentration en métaux solubles dans l'eau au cours du stockage est alors réalisée afin d'évaluer si ces sols naturellement riches en éléments métalliques libèrent très facilement (uniquement par action de l'eau) des quantités croissantes de métaux. La fraction de métaux libérée sous l'action de l'eau est toujours très faible et requièrt de déployer des méthodes analytiques très sensibles. C'est la raison pour laquelle trois métaux sont ciblés, le nickel, le cobalt et le chrome hexavalent.

5.1.1.2. Matériel et méthodes

- Echantillonnage du sol : pour le stockage en andain, les prélèvements sont réalisés à 4 profondeurs : en surface (0 cm), à -50 cm, à -100 cm et à -150 cm tandis que pour le sol stocké étalé, les prélèvements sont réalisés à -50cm. Pour chaque pas de temps, 5 prises d'échantillons sont réalisées. Le sol est séché à l'air libre et tamisé à 2 mm. Les 5 prises d'échantillons sont regroupées pour former un unique échantillon t=x mois, x' cm.
- Analyse du pH, de la conductivité électrique et du potentiel d'oxydoréduction grâce à un multimètre CONSORT C932, une sonde de pH CRISON et une sonde redox Bioblock Scientific selon les normes ISO 11265 et ISO10390
- **Minéralisation acide à l'eau régale** pour déterminer les concentrations pseudo-totales en Fe, Mn, Cr, Co, Ni et Mg : 0,5g de sol sont placés dans bécher en téflon ouvert en présence de 1,25mL d'HNO_3 (69%) et 3,75mL d'HCl (37%) à température ambiante pendant 12h puis le bécher téflon est fermé hermétiquement et le mélange est chauffé 10 minutes à 160°C puis 2h à 100°C. Après dissolution, l'échantillon est repris dans 50 mL d'eau ultrapure et filtré à 0,45µm. Les dosages de en Fe, Mn, Cr, Co, Ni, Mg sont réalisés par spectroscopie atomique flamme AA800 PerkinElmer.

- **Extraction séquentielle** selon le protocole recommandé par le BCR (Community Bureau of Reference) qui isole 1/ les métaux localisés dans l'eau du sol, liés aux carbonates et échangeables, 2/ les métaux liés aux oxydes-hydroxydes de manganèse et de fer, 3/ les métaux liés à la matière organique et précipité sous forme de sulfures et 4/ les métaux résiduels (Pueyo et *al.,2008)*. 1 g de sol est extrait en présence de 40mL d'acide acétique (0.11M) pendant 16h (étape 1). Après centrifugation, le surnageant est récupéré et le culot est rincé à l'eau ultrapure puis extrait en présence de 40mL de chlorure d'hydroxylamine (0,1M, pH=2) pendant 16h (étape 2). Le surnageant est récupéré et le culot est rincé puis extrait en présence de 10mL de H_2O_2 (8,8M) à 85°C pendant 1h puis ajout de 10mL d'H_2O_2 en chauffage à 85°C pendant 1h additionnelle puis ajout de 50mL d'acétate d'ammonium (1M, pH=2). Le mélange est agité pendant 16h à 22°C. Le surnageant est récupéré et le culot est rincé puis minéralisé à l'eau régale (étape 4) : 7mL de HCl (37%) + 2,3mL de HNO_3 (69%) pendant 16h puis fermeture des flacons et chauffage à 130°C pendant 2 heures. Le surnageant est complété à 50 mL avec de l'eau distillée. Les dosages de Fe, Mn, Cr, Co, Ni, Mg sont réalisés dans les lixiviats des étapes 1 à 4 par spectroscopie atomique flamme ou four AA800 PerkinElmer.
- **Lixiviation à l'eau et analyse polarographique du nickel, cobalt et chrome hexavalent** : 10g de sol sont lixiviés dans 100 mL d'eau déionisée pendant 1 heure, agitation mécanique avec barreau aimanté puis repos 1 heure avant centrifugation à 3000g puis les concentrations en Ni, Co et Cr(VI) sont du fait de leurs faibles valeurs mesurées par polarographie (Computrace VA797 Metrohm) dans le surnageant. L'analyse de Ni et Co est réalisée en présence de Diméthylglioxime (Metrohm VA Application Note N° V-69) et l'analyse de Cr(VI) est réalisée en présence de DTPA (Metrohm VA Application Note N° V-116, SANDER *et al*, 2003). L'acquisition des courbes intensité-potentiel est réalisée selon les paramètres suivants (Tab. 15) :

Tableau 15 : Paramètres d'acquisition des courbes intensité-potentiel pour le dosage du nickel, du cobalt et du chrome hexavalent dans les lixiviats eau du sol.

Paramètres	Ni et Co	Cr(VI)
Deposition potential (V)	-0,6998	-0,9
Deposition time (s)	15	10
Equilibration time (s)	10	10
Start potential (V)	-0,7999	-0,9998
End potential (V)	-1,3	-1,45
Pulse amplitude (V)	0,05005	0,05005
Pulse time (s)	0,04	0,04
Voltage step (V)	0,009918	0,009918
Voltage step time (s)	0,3	0,3
Sweep rate (V/s)	0,0331	0,0331

5.1.2. TÂCHE 2-2 : FONCTIONNEMENT GÉOCHIMIQUE DES TOPSOILS

5.1.2.1. Rappel des objectifs initiaux

Les objectifs généraux de cette partie sont d'analyser la dynamique de la spéciation du nickel et du chrome dans différents topsoils et d'en tirer des conclusions concernant leur biodisponibilité et leur toxicité potentielle vis-à-vis des plants utilisés en revégétalisation et/ou en termes de

ruissellement (pollution de l'environnement proche des mines). Il s'agit aussi d'étudier l'évolution de la matière organique de ces sols et ses conséquences sur la fertilité des sols et d'analyser les liens entre la matière organique et les métaux. Le topsoil de Goro sert de référence, sachant que pour la partie géochimique, les résultats seront extrapolables d'un site à l'autre du fait de la forte généricité des processus et mécanismes en jeu. La référence pédologique et géochimique est un Ferralsol Gérique observé et échantillonné sur colluvions dans les environs de Goro en dehors de la zone d'emprise de la mine (Fig. 100). Par sa pauvreté en matière organique, il sert de référence minérale pour décrire le comportement seul de la phase minérale du sol.

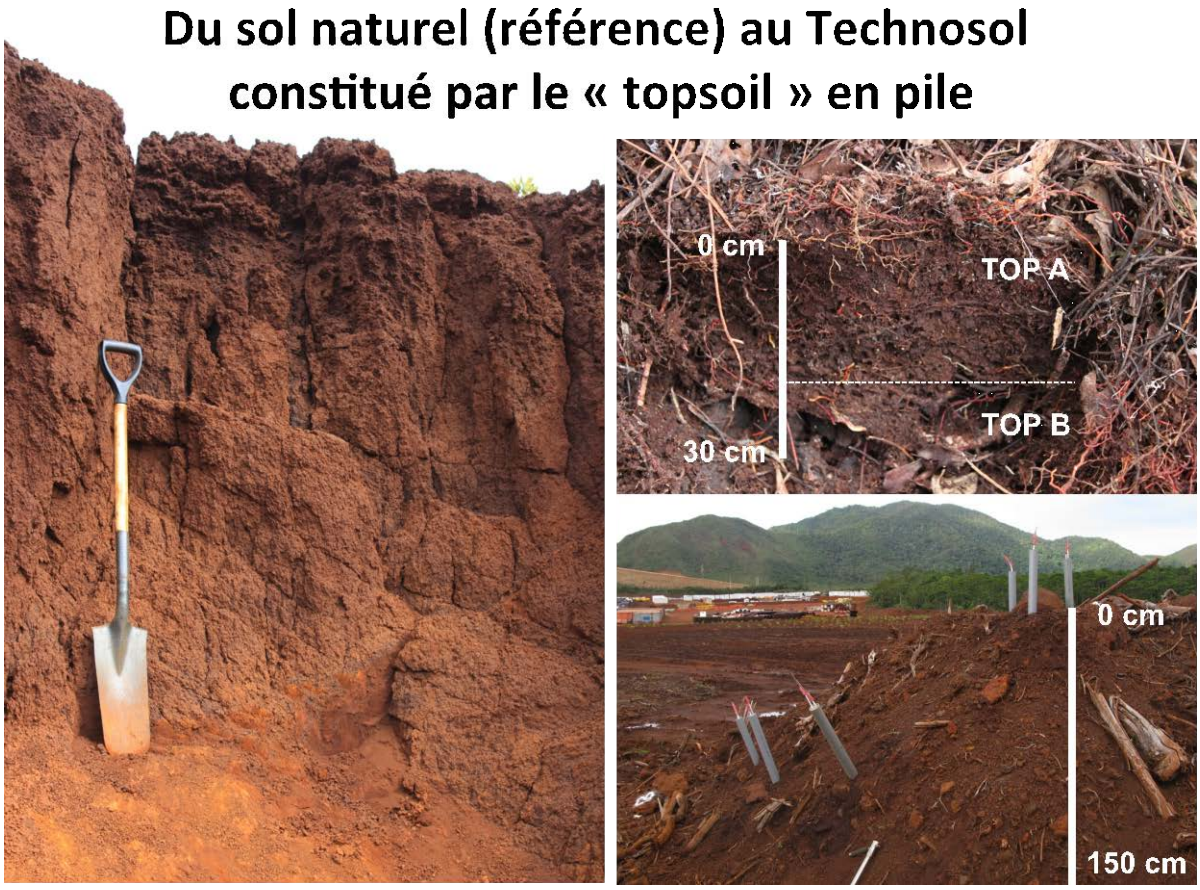


Figure 100 : Présentation des sols étudiés dans la tâche 2.

- **Sous-tâche 1** : Caractérisation de la géochimie des sols. Pour chaque type de sol, les phases minérales majeures et porteuses de métaux présents seront caractérisées finement ainsi que leur distribution spatiale et leur spéciation en utilisant des techniques minéralogiques globales (DRX, FTIR) et microscopiques (MEB/MET-EDXS). Une étude analytique et qualitative de la matière organique sera également réalisée par CPG-MS et par HPLC–GPC.
- **Sous-tâche 2** : Modélisation de la disponibilité des métaux au cours des différentes étapes du stockage du topsoil. Les échantillons ont été obtenus dans les mêmes conditions que les autres volets (fournis par l'équipe de l'UNC). Les échantillons du sol initial en place, et des piles de topsoil à différentes profondeurs et à différents temps ont été utilisés. Dans des systèmes modèles contrôlés en batch, la distribution chimique des métaux et des nutriments a été estimée au moyen de la mise en solution par des solutions de nature et de réactivité différentes permettant de faire jouer les mécanismes suivants :

  – Echange d'ions : solution de NaNO3 1M

– Complexation de surface : Solution de citrate 0,1 M ; solution d'EDTA 0,1 M

5.1.2.2. Installation des bougies poreuses pour suivre la composition des solutions de sol in-situ au cours du stockage du topsoil

Des bougies poreuses réalisées par l'équipe technique du LSE (Diamètre : 8cm, longueur 80 cm, tête en céramique) ont été apportées en Nouvelle-Calédonie lors de la mission 2011 de Guillaume ECHEVARRIA (LSE-FR EST-OTELo). Elles ont été installées le 10 août 2011 par Laurent L'HUILLIER (IAC) et Guillaume ECHEVARRIA sur le tas de topsoil de la mine de GORO à deux hauteurs différentes dans le but de recueillir des solutions de sol naturel pour pouvoir comparer leur évolution avec les extractions en batch sur terre séchée effectuées en laboratoire (Fig. 101). L'IAC s'est chargé de mettre en place les prélèvements de solution de sol et d'assurer les premières caractérisations pour pouvoir disposer des paramètres nécessaires à la modélisation de la concentration en Cr et en Ni. Malheureusement, malgré une force de succion suffisante, les prélèvements ont rarement permis d'obtenir des solutions en raison du drainage très rapide des eaux dans les piles de topsoils (la structure du sol, très chargée en éléments grossiers, n'a pas permis d'installer d'autres dispositifs, tel un lysimètre).



Figure 101 : Pose des bougies poreuses sur la pile expérimentale de TOPSOIL le 10 août 2011

5.1.2.3. Matériels et méthodes pour les expérimentations de laboratoire

5.1.2.3.1. Caractérisation des matériaux et de leur réactivité

Plusieurs sols en place et matériaux déplacés en cours d'évolution ont été échantillonnés dans ce volet. Pour les sols naturels, un sol brun hyperamagnésien (Cambisol hypermagnésique chromique, selon la BRM 2014), un sol ferralitique ferritique colluvial (Fig. 100) ainsi qu'un sol ferralitique ferritique érodé de pente (Ferralsols Geriques) ont également été prélevés dans la province Sud sur les communes de Yaté et Prony. L'horizon B latéritique du premier constitue une référence de matériau uniquement composé d'oxydes métalliques sans argiles résiduelles et sans matière organique. Il représente le matériau minéral de référence en géochimie qui se comporte sans effet de la matière organique ou du recyclage biogéochimique des éléments. Il ne possède pas de CEC et donc pas d'éléments échangeables contrairement au Leptosol superficiel prélevé sur le site de Goro (Fig. 100). Le « topsoil » en place (en fait un ferralsol plinthique ou Leptosol développé sur cuirasse latéritique) a été échantillonné en deux horizons. Le premier est un horizon A1 (0 à 20 cm), très riche en matière organique et en grenaille de cuirasse (pisolithes) et le second un horizon A1/C, où la quantité de matière organique diminue fortement vers la cuirasse seule. Par la suite ces horizons sont notés Topsoil A ou TOP A et

Topsoil B ou TOP B respectivement. Ce Leptosol une fois décapé est TOP T 0 mois puis une fois mis en pile devient TOP T+12 mois, TOP T+24 mois,… Dans ce cas, il porte la mention de la profondeur de prélèvement (e.g. 50 cm). Les intitulés et les dénominations des échantillons sont consignés dans le tableau 16 :

Tableau 16 : Détail et dénomination des différents échantillons de terre étudiés dans le volet provenant du site de Goro pour les leptosols (ferralsols plinthiques) et sols en place et des autres sites pour les sols de référence naturels.

Sol	***Horizon ou profondeur***	***Temps***	***Dénomination***
Leptosol sur cuirasse	A_1 (0-20 cm)	-	**TOP A – Topsoil A**
(Concession de Goro)	A_1/C (20-30 cm)	-	**TOP B – Topsoil B**
Topsoil décapé	-	0 mois	**TOP T0 – Topsoil T0 MOY**
Topsoil en pile	0 cm	12 mois	**TOP T+12 – 0 cm MOY**
"	0 cm	24 mois	**TOP T+24 – 0 cm MOY**
"	50 cm	24 mois	**TOP T+24 – 50 cm MOY**
"	100 cm	24 mois	**TOP T+24 – 100 cm MOY**
"	150 cm	24 mois	**TOP T+24 – 150 cm MOY**
Ferralsol Gérique (colluvial)	A_1 (0-10 cm)	-	**SFFC 1**
(Plaine des lacs)	B (120 cm)	-	**SFFC 2**
"	B/C (350 cm)	-	**SFFC 3**
Ferralsol Gérique (de pente)	A_1 (3-15 cm)	-	**SFFP 1**
(Col de Prony)	B (60-70 cm)	-	**SFFP 2**
"	B/C (320 cm)	-	**SFFP 3**
Cambisol Hypermagnésique	A_1 (0-15 cm)	-	**SBH 1**
(Montée vers la mine Vulcain)	B (15-40 cm)	-	**SBH 2**
"	C (50-80 cm)	-	**SBH 3**

Capacité d'échange cationique et spectrométrie ICP-AES

La Capacité d'Echange Cationique (CEC), mesurée en cmol.kg^{-1} de sol, mesure sa capacité à retenir et à échanger des ions retenus par la phase solide par des interactions électrostatiques de manière non spécifique, avec la solution. Nous avons utilisé la méthode par une solution de chlorure de cobaltihexamine ($[Co(NH_3)_6]Cl_3$). Des doublons ont été réalisés pour chacun des 17 échantillons.

Les cations présents en solution sont par ailleurs analysés par spectrométrie d'émission atomique à source plasma ou ICP-AES (Inductive Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy).

Analyses élémentaires totales par ICP-MS

Environ 5g de chaque échantillon ont été envoyés au Service d'Analyse des Roches et Minéraux (SARM) du Centre de Recherche Pétrographiques et Géochimiques (CRPG) à Vandœuvre-lès-Nancy afin de faire l'objet d'une analyse chimique globale.

Minéralogie des sols et identification des phases majeures

Une analyse globale par diffraction des rayons X et une analyse plus locale au microscope électronique à transmission de grains sélectionnés au sein de plusieurs échantillons ont été réalisées afin de connaître les principales phases minérales présentes dans les sols ainsi que

celles associées au nickel et autres ETM.

Diffraction des rayons X (DRX)

L'analyse par DRX a permis, dans le cadre de cette étude, d'avoir des données essentiellement qualitatives concernant les principales phases cristallisées contenues dans les sols.

Les échantillons de sol ont été broyés et tamisés à 150 µm, puis ont été tassés afin d'avoir une analyse la plus représentative possible du sol, c'est-à-dire avec des grains présentant des plans dans toutes les orientations : on parle d' « analyse de poudre désorientée ». Ils ont été analysés par DRX au Laboratoire Environnement et Minéralurgie (LEM, Vandœuvre-lès-Nancy).

Microscopie Electronique à Transmission (MET-EDX)

L'observation de grains choisis par MET a permis de distinguer les différentes phases, minérales et organiques (observables mais non caractérisables) en présence de façon plus fine, et de déterminer une certaine distribution des ETM dans ces phases, en particulier le nickel, le chrome, le manganèse et le cobalt. Les observations ont été réalisées au Service Commun de Microscopies Electroniques et Microanalyses (SCMEM, Université Henri Poincaré, Vandœuvre-lès-Nancy.

Géochimie organique

A la différence des échantillons rocheux, les sols contiennent souvent une grande quantité de matière organique, fraîche ou déjà en cours de dégradation (minéralisation), liée à la biosphère locale. Les associations de celle-ci avec les ETM étant assez mal connues, il était important de chercher à caractériser celle présente dans les sols de Goro, par des analyses courantes en pédologie telles que les teneurs en carbone et azote, ou des techniques moins courantes comme des fractionnements visant à séparer par exemple des fractions plus riches en phases organiques et d'autres plus riches en minéraux. Des analyses sont ensuite réalisées sur les fractions.

Analyses CNS

L'appareil de mesures élémentaires CHNS du Laboratoire Sols et Environnement (LSE, Vandœuvre-lès-Nancy) donne accès aux teneurs du sol en carbone, azote et soufre. Les échantillons ne provenant pas d'un environnement dans lequel le soufre a une importance notable, seuls les deux premiers éléments ont été considérés dans cette étude. Ils fournissent en effet des données importantes quant à l'état de dégradation de la matière organique dans le sol, ce qui sera en particulier utile pour suivre l'évolution chronologique des sols en tas.

Séparation densimétrique par liqueur dense

Une grande partie des techniques analytiques chimiques sont adaptées à des échantillons entièrement minéraux ou organiques, et il est souvent difficile de caractériser avec précision la matière organique, quand elle n'est pas totalement transformée en charbon ou en hydrocarbures. C'est pourquoi un fractionnement peut être intéressant pour tâcher d'isoler autant que possible la matière organique des sols afin de l'analyser.

Dans cette optique, une séparation par densité a été réalisée à l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA-Nancy, Champenoux).

5.1.2.3.2. Géochimie des solutions

Outre la caractérisation, l'autre objectif du projet et de cette étude concerne directement la disponibilité du nickel et d'autres ETM comme le chrome et le cobalt dans les sols de Goro : il s'agit de connaître ces derniers avec précision afin de parvenir à modéliser la complexation avec les autres constituants et leur éventuel transport vertical ou horizontal au sein du sol. Ceci permettra alors à terme de pouvoir prévoir leur dynamique lorsque les sols seront déposés au-dessus des stériles miniers, et de prévenir les dangers potentiels par des dispositifs adaptés.

Pour cela, des expériences de mobilisation du nickel ont été effectuées pour quatre échantillons précis, soit deux du plateau minier (TOP A et TOP B), un échantillon dont la capacité d'échange cationique a été considérée comme une moyenne de celles des sols en tas (TOP T03) et un « témoin » (SFFC2) choisi pour sa CEC quasi nulle.

Dans sa thèse, Sophie Raous (Raous, 2011) a travaillé sur des matériaux issus de latérites nickélifères brésiliennes, du massif de Niquelândia, essentiellement des « limonites » correspondant aux niveaux d'accumulation d'oxydes de fer, c'est-à-dire à l'horizon B de cette étude et des « garniérites » correspondant aux niveaux de saprolite, soit à l'horizon C. Elle a notamment réalisé des expériences d'adsorption de goethite afin de pouvoir réaliser une modélisation de la mobilisation du nickel en suspension à l'aide du logiciel de calcul géochimique PHREEQC, et à terme du transport réactif de nickel tel qu'il peut avoir lieu in situ. Elle a déterminé des constantes d'adsorption du nickel sur la goethite et la smectite, composants essentiels de chacun des matériaux considérés (limonite et garniérite) et les plus susceptibles de « fixer » des ETM ; elle a également réalisé des isothermes de désorption des métaux de la limonite et de la goethite, dans le temps et en faisant varier le pH afin d'étudier le comportement de ces métaux en suspension (nickel, mais également chrome, fer, magnésium, etc.). La limonite était assimilée à de la goethite pure, et la garniérite à de la smectite pure, afin d'utiliser les constantes de complexation qu'elle avait déterminées auparavant. Les nombreux résultats ont montré très peu de différence entre les comportements des matériaux latéritiques et la goethite pure, et justifié de ce fait son choix.

Dans le projet Ecomine BioTop, l'objectif des travaux réalisés au LSE et dans les laboratoires associés est également de pouvoir construire un modèle de la mobilisation du nickel, cette fois dans les sols de Goro, à des fins de prévision de son comportement *in situ*, en particulier lors de la réhabilitation de la mine. Les horizons du topsoil auxquels le projet s'intéresse sont essentiellement composés d'oxydes, en grande majorité de la goethite ; les résultats des analyses élémentaires totales et de DRX l'ont montré. Il a donc été possible de reprendre les résultats de Raous (2011), en raison de la grande similitude de ses matériaux avec ceux de Nouvelle-Calédonie : les latérites nickélifères de Goro sont en effet très proches à tous points de vue des latérites du Niquelândia, ce qu'ont montré les résultats des analyses effectuées. Les équilibres et constantes déterminées dans cette thèse pourront donc être réutilisées dans un contexte calédonien, dans le cadre d'expériences de désorption avec les matériaux locaux, c'est-à-dire les échantillons de sol de la mine ainsi que ceux des sols en tas ; fournissant des données pour parvenir, à l'aide d'un programme de type PHREEQC, à simuler la désorption, et in fine à modéliser la mobilisation puis le transport de nickel et d'autres ETM à Goro.

- **Expériences de désorption en présence de $NaNO_3$, de citrate et d'EDTA**

Trois expériences de désorption similaires ont donc été mises en place, avec trois réactifs différents : du nitrate de sodium, de manière à ce que la force ionique de la solution soit proche de la situation dans le sol, et deux complexants, du citrate de trisodium et de l'acide éthylène diamine tétraacétique. Afin de s'approcher le plus possible des conditions *in situ* et de ne pas augmenter artificiellement la surface d'échange, les sols n'ont pas été broyés ni tamisés, mais laissés dans l'état après échantillonnage et séchage : c'est-à-dire, tamisés à 5 mm pour TOP A

et TOP B et à 2 mm pour TOP T03 et SFFC2. Les analyses sont réalisées à l'ICP-AES.

5.2. TRAVAUX RÉALISÉS ET RÉSULTATS OBTENUS

5.2.1. TÂCHE 2-1 : DYNAMIQUE DES ÉLÉMENTS MÉTALLIQUES AU COURS DU STOCKAGE DU TOPSOIL

5.2.1.1. Evolution du pH, du potentiel d'oxydoréduction et de la conductivité

Pour le topsoil de Goro, le pH fluctue entre 4,3 et 5,3 pendant le stockage tandis qu'il fluctue de 5,4 à 6,4 pour le topsoil de Tontouta. La totalité des données est fournie en annexe du volet 3. Les deux topsoils sont acides, celui de Goro étant le plus acide des deux. Pour les deux topsoils l'amplitude de variation du pH est d'une unité, mais sans que ne puisse se dégager de tendance d'évolution ni avec le temps de stockage, ni avec le mode de stockage, ni avec la profondeur pour le stockage en andain.

Le potentiel d'oxydoréduction, E, fluctue de +74 à +207mV pour le topsoil de Goro et de +74 à +227 mV pour le topsoil de Tontouta. Les résultats sont variables sans que ne puisse se dégager de tendance avec le temps de stockage ou la profondeur. Il faut toutefois noter que les valeurs de potentiel de la parcelle BS6 (topsoil en place avant décapage) est plus élevée (Fig. 102). Après décapage, les topsoils ont des conditions redox légèrement inférieures mais qui restent suffisamment élevées et non compatibles avec la réduction des oxydes de fer ou de manganèse, phases porteuses majoritaire des des éléments métalliques (Kabata-pendias, 2004 ; Rocha et *al*., 2011)). Des potentiels hauts sont également notées pour le sol de Goro à t=3 mois et des potentiels bas pour Tontouta à t=18 mois et t=24 mois.

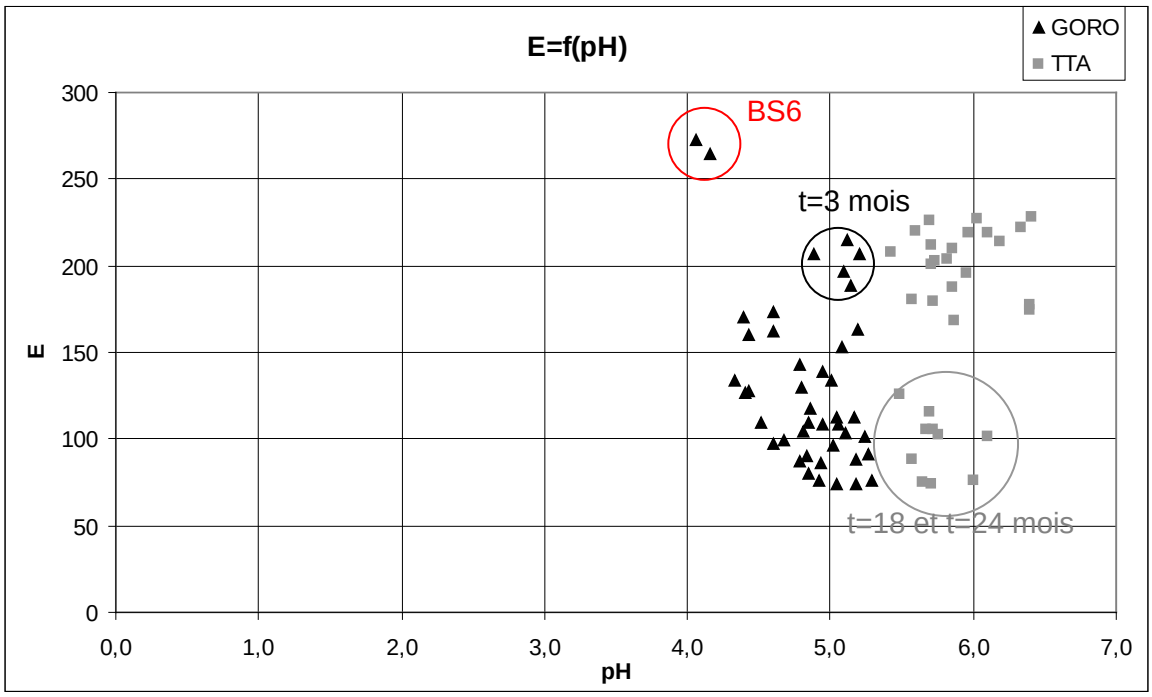


Figure 102 : valeurs du pH et du potentiel d'oxydoréduction E exprimé en mV mesurés pour les topsoils stockés de Goro (t=0 à t=36 mois, n=42) et de Tontouta (t=0 à t= 24 mois, n=32), toutes valeurs confondues quelques soit le mode de stockage.

La conductivité électrique, CE, des topsoils stockés sont faibles et varient de 54 à 237 µS/cm pour le topsoil de Goro et de 46 à 178 µS/cm pour le topsoil de Tontouta et est dans les 2 cas inférieure à 150µS/cm pour la majorité des points (Fig. 103). Il faut observer une conductivité électrique élevée pour les sols avant décapage (BS6) et quelques autres valeurs élevées pour Goro (t=12_100cm, t=18_100cm et t=30_150cm) et Tontouta (t=3_50*cm et t=6_50*cm). Mais il n'y a pas de tendance d'évolution avec le temps de stockage ce qui montre que la quantité de sels solubles dans le sol n'évolue pas de manière importante avec le temps de stockage.

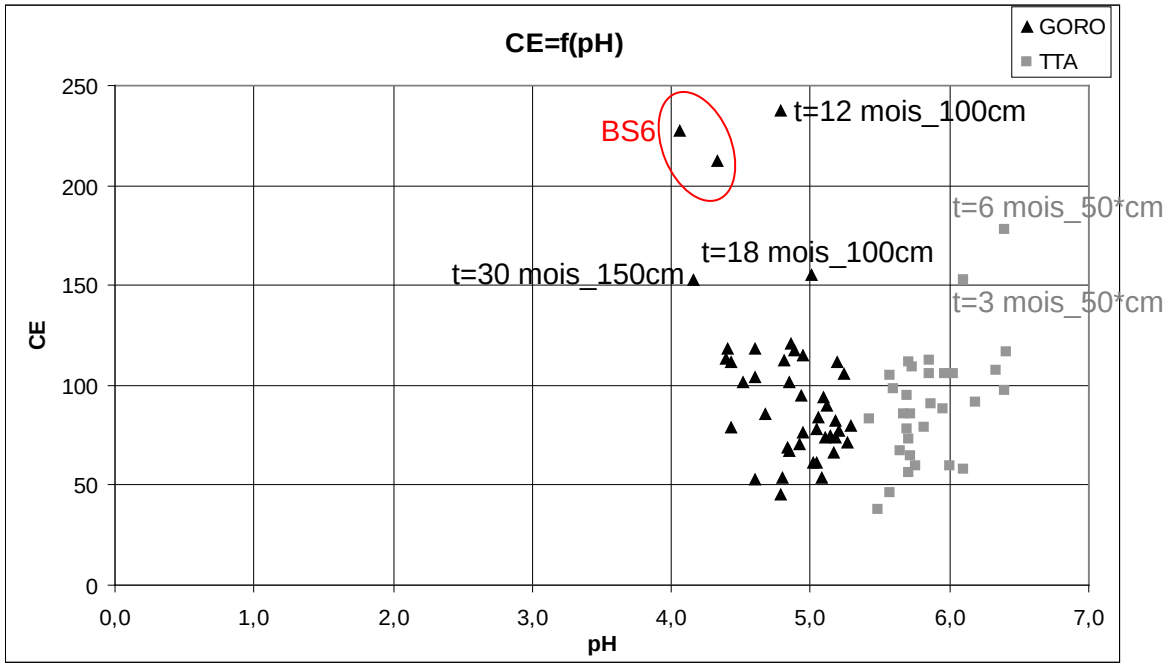


Figure 103 : valeurs du pH et de conductivité électrique, CE (en µS/cm) mesurés pour les topsoils stockés de Goro (t=0 à t=36 mois, n=42) et de Tontouta (t=0 à t= 24 mois, n=32), toutes valeurs confondues quelques soit le mode de stockage.* indique que le sol est stocké étalé.

5.2.1.2. Concentrations pseudo-totales en éléments métalliques

Les analyses ont été réalisées tous les 3 mois, jusqu'à t=18 mois pour Goro et jusqu'à t=12 mois pour Tontouta. Pour les 2 topsoils, les concentrations pesudo-totales en éléments métalliques des sols stockés en andain sont comparables à celles des sols stockés étalés sans qu'aucune variabilité significative de concentration ne soit observée ni avec le temps ou ni avec la profondeur. Le tableau 17 regroupe l'ensemble des concentrations mesurées. A l'échelle de temps considérée nous ne constatons donc pas de diminution des concentrations liée au lessivage des sols stockés quelque soit le type de stockage. Ce résultat indique également qu'il n'y a pas de modification significative des concentrations en éléments métalliques relatives potentiellement à un tri granulométrique des particules de sol stocké en andain. Ces analyses n'ont pas été poursuivies pour des temps de stockage supérieurs.

Tableau 17 : gammes de concentrations pseudo-totales en éléments métalliques mesurées pour les sols stockés étalés et en andain de Goro (t=0 à t=18 mois ; n=26) et Tontouta (t=0 à t=12 mois ; n=21).

Métal	GORO (mg/g)	Tontouta (mg/g)
Fe	247±18	291±30
Mn	0.6±0.1	2.7±0.4
Cr	10.1±0.6	8.9±1.1
Ni	0.9±0.1	3.7±0.5
Co	0.09±0.01	0.32±0.03
Mg	0.3±0.1	1.9±0.2

5.2.1.3. Evolution de la distribution des éléments métalliques dans les fractions du sol

Les extractions séquentielles ont été réalisées pour GORO, à t=0, t=6 et t=12 mois (Fig 104) et pour Tontouta, à t=0 et t=6 mois (Fig 105).

Le fer est extrait pour les 2 topsoils à plus de 99% à l'eau régale, dernière étape du protocole (Fig. 104-A et Fig 105-A). Cet élément est donc très difficilement mis en solution et ce quelque soit le mode de stockage ou la profondeur.

Le chrome est pour les 2 topsoils extrait à plus de 95% à l'eau régale, dernière étape (Fig. 104-B et Fig 105-B). Cet élément est donc également difficilement mis en solution pour les topsoils et ce quelque soit le mode de stockage ou la profondeur. Sur le site de Goro, le chrome est ensuite principalement lié à la matière organique du sol car extrait lors de la 3ème étape (environ 3%) (Fig. 104-B). Sur le site de Tontouta, 1,5 à 2% du chrome est lié aux oxydes de fer et manganèse car extrait lors de la 2ème étape tandis que 1 à 2% du chrome est lié à la matière organique du sol (Fig. 105-B). Il est alors possible qu'un léger relargage de chrome puisse être envisagé si la matière organique des topsoils est minéralisée.

Le manganèse est également principalement extrait à l'eau régale, dernière étape : 80% à 95% pour le topsoil de GORO (Fig 104-C) et 68% à 75% pour le topsoil de Tontouta (Fig. 105-C). Sur le topsoil de Goro, Mn est ensuite extrait par ordre d'importance lors des étapes 2, 1 et 3. Le pourcentage lié à la matière organique (3ème étape) est peu variable par contre les pourcentages liés aux oxydes de fer et manganèse (étape 2) et échangeables (étape 1) varient de manière significative. Cet élément est donc en fonction des conditions partiellement mobilisable. Sur le site de Tontouta (Fig. 105-C), Mn est ensuite lié aux oxydes (étape 2) de manière quasi constante.

Le magnésium est extrait à 70%-90% à l'eau régale (étape 4) pour le topsoil de Tontouta (Fig. 105-D). Cet élément est donc difficilement mis en solution dans le topsoil de Tontouta. Pour le topsoil de Goro, la distribution de Mg dans les fractions du sol est très variable d'un échantillon de topsoil à l'autre (Fig. 104-D). Le pourcentage de Mg extrait lors de la 1ère étape varie de 20% à 70%, il est donc sous une forme très facilement mobilisable dans le topsoil de Goro, mais aucune tendance en fonction du temps ou de la profondeur ne peut être dégagée.

Le nickel est pour les 2 topsoils extrait à 96%-99% à l'eau régale (étape 4) (Fig. 104-E et Fig 105-E). Cet élément est donc très difficilement mis en solution et ce quelque soit le mode de stockage. Pour le site de Goro, on peut noter que le pourcentage de nickel extrait lors des 3 1ères étapes (donc mobilisable) semble diminuer sensiblement avec le temps (Fig. 104-E).

Le cobalt est extrait à 65%-95% à l'eau régale (étape 4) pour le topsoil de GORO (Fig. 104-F)

et 52%- 80% pour le topsoil de Tontouta (Fig. 105-F). Cet élément est donc majoritairement difficile à mettre en solution. Le cobalt est ensuite principalement lié aux oxydes hydroxydes (2ème étape), une fraction du cobalt est alors potentiellement mobililisable selon les conditions physico-chimiques du milieu.

En conclusion, il faut retenir que la quasi-totalité du fer, nickel et chrome des 2 topsoils étudiés ne sont pas mobiles puisque plus de 99% du fer, plus de 96 % du nickel et plus de 96% du chrome sont localisés dans la fraction résiduelle extractible à l'eau régale (un mélange d'acide concentré). Pour le manganèse et de cobalt leur proportion dans la fraction résiduelle baisse à 70%. La proportion de ces 2 éléments potentiellement mobilisable est donc d'environ 30%. La proportion de magnésium non mobilisable est de 70% pour le topsoil de Tontouta (plus de 70% dans la fraction résiduelle) tandis que les résultats du topsoil de Goro montrent que cet élément est très facilement mobilisable (20 à 70% du magnésium extrait lors de la 1ère étape). Pendant la 1ère anneé (topsoil de Tontouta) ou pendant les 18 premiers mois de stockage (topsoil de Goro), il n'a pas été observé, de migration massive d'éléments métalliques d'une fraction non mobilisable (étape 4) vers une fraction plus facilement mobilisable (étape 3 et 2) ou très facilement mobilisable (étape 1). Les topsoils même stockés en andain, ne révèlent pas de modification significative de la distribution des éléments métalliques dans les fractions du sol y compris en profondeur (-1m, ou -1m50). La mobilité des métaux naturellement présents dans ces topsoils ne semble donc pas affectée par le mode de stockage. Ces analyses de la distribution des métaux dans les fractions des topsoils par extraction séquentielle n'ont pas été reconduites pour les temps de stockages supérieurs dans la mesure où d'une part ces analyses sont lourdes à mettre en oeuvre et d'autre part les premiers résultats ont montré que la plupart des métaux sont non ou peu mobiles.

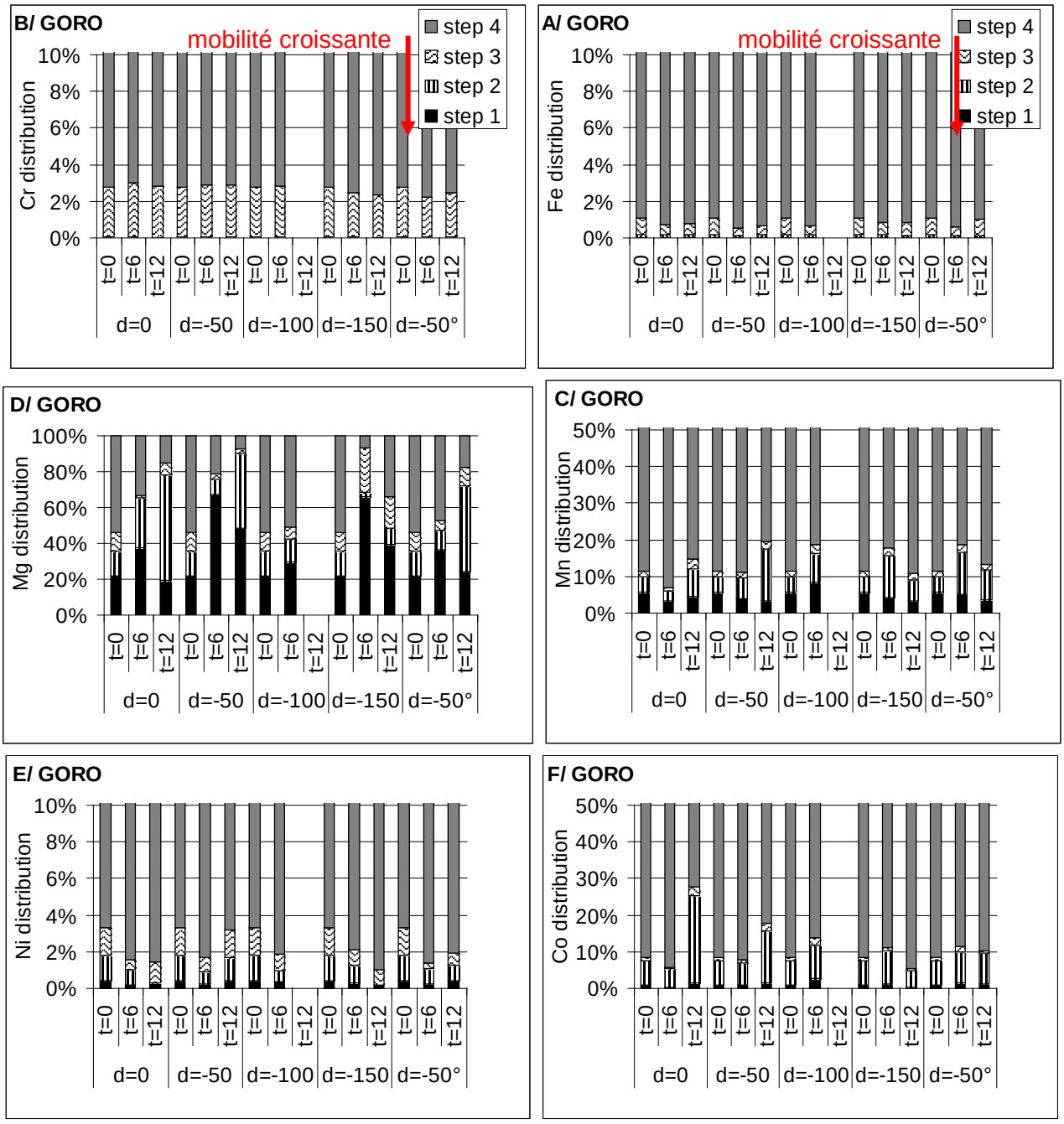


Figure 104 : Distribution des éléments métalliques dans les fractions du topsoil de Goro stocké en Andain et stocké étalé (d=-50°). Le protocole BCR isole 4 fractions les métaux : étape 1= métaux localisés dans l'eau du sol, liés aux carbonates et échangeables ; étape 2= liés aux oxydes-hydroxydes de manganèse et de fer ; étape 3=liés à la matière organique et étape 4= résiduels.

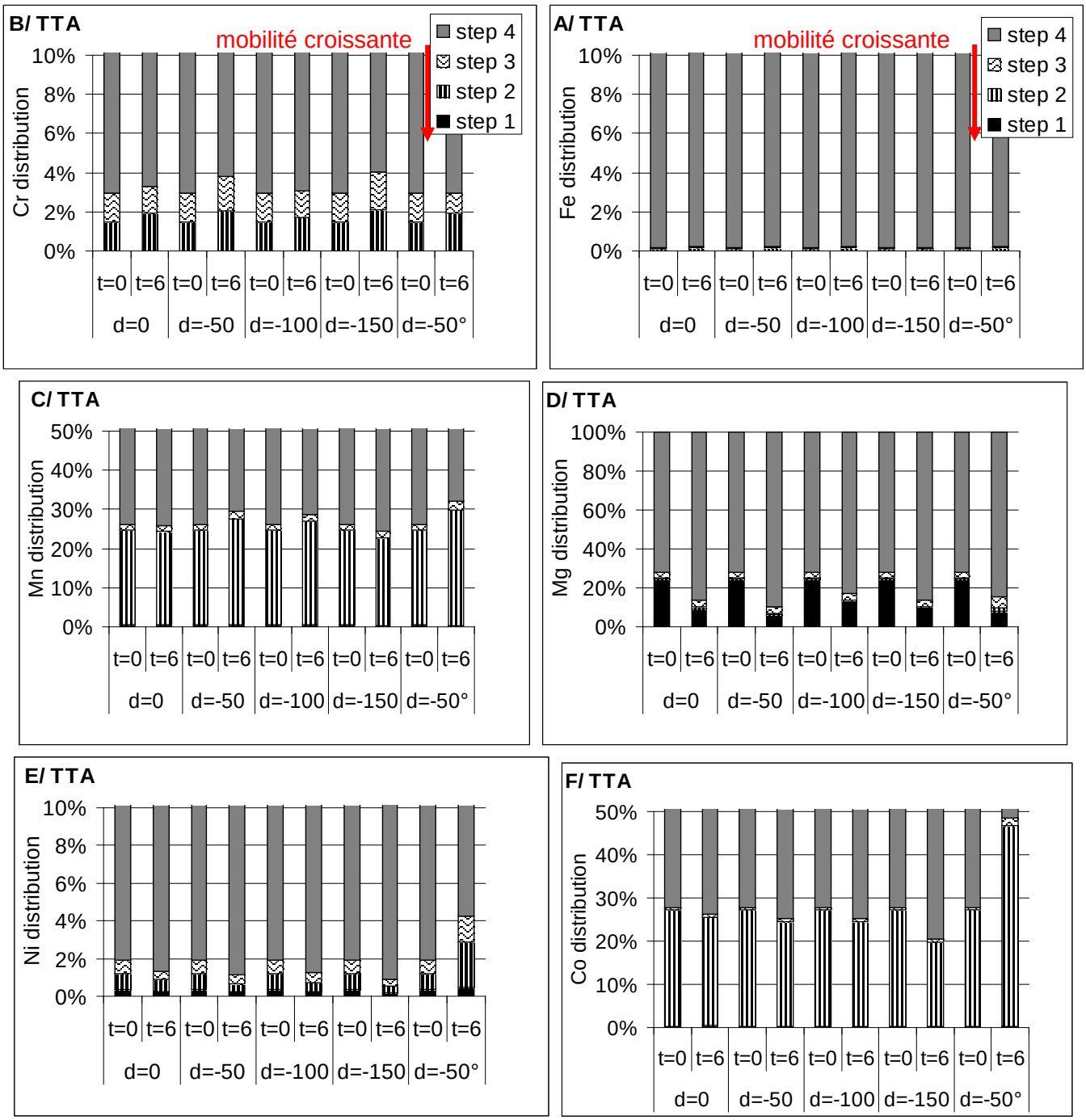


Figure 105 : Distribution des éléments métalliques dans les fractions du topsoil de Tontouta stocké en Andain et stocké étalé (d=-50°). Le protocole BCR isole4 fractions : étape 1=métaux, localisés dans l'eau du sol, liés aux carbonates et échangeables ; étape 2= liés aux oxydes-hydroxydes de manganèse et de fer ; étape 3= liés à la matière organique et étape 4= résiduels.

5.2.1.4. Evolution des concentrations en nickel, cobalt et chrome solubles dans l'eau

La totalité des concentrations en nickel, cobalt et chrome hexavalent soluble dans l'eau et mesurées par polarographie sont fournies en annexe du volet 3.

Le nickel : Pour le topsoil de **Goro,** les concentrations en nickel sont comprises entre 10 et 50ng/g sans que ne puisse être dégagé de tendance d'évolution ni avec le temps de stockage ni avec la profondeur. En excluant 5 valeurs inférieures à 10ng/g (t=3 mois_50*cm t=12 mois_0cm, t=12 mois_50cm, t=30mois_50cm et t=36mois_50*cm), la concentration moyenne est [Ni]=26,3 ng/g ± 3,5 (n=37, alpha=0,05), ce qui représente un très faible pourcentage (3×10^{-3}%) du nickel pseudo-total soluble dans l'eau. Pour le topsoil de **Tontouta**, les concentrations sont comprises entre 125 et 521ng/g (Fig 106) sans que ne puisse être dégagé de tendance. En excluant 3 points dont les concentrations sont particulièrement faibles (t=6 mois_50cm, t=6 mois_100cm et t=6 mois_100cm avec respectivement [Ni]=77 ; 62 et 98 ng/g) et 1 point dont la concentration est élevée (t=9 mois_100cm ([Ni]=944ng/g), la concentration moyenne est [Ni]=255 ng/g ± 40 (n=26, alpha=0,05) ce qui représente également un très faible pourcentage (7×10^{-3} %) du nickel pseudo-total soluble dans l'eau.

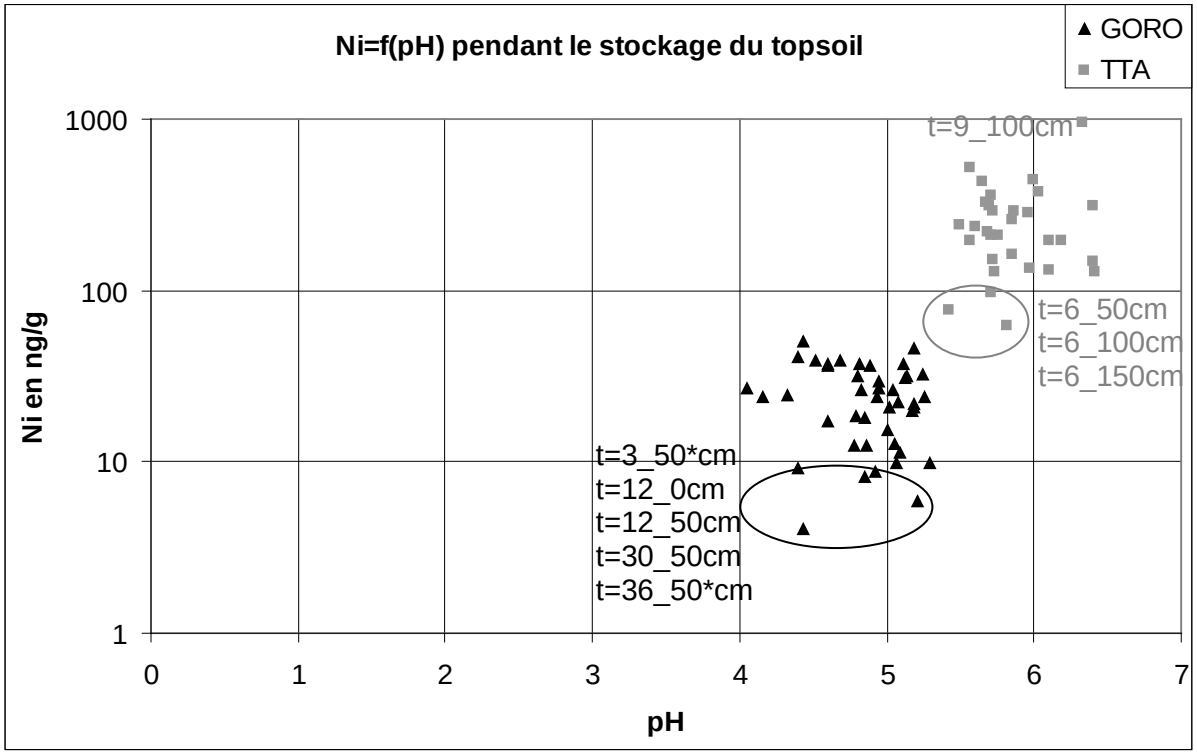


Figure 106 : valeurs du pH et de concentration en nickel extrait à l'eau exprimée ng/g pour les topsoils stockés de Goro (t=0 à t=36 mois, n=42) et de Tontouta (t=0 à t= 24 mois, n=32), toutes valeurs confondues quelques soit le mode de stockage.* indique que le sol est stocké étalé.

Le cobalt : pour le topsoil de **Goro,** les concentrations en cobalt sont non mesurables à t=0 mois et pour la plupart des analyses réalisées au cours du stockage (limite de détection de la méthode=0,01 ng/g). Quelques concentrations plus élevées sont toutefois à noter pour t=3 mois, t=9 mois_50cm, t=9 mois_100 cm et t=12mois_100cm (Fig. 107). Pour le topsoil de **Tontouta**, les concentrations sont comprises entre 0,2 et 55,6 ng/g. Les concentrations les plus élevées ([Co]≥ 2ng/g) sont mesurées pour t=3 mois (toutes les profondeurs), t=6 mois_0cm, t=6 mois_50*cm, t=9mois_50, t=9mois _100, t=9mois 150cm, t=12 mois_50*cm. Pendant la 1ère année de stockage du topsoil de Tontouta, il y a donc des quantités significatives de cobalt solubles à l'eau. Ces concentrations redeviennent faibles ou non détectées pour 18 et 24 mois. Mais les quantités sont trop faibles pour être systématiquement détectées, il est alors difficile de détecter une éventuelle tendance d'évolution des concentrations.

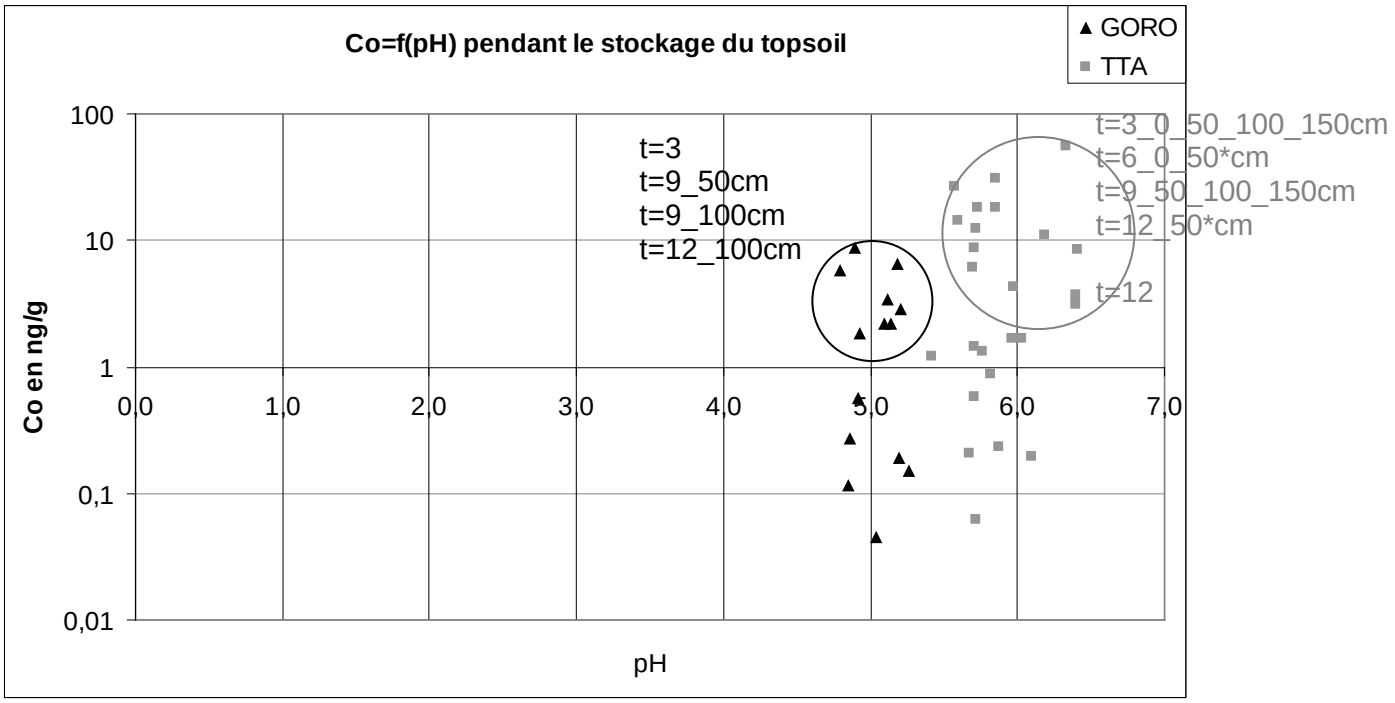


Figure 107 : valeurs du pH et de concentration en cobalt extrait à l'eau exprimée ng/g pour les topsoils stockés de Goro (t=0 à t=36 mois, n=42) et de Tontouta (t=0 à t= 24 mois, n=32), toutes valeurs confondues quelques soit le mode de stockage.* indique que le sol est stocké étalé.

Le chrome VI: pour le topsoil de **Goro**, les concentrations en chrome hexavalent augmentent après 12 mois de stockage (Fig. 108). Avant 12 mois, la concentration moyenne est [Cr(VI)]=17,5ng/g ± 6,0 (n=23 et alpha =0,05) ce qui représente une très faible proportion du chrome pseudo-total ($0,2\times10^{-3}$ %). Après 12 mois, la concentration moyenne est [Cr(VI)]= 76,1ng/g ± 34,0 (n=17, alpha=0,05) soit environ 4 fois mais la proportion par rapport au pseudo-total demeure très faible ($0,8\times10^{-3}$%). Pour le topsoil de **Tontouta**, les concentrations en chrome hexavalent fluctuent de 210 à 2156 ng/g (Fig 109), sans tendance d'évolution des concentrations avec le temps de stockage ou avec la profondeur. En exluant 3 échantillons dont les concentrations sont particulièrement élevées t=3mois _50 étalé, t=9 mois_50cm et t=18 mois_100cm avec respectivement [Cr(VI)]=1214 ; 1274 et 2156 ng/g (Fig. 109), la moyenne est [Cr(VI)]= 422 ng/g ± 46 (n=28 et alpha=0.05) ce qui représente une très faible proportion du chrome pesudo-total (5×10^{-3} %) du chrome pesudo-total soluble dans l'eau.

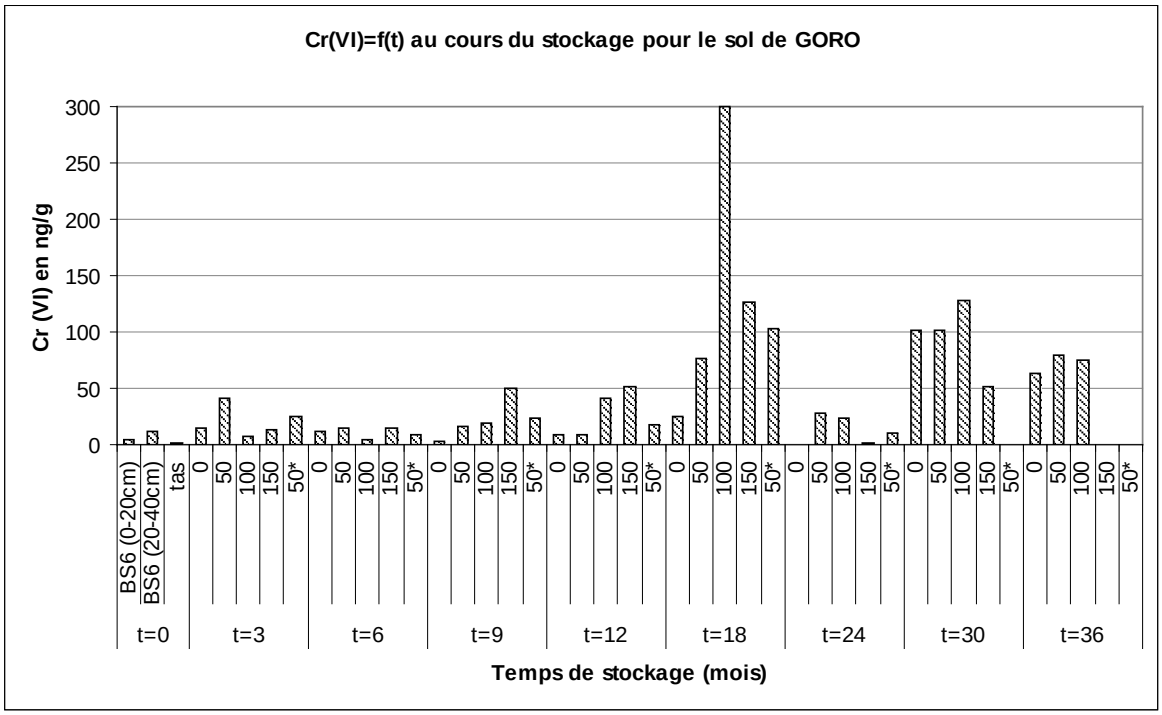


Figure 108 : concentration en chrome hexavalent extrait à l'eau dans le topsoil stocké de Goro. * indique le sol stocké étalé.

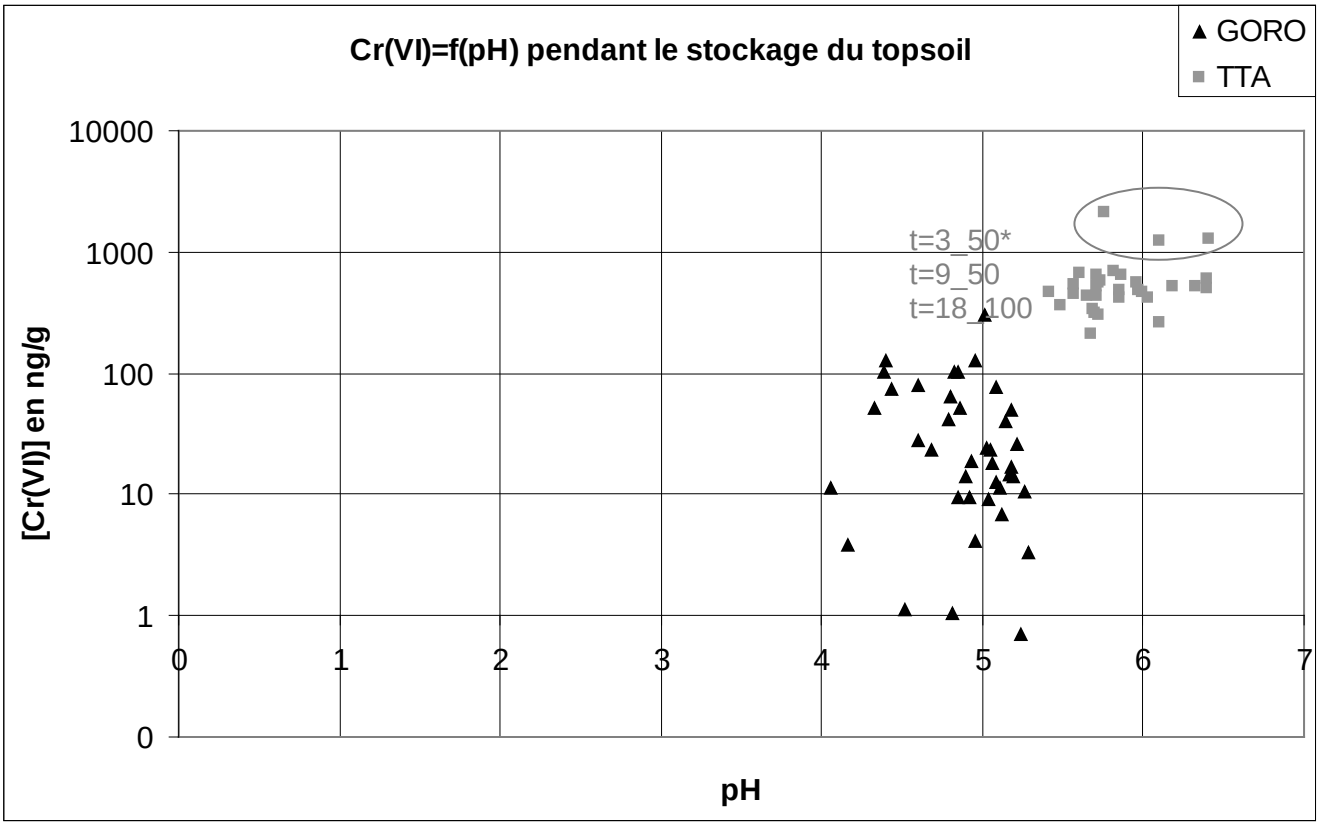


Figure 109 : valeurs du pH et de concentration en chrome hexavalent extrait à l'eau exprimée ng/g pour les topsoils stockés de Goro (t=0 à t=36 mois, n=42) et de Tontouta (t=0 à t= 24 mois, n=32), toutes valeurs confondues quelques soit le mode de stockage.* indique que le sol est stocké étalé.

5.2.1.5. Conclusion de la tâche 2.1

Après décapage et à l'échelle de temps considérée le suivi des paramètres physico-chimiques (pH, conductivité électrique et potentiel d'oxydoréduction) ne révèle pas de tendance d'évolution ni en fonction de la profondeur, ni en fonction du type de stockage ni en fonction du temps de stockage. Le topsoil de Tontouta est globalement plus riche en éléments métalliques que celui de Goro (sauf pour le Cr dont les concentrations sont similaires) mais pour les 2 topsoils, il n'y a pas d'évolution des concentrations pseudo-totales en fer, nickel, cobalt, chrome, manganèse et magnésium. L'étude de la distribution des éléments métalliques dans les fractions du sol a révélé que le fer, nickel et chrome sont très peu mobilisables. Le manganèse et le cobalt le sont un peu plus ainsi que le magnésium pour le topsoil de Tontouta. Par contre le magnésium est très mobile dans le topsoil de Goro. Il n'a pas été observé de migration massive d'éléments métalliques d'une fraction peu mobilisable vers une fraction plus facilement ou très facilement mobilisable, y compris en profondeur (-1m, ou -1m50). La mobilité du fer, nickel, chrome, manganèse et magnésium ne semble donc pas affectée par le mode de stockage.

Les analyses de concentrations en chrome, nickel et cobalt solubles dans l'eau montrent que les gammes de concentration sont très faibles pour les 2 topsoils puisque la proportion par rapport au pseudo-total est toujours inférieure à 7×10^{-3}%. Le déploiement de techniques analytiques très sensible confirme que les métaux des topsoils ne sont pas facilement solubles et ne le deviennent pas au cours du stockage. Ils ne sont donc pas mobiles. L'utilisation de la polarographie, technique analytique particulièrement sensible pour la détection du chrome hexavalent a cependant permis de montrer qu'après 12 mois de stockage du topsoil de Goro, les concentrations en chrome hexavalent soluble dans l'eau augmentent en moyenne d'un facteur 4, mais ces concentrations restent très faibles (76,1ng/g $\pm$ 34,0) et représentent environ 0.8×10^{-3}% du chrome pseudo-total.

Ces analyses ont donc permis de démontrer qu'après décapage du topsoil, les variations des propriétés physico-chimiques ne sont pas suffisantes pour engendrer une augmentation de la mobilité des éléments métalliques naturellement présents dans les topsoils si ce n'est une augmentation de la quantité de chrome hexavalent soluble dans l'eau pour le topsoil de Goro. Mais cette quantité reste très faible et ne devrait pas engendrer de problème de toxicité lors de l'utilisation des topsoils pour la revégétalisation.

5.2.2. TÂCHE 2-2 : FONCTIONNEMENT GÉOCHIMIQUE DES TOPSOILS

5.2.2.1. Sous-tâche 1 : Caractérisation de la géochimie et de la réactivité des sols et technosols

5.2.2.1.1. Analyses élémentaires des sols, des substrats naturels et du topsoil

Sans surprise, l'élément majeur dans tous les échantillons latéritiques est le fer : entre 48,5 et plus de 71% de Fe_2O_3, en dehors du TOP A qui en contient cependant 23% car très riche en matière organique (Tableau 18). En deuxième vient l'aluminium, entre 4,5 et 10% d'Al_2O_3 si l'on excepte encore TOP A ; l'aluminium se concentre essentiellement en haut de profil, avec une décroissance de l'horizon A à l'horizon C (sauf dans le cas du sol du plateau minier : TOP A et B). Ce sont des sols sur substrat ultramafique et ayant subi une altération latéritique poussée avec une lixiviation intense, de faibles teneurs en silice ne sont donc pas inattendues même si elles semblent réellement très faibles. La silice a été presque entièrement dissoute et éliminée du profil à l'exception des horizons C (saprolite). Les teneurs en MnO sont plutôt faibles

également, elles dépassent rarement le pourcent. Le magnésium est également très peu présent dans les horizons superficiels : aucune des teneurs en MgO n'atteint 1%. Ces sols sont d'ailleurs très pauvres en nutriments : peu de magnésium, mais également très peu de potassium, de phosphore et de calcium ; les teneurs en K_2O, P_2O_5 et CaO sont dans certains cas si faibles qu'elles ne peuvent être détectées, à l'exception de l'horizon Top A ainsi que de sol TOP T0 qui contient un mélange des horizons TOP A et TOP B. Ce sont donc des sols très peu favorables à la végétation, et le maquis minier est probablement la seule source de nutriments, qui permet au sol de continuer à supporter la croissance des plantes et le recyclage biogéochimique des nutriments en est la cause. Ces substrats sont donc en moyenne plus riches que les sols latéritiques où la cuirasse n'est plus présente.

Tableau 18 : Composition des horizons des sols en places en éléments majeurs (en %)

	SiO2	Al2O3	Fe2O3	MnO	MgO	CaO	Na2O	K2O	P2O5
Ferralsol (0-10 cm)	1,09	6,94	71,4	0,79	0,25	< L.D.	< L.D.	0,01	0,06
Ferralsol (120 cm)	1,36	6,58	70,9	0,58	0,38	< L.D.	< L.D.	0,02	0,05
Ferralsol (350 cm)	1,83	5,86	68,7	1,84	0,47	< L.D.	< L.D.	0,01	0,04
Topsoil A (0-20 cm)	0,43	2,06	23,0	0,05	0,51	0,20	0,02	0,04	0,05
Topsoil B (20-30 cm)	0,62	5,77	60,8	0,11	0,54	< L.D.	< L.D.	0,03	0,08
Topsoil T0 MOY	0,54	4,89	57,1	0,14	0,62	0,12	0,01	0,03	0,06

En ce qui concerne les éléments en traces, l'élément le plus remarquable est le chrome avec une moyenne de 2,9% et des pics à 4 voire 5% dans TOP B et les sols en pile (Tableau 19). C'est « l'élément en traces » le plus abondant, notamment dans les horizons superficiels ou pisolithiques.

Tableau 19 : Composition des horizons des sols en places en Co, Cr et Ni

	Co	Cr	Ni
		mg.kg-1	
Ferralsol (0-10 cm)	540	25413	4216
Ferralsol (120 cm)	672	22265	5551
Ferralsol (350 cm)	3184	22220	8038
Topsoil A (0-20 cm)	47,1	13410	452
Topsoil B (20-30 cm)	131	40790	1126
Topsoil T0 MOY	184	43504	1557

Les topsoils en piles, de TOP T01 à TOP T05 (TOP T03 possède la composition moyenne des 5 et sera par la suite utilisé pour représenter les 5 échantillons de Topsoil T0), sont relativement homogènes en composition. Sachant qu'ils ont été décapés sur le plateau où se trouvera la mine, ils contiennent donc une part correspondant au TOP A et au TOP B à des mélanges pratiquement à parts égales, riche notamment en matière organique. Un sol se distingue plus particulièrement de l'ensemble : il s'agit du « topsoil » in situ avant décapage sur lequel se concentre l'étude, et qui correspond à l'échantillon TOP A. En effet, il montre les teneurs les plus faibles pour quasiment tous les métaux, majeurs et en traces : 23% en Fe_2O_3, 2% en Al_2O_3, 0,05% en MnO, 452 ppm de Ni et à peine 47 ppm de Co. En revanche, sa perte au feu est de 71% ; cela est sans doute dû à la quantité importante de matière organique, peut-être la moitié de l'échantillon, évacuée sous forme de CO_2 et H_2O.

- Evolution de la composition totale des terres lors du stockage

Lors du stockage en pile, nous avons pu observer des variations dans les concentrations totales en certains éléments majeurs (Tableau 20). En particulier pour les éléments suivants dont les concentrations diminuent avec le stockage : Si, Mg, Na, K. Pour les deux derniers, il est très classique dans les premières étapes de la pédogenèse de voir un appauvrissement rapide tant que la végétation n'est pas installée et ne les recycle pas. En revanche, il est intéressant de noter que le Si peut être entrainé très rapidement dans les horizons superficiels des latérites nickélifères. Un élément se distingue des autres par son augmentation avec le temps. Il s'agit du Ca. Il a même tendance à augmenter plus en surface qu'en profondeur. Le recyclage biogéochimique ne peut pas être à l'origine de ce phénomène. Ceci montre donc que, malgré la durée du stockage, la teneur en Ca, élément nutritif essentiel pour les plantes n'est pas affectée. On peut supposer que la fertilité chimique des terres n'est pas affectée par le stockage. Il conviendrait de vérifier ces données par celles de Ca échangeable ou extractible.

En ce qui concerne les métaux secondaires, il convient de noter un enrichissement en Co ainsi qu'une diminution des concentrations en Cr (Tableau 21). Les concentrations en Ni ont tendance à diminuer également par rapport au T0.

Tableau 20 : Evolution de la composition du topsoil en éléments majeurs entre 0 et 24 mois (en %)

Topsoil A (0-20 cm)	0,43	2,06	23,0	0,05	0,51	0,20	0,02	0,04	0,05	70,7	97,2
Topsoil B (20-30 cm)	0,62	5,77	60,8	0,11	0,54	< L.D.	< L.D.	0,03	0,08	25,7	94,2
Topsoil T0 MOY	0,54	4,89	57,1	0,14	0,62	0,12	0,01	0,03	0,06	30,1	93,9
	SiO2	**Al2O3**	**Fe2O3**	**MnO**	**MgO**	**CaO**	**Na2O**	**K2O**	**P2O5**	**PF**	**Total**
TOP T+24 MOY - 0 m	0,43	4,75	59,3	0,13	0,52	0,22	< L.D.	< L.D.	0,06	29,0	94,8
TOP T+24 MOY - 50 cm	0,44	4,78	60,0	0,14	0,52	0,22	< L.D.	< L.D.	0,06	28,7	95,1
TOP T+24 MOY - 1 m	0,45	4,81	62,2	0,13	0,50	0,19	< L.D.	< L.D.	0,07	26,2	94,8
TOP T+24 MOY - 1.5 m	0,41	4,79	61,9	0,11	0,52	0,17	< L.D.	< L.D.	0,06	26,2	94,5

Tableau 21 : Evolution de la composition du topsoil en Co, Cr et Ni entre 0 et 24 mois

	Co	**Cr**	**Ni**
		mg.kg-1	
Topsoil A (0-20 cm)	47,1	13410	452
Topsoil B (20-30 cm)	131	40790	1126
Topsoil T0 MOY	184	43504	1557
TOP T+24 MOY - 0 m	270	35323	1247
TOP T+24 MOY - 50 cm	262	34850	1311
TOP T+24 MOY - 1 m	368	34130	1300
TOP T+24 MOY - 1.5 m	298	35010	1128

5.2.2.1.2. Capacité d'échange cationique des sols et évolution pendant le stockage

Le Tableau 22 donne les valeurs des mesures de CEC. Les valeurs sont la moyenne de deux mesures. Compte-tenu de la forte répétabilité des mesures (CV < 2%), il est raisonnable de

considérer que les mesures ont été très précises et fiables.

Les latérites ont souvent une CEC nulle ou quasi nulle du fait de l'absence de minéraux argileux ou de matière organique et de pH relativement acides qui confèrent aux oxydes de Fe ou d'Al des charges globales positives. Les sols ferrallitiques ferritiques (SFFC et SFFP) de la région de Goro ont donc une CEC très faible, comprise entre 4 pour SFFP1 avec une teneur mesurable en matière organique et 0 pour SFFC 2, ce qui n'est pas très favorable à la végétation et encore moins à la culture. Les caractéristiques des différents horizons latéritiques se retrouvent bien au niveau de la CEC : un horizon A (SFFP1, SFFC1) lessivé, mais proche de la surface, donc contenant encore de la matière organique susceptible de faire augmenter la CEC ; un horizon B (SFFC2, SFFP2) d'accumulation d'oxydes de fer, dont la CEC est quasi nulle ; et un horizon C (SFFC3, SFFP3) comportant des blocs de roche mère et des minéraux d'altération plus modérée, qui contient des phyllosilicates comme des smectites ou des serpentines, apportant une CEC (grâce à leur charge négative dans le sol et aux espaces interfoliaires).

Tableau 22 : Capacité d'échange cationique mesurée par la cobaltihexamine des horizons des différents sols

		CEC ($cmol^+ kg^{-1}$)
TOP A	Topsoil A (0-20 cm)	20,1
TOP B	Topsoil B (20-30 cm)	5,96
TOP T03	Topsoil T0 mois	11,0
TOP T+24 – 0 cm	Topsoil T24 mois (0 cm)	12,2
SFFC 1	Ferralsol (0-10 cm)	0,773
SFFC 2	Ferralsol (120 cm)	0,067
SFFC 3	Ferralsol (350 cm)	1,03

Le topsoil (TOP A, TOP B) également latéritique, ne présente cependant pas une CEC aussi faible : le premier horizon est en effet très riche en matière organique, ce qui peut expliquer la valeur élevée de la CEC, matière organique qui diminue en profondeur, d'où la valeur plus faible de CEC pour TOP B. Les sols en tas reflètent également cela : en effet, ils contiennent également une part de matière organique, ce qui place leur CEC à un niveau un peu plus élevé que les sols SFFP et SFFC (à une moyenne sur les cinq sols de 10 $cmol.kg^{-1}$).

Les éléments majeurs retenus par la CEC sont le magnésium Mg^{2+} avec plusieurs milliers de $mg\ kg^{-1}$ pour TOP A et le calcium Ca^{2+} (plusieurs centaines en général à quelques ppm pour les horizons les plus pauvres comme SSFC2), suivis par le sodium Na^+ et le potassium K^+ à plusieurs centaines de ppm dans le topsoil et dans les sols en pile. Ces éléments sont des éléments majeurs, présents en plus grande quantité, et comptent parmi les principaux nutriments des végétaux ; apparemment, sinon en faible quantité au total dans ces sols, ils sont du moins relativement disponibles. Les ETM comme le nickel Ni^{2+} ou le cobalt Co^{3+}, ou même le fer Fe^{3+} sont présents à des teneurs beaucoup plus faibles, dans cas certains inférieures à la limite de détection. Le fer est donc assez peu mobile, il reste dans le réseau de phases cristallines comme la goethite ou l'hématite.

L'intérêt de réaliser ces analyses est de pouvoir comparer les quantités d'éléments en présence à la CEC mesurée, en considérant que tous les éléments importants ont été pris en compte, et de calculer un taux de saturation de la CEC du sol par ces ions (le reste des sites négatifs étant occupé par des protons). Ce taux est calculé par la formule suivante :

$$Taux\ de\ saturation\ (\%) = \frac{Quantité\ de\ charges\ positives\ portées\ par\ les\ ions}{Valeur\ de\ la\ CEC}$$

Cette quantité de charges positives est exprimée en $mol.kg^{-1}$ de sol, comme la CEC. Elle s'apparente en fait à une normalité massique, et correspond à la somme des quantités de

matière des cations présents multipliées par leur charge dans les conditions du milieu :

$$Quantité\ de\ charges\ positives = \sum_i n_i \times z_i$$

n_i : quantité de matière du cation i ;
z_i : charge du cation i.

Les spéciations suivantes ont été retenues pour le calcul : Ca^{2+}, Cr^{3+}, Fe^{3+}, K^+, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Na^+, Ni^{2+}. Les conditions d'oxydation sont telles que le fer est uniquement sous la forme IIIFe. Il n'est d'ailleurs pas possible, comme le montrent les résultats d'analyse minéralogique suivants, de trouver des minéraux où le fer est au degré d'oxydation II, comme la magnétite. Une petite partie du chrome est également sous la forme CrVI, mais elle est alors préférentiellement associée à l'oxygène au sein de l'ion chromate CrO_4^{2-} ou $HCrO_4^-$ et ne porte donc plus de charge positive. Les calculs ont été réalisés pour l'ensemble des cations et pour les majeurs Ca, K, Mg et Na, et sont présentés dans le Tableau 23.

Globalement, le taux de saturation est plus faible pour les sols latéritiques que pour les sols bruns ; la saturation atteint 72 à 80,5% pour ces derniers, en majeurs comme avec tous les cations. Ces sols sont donc susceptibles de fixer et d'échanger de nombreux cations, qui seront par conséquent plus disponibles pour les plantes. La saturation en éléments nutritifs, est pratiquement la même que la saturation en tous les ions analysés : ces sols fixent donc bien Ca^{2+}, K^+, Mg^{2+} et Na^+, mais assez peu les métaux comme le fer, le nickel ou le chrome, contrairement aux sols latéritiques. Ces derniers présentent des taux de saturation relativement faibles, hormis TOP A : en tous cations, de 10,9 à 51% pour les horizons du Ferralsol colluvial. Ces sols ferrallitiques ferritiques sont en tout cas assez pauvres, et ne parviennent pas à fixer beaucoup de cations. Leur CEC était déjà faible, mais ils apparaissent d'autant plus comme peu capables de fixer des éléments nutritifs (Fig. 110). Ils sont en outre acides et les autres sites négatifs des sols sont alors occupés par des ions H+, ce que l'on retrouve par des mesures de pH dans l'eau (entre 4 et 6). Ils présentent néanmoins une différence notable entre les taux de saturation par Ca-K-Mg-Na, et par l'ensemble des cations : ils semblent capables de fixer les ETM, davantage que les sols bruns, ce qui est probablement dû à l'abondance en oxydes de fer qui fixent en particulier le nickel, le manganèse et le chrome.

Tableau 23 : Calcul du taux de saturation de la CEC pour les sols étudiés.

	Tous cations (majeurs et traces)				Ca^{2+}, K^+, Mg^{2+} et Na^+		
Echantillon	**CEC ($cmol.kg^{-1}$ sol)**	**Total des cations ($mg.kg^{-1}$ de sol)**	**Total des charges positives (cmol)**	**Saturation CEC (%)**	**Total des cations ($mg.kg^{-1}$ de sol)**	**Total des cations (cmol)**	**Saturation CEC (%)**
TOP A	20,08	2385,7	16,64	**82,5**	2333,7	16,45	**81,6**
TOP B	5,96	537,4	3,54	**59,3**	502,1	3,40	**57,0**
SFFC 1	0,77	42,3	0,21	**27,7**	30,9	0,17	**22,3**
SFFC 2	0,07	7,0	0,03	**51,0**	6,6	0,03	**48,5**
SFFC 3	1,03	19,4	0,11	**10,9**	18,9	0,11	**10,6**
TOP T0 3	10,98	1543,8	8,62	**78,5**	1470,9	8,35	**76,1**

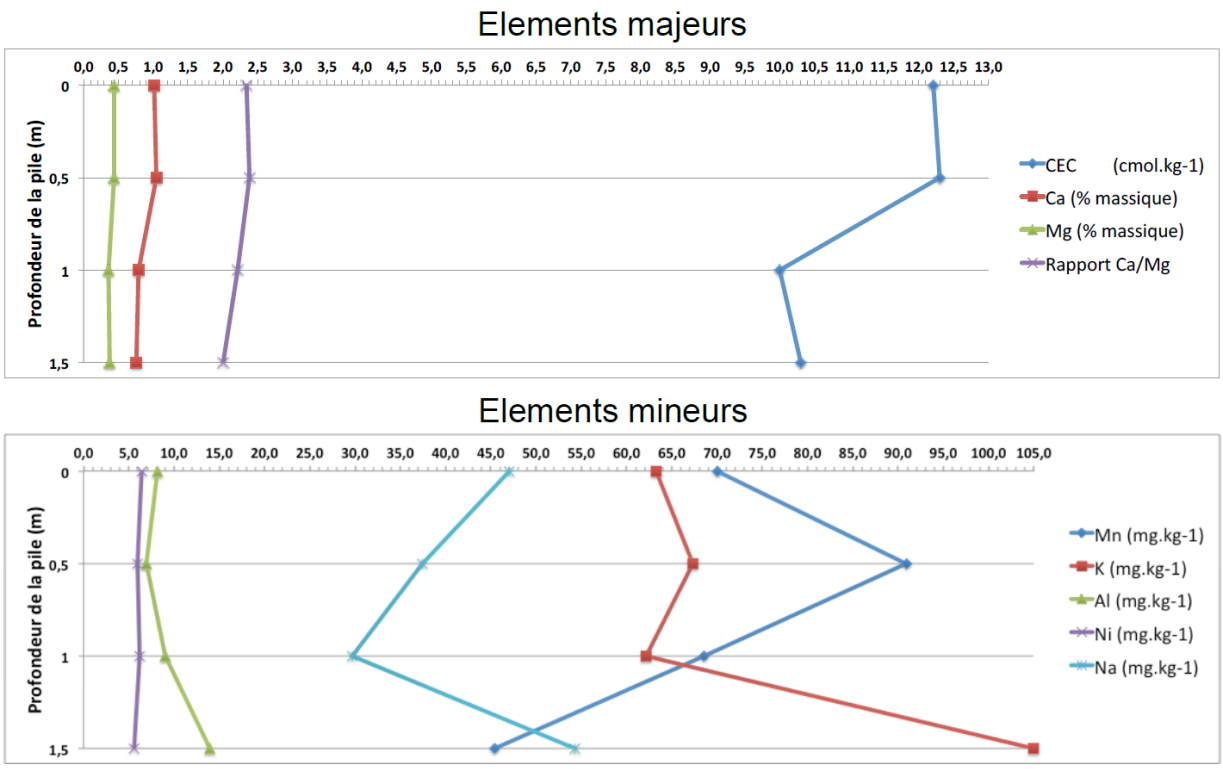


Figure 110 : Evolution de la CEC avec la profondeur dans la pile de Topsoil de Goro après 24 mois

En revanche, le taux de saturation atteint 82,5% pour l'ensemble des cations dans le TOP A, et 81,6% en éléments nutritifs : l'abondance de matière organique dans cet horizon est peut-être à l'origine de cette capacité à retenir ces éléments dont les plantes ont besoin. Celles-ci « recyclent » vraisemblablement les éléments qu'elles utilisent, au contraire des autres sols latéritiques tels que SFFP et SFFC, plus riches en oxydes de fer et plus pauvres en matière organique. Ceci est confirmé par le taux de saturation élevé des sols en tas, relativement homogène et en moyenne de 73,7% (tous cations) ou 70,9% (Ca-K-Mg-Na) sur les cinq sols. Ces sols ayant été décapés jusqu'à la cuirasse, ils ne sont pas aussi en matière organique que TOP A ; néanmoins, ils en contiennent suffisamment pour retenir un grand nombre d'éléments nutritifs. TOP B, moins riche en matière organique car c'est un horizon intermédiaire avec la cuirasse « pure », montre une CEC et des taux de saturation moins importants. La CEC et sa saturation sont donc considérablement élevés sur les topsoils décapés en comparaison avec les latérites classiques de la région. La fertilité chimique des topsoils est donc essentielle et mérite d'être conservée pour la réutilisation de ces terres pour revégétaliser les surfaces dégradées.

Le stockage des topsoils en pile ne semble pas affecter la CEC des topsoils ainsi que son taux de saturation. Ainsi la fertilité chimique des topsoils semble être largement conservée au cours des deux années de stockage. On constate même une légère augmentation de la CEC en surface. Certains éléments comme le K et le Na semble être lixiviés en profondeur, ce qui confirmerait les résultats des teneurs totales exposés ci-dessus. L'Al semble également être appauvri en surface mais la tendance est moins lourde que pour K et Na.

5.2.2.1.3. Minéralogie et caractérisation des phases porteuses de métaux

Afin de préciser la nature minéralogique des sols étudiés, des analyses en DRX et en MET ont été effectuées, permettant en particulier de déterminer une certaine répartition des ETM dans

les sols.

Minéralogie des phases cristallisées (DRX)

Les spectres de diffraction aux rayons X ont été analysés pour tous les horizons de sols et la synthèse pour les sols les plus essentiels est présentée en détail (Fig. 111 ; Tableau 24). Tout d'abord, certains minéraux sont présents dans tous les échantillons : il s'agit de la goethite et de l'hématite (Raous, 2011). Cela concorde avec les observations et analyses faites précédemment (Becquer et al., 2001, 2006). Il semble également y avoir du quartz dans certains échantillons, SBH1 de façon nette et peut-être dans TOP B, mais en plus faible quantité (pics très bas). En effet, il y a beaucoup plus de silice dans les sols bruns que dans les sols latéritiques dont les diffractogrammes ne révèlent souvent, comme phases cristallisées, que des oxydes et oxyhydroxydes de fer ; la ferrihydrite Fe_2O_3,0.5 H_2O semble également être présente, quoique faiblement, dans l'horizon A des sols de pente, SFFP1. Il semble y avoir quelques oxyhydroxydes d'aluminium et de manganèse, comme la galaxite $MnAl_2O_4$ dans TOP B, mais la quantité de Mn présente dans ce sol n'autorise pas une forme aussi pure ; le magnésium pouvant se substituer au Mn et le fer III à l'aluminium, il est possible que cette forme apparaisse avec davantage de Mg substitué (le magnésium atteint en effet 0,54% au total). De nombreux oxydes ou hydroxydes d'aluminium ont été testés, mais aucun ensemble de raies ne correspondait aux spectres obtenus ; il est donc probable que l'aluminium soit présent plutôt sous des formes amorphes.

Sont présents en revanche dans plusieurs sols latéritiques des phyllosilicates : des talcs dans les sols SFFC3 et SFFP. En effet, les horizons SFFP contiennent de 0,75% à 3,64% de MgO, le maximum parmi l'ensemble des sols latéritiques mais qui s'explique par le fait que SFFP3 correspond à la saprolite grossière ; et, bien que SFFC3 n'en contienne au total que 0,47%, la présence de talc dans ces horizons profonds peut s'expliquer par la proximité avec la roche mère : sur substrat ultramafique comme c'est le cas dans la région de Goro, l'altération forme des phyllosilicates magnésiens comme le talc. Enfin, les Cambisols hypermagnésiques contiennent des smectites et des amphiboles ; la quantité de smectites augmente avec la profondeur dans ce sol. Cela est visible par ailleurs en MET. SFFP1 contient peut-être, en très petite quantité, du rutile (TiO_2). Le diffractogramme de TOP A présente en outre une « bosse » due à la matière organique qui rend difficile la soustraction de la ligne de base et la distinction des pics.

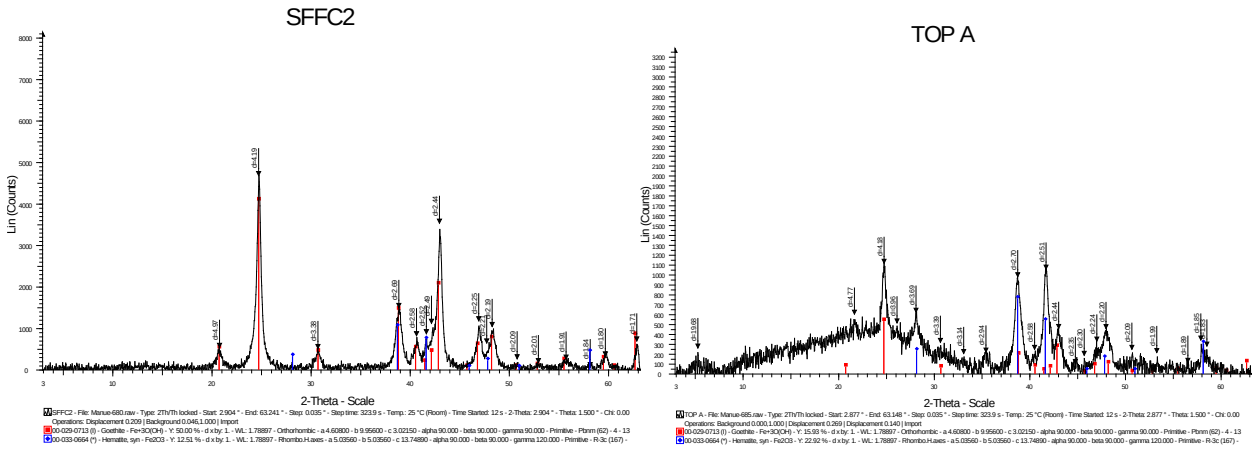


Figure 111 : Spectres DRX de l'horizon B du Ferralsol colluvial (120 cm) et du topsoil TOP

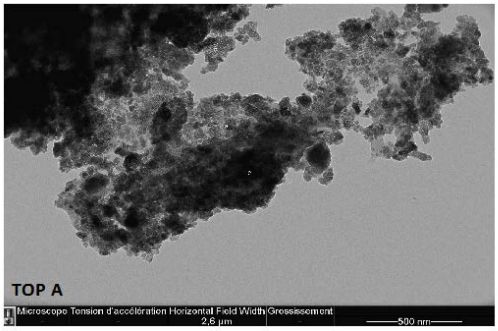
D'autres minéraux ont été envisagés pour expliquer les pics restants : pyrochroïte $Mn(OH)_2$, spinelle, ou encore d'autres phyllosilicates magnésiens, mais n'ont pu être recherchés, faute de temps.

Tableau 24 : Présence des différentes phases cristallines dans les horizons de sols (DRX) (+/+++ : abondance relative)

Minéral	Formule	TOP A	TOP B	TOP T0	Horizon latéritique Ferralsol	Sol brun sur serpentine
Goethite	FeOOH	+++	+++	+++	+++	
Hématite	Fe_2O_3	+++	++	++	++	
Hydroxydes d'Al	$Al(OH)_3$			+	+	
Chromites	$(Mg,Fe)(Cr,Al)_2O_4$	++		++		
Quartz/silice	SiO_2	+	+	+		++
Talc	$Mg_3(OH)_2Si_4O_{10}$				++	++
Smectites et/ou Chlorites	Groupe					++
Amphiboles Fe-Mg	Groupe					++

Caractérisation des phases porteuses de métaux (MET-EDX)

Plusieurs échantillons ont été préparés pour être observés en Microscopie Electronique à Transmission (MET) : il s'agit de TOP A, TOP B, Ferralsol colluvial (120 cm), Ferralsol érodé (300 cm), TOP T0 mois et SBH horizon C. Les résultats obtenus confirment un grand nombre de travaux antérieurs (Raous et al., 2013) mais permettent de vérifier que les métaux sont bien contenus dans les phases minérales porteuses classiques (Fig. 112). A savoir, dans les horizons de surface, une grande partie des oxydes de fer est sous forme d'hématite cristallisée (fragments de cuirasse / pisolithes) et le Ni est essentiellement porté par les goethites, ce qui explique son appauvrissement en surface des Ferralsols. Au contraire, le Cr trivalent est progressivement enrichi dans les horizons latéritiques où cristallisent les oxydes de fer jusqu'à atteindre des concentrations de plus de 5 % dans les pisolithes. Il est essentiellement porté par l'hématite et les chromites primaires héritées. Le Co, est relativement résiduel dans les sommets des profils latéritiques. Dans la littérature, il est connu pour présenter des enrichissements avec le Mn au sommet des horizons saprolitiques. Il est retrouvé dans l'horizon C (300 cm du Ferralsol érodé) à des concentrations de plusieurs milliers de mg kg^{-1}. En revanche il est présent de manière anecdotique dans les topsoils.



Résultats

- Ni : goethite.
- Mn : hématite ?
- Co : aucune localisation
- Cr : hématite / Cr constitutif des chromites.

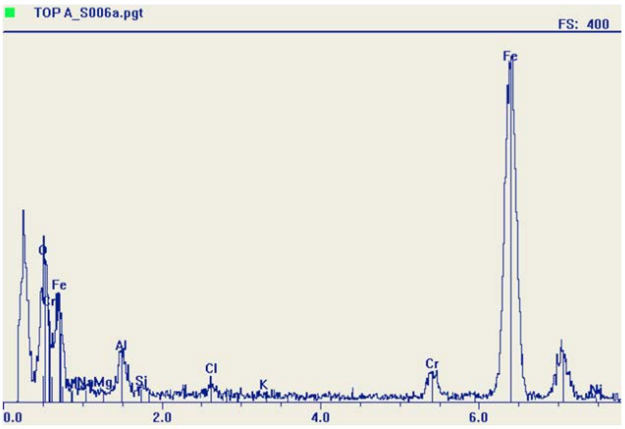


Figure 112 : Identification des minéraux par microscopie électronique à transmission et détermination de la composition des particules par sonde EDX : Particules d'hématite et de chromite dans l'horizon TOP A.

5.2.2.1.4. Caractérisation fine de la matière organique des topsoils et évolution pendant le stockage

Les principales phases minérales ont donc été caractérisées ; mais, cela a été montré à plusieurs reprises, la matière organique joue un rôle important dans ces sols, notamment en ce qui concerne la complexation et la rétention, dans un sens plus large, des cations et probablement des métaux. Il importe donc de chercher à la caractériser ; quelques analyses ont été effectuées dans cette étude, mais comme cela a été évoqué au chapitre précédent, de nombreuses sont encore en cours ou à venir.

- **Teneurs en C et en N de la matière organique**

Le Tableau 25 présente les teneurs en carbone, en azote et en soufre des échantillons, ainsi que le rapport C/N qui caractérise l'état de dégradation de la matière organique. L'horizon A du topsoil (TOP A) présente la teneur en carbone la plus importante : 36,77%, suivi par les sols en tas (TOP T01 en premier avec 14,10%) et l'horizon B du topsoil (TOP B à 7,22%). Hormis SFFP 1 avec 2,84% et SBH 1 avec 2,57%, tous les autres sols ont des teneurs en C inférieures au pourcent. Les teneurs en azote sont encore plus basses : 1,392% au maximum pour TOP A, et l'on retrouve le même ordre que pour le carbone avec TOP T01 ensuite (0,538%) et les autres sols en tas, et parmi les teneurs les plus faibles, les sols ferrallitiques ferritiques de pente et colluviaux. La teneur diminue par ailleurs de la surface à l'horizon C, ce qui est cohérent : il y a de moins en moins de matière organique dans le sol à mesure que la profondeur augmente. La matière organique est dégradée et minéralisée, via les processus de nitrification (oxydation de l'ammoniac et de l'ammonium en nitrites puis nitrates, catalysée par les microorganismes), puis

volatilisée par dénitrification qui produit du N2, du CO2 et de l'eau. Il ne reste donc presque plus de carbone ou d'azote en profondeur.

Tableau 25 : Pourcentages massiques d'azote, carbone et soufre dans les échantillons. Les teneurs en soufre sont données à titre indicatif, mais ne seront pas interprétées.

Echantillon	Masse (mg)	N (%)	C (%)	S (%)	C/N
TOP A	30,82	1,392	36,77	0,16	26,4
TOP B	31,65	0,378	7,22	0,11	19,1
SFFC1	30,52	0,032	0,93	0,15	29,0
SFFC2	30,03	0,004	0,14	0,29	33,3
SFFC3	30,04	0,000	0,15	0,22	-
SFFP1	30,77	0,110	2,84	0,09	25,8
SFFP2	32,08	0,019	0,53	0,29	28,2
SFFP3	31,80	0,001	0,14	0,19	159,0
TOP T01	32,34	0,538	14,10	0,15	26,2
TOP T02	33,23	0,281	8,82	0,12	31,4
TOP T03	31,18	0,370	11,49	0,12	31,0
TOP T04	31,51	0,230	7,49	0,11	32,5
TOP T05	32,29	0,275	9,09	0,11	33,1
SBH1	30,76	0,136	2,57	0,23	18,8
SBH2	30,60	0,072	0,80	0,05	11,2
SBH3	31,89	0,007	0,08	0,03	10,6

Le Cambisol hypermagnésique contient une concentration élevée en matière organique pour un sol tropical : 2,57% pour SBH 1, et les teneurs vont en diminuant pour SBH 2 (horizon B_W) et SBH 3 (horizon B/C). A l'exclusion du topsoil in situ et en pile de Goro, les Ferralsols comportent donc une très faible teneur en matière organique. Ces sols ne permettraient pas après décapage d'assurer une quelconque fertilité biochimique si leur topsoil était utilisé pour la revégétalisation contrairement au Leptosol sur cuirasse qui a été choisi par la mine de Goro. Les Cambisols hypermagnésiques pourraient servir de topsoil dans les secteurs miniers où ils sont présents.

L'azote minéral du sol étant absorbé par les plantes et les microorganismes, le rapport C/N est un indicateur de l'évolution de la matière organique et de l'activité biologique des humus : celui des microorganismes étant en moyenne de 6-8, il est généralement considéré qu'au-delà d'un rapport de 20-25, l'azote issu de la matière organique présente n'est plus suffisant pour ces derniers (Pierre Stengel, 1998). A moins de trouver une autre source d'azote, la biodégradation est alors plus ou moins bloquée et l'azote n'est plus libéré. La décomposition de la matière organique s'effectue alors extrêmement lentement, et un grand nombre d'éléments notamment nutritifs (comme N, mais aussi K ou Ca) n'est alors pas « recyclé » et rendu disponible pour les plantes, ce qui rejoint les commentaires au sujet du taux de saturation de la CEC. Le sol reste pauvre et sa teneur en azote n'est alimentée que par la dégradation de la faible quantité de matière organique issue des plantes en surface, en l'occurrence le maquis minier. Les plantes sont basses et ne peuvent aller chercher les nutriments dont elles ont besoin plus en profondeur, car ceux-ci y sont présents en quantité infime. Excepté TOP B et les SBH, l'ensemble des sols ici est à la limite de ce rapport critique (vers 25-28 pour les sols de surface) voire légèrement au-dessus (entre 26 et 33% pour les sols en tas). Les horizons B/C ou C des Ferralsols (SFFC3 et SFFP3) se distinguent par des rapports C/N respectifs infini et de 159 : ils ne contiennent quasiment plus d'azote et ne participent pas à la biodégradation. Les Cambisols en revanche, bien que contenant peu de matière organique, la recyclent plutôt bien : les rapports C/N de ces sols sont entre 10 et 19, et la dégradation de la matière organique est donc probablement, sinon rapide, du moins susceptible de renouveler l'azote absorbé. Ces sols sont donc plus favorables que les sols latéritiques à la croissance de la végétation de manière générale en assurant un fonctionnement de la flore microbienne du sol beaucoup plus actif.

Evolution de la quantité de carbone organique et du rapport C/N au cours du stockage

La quantité de carbone organique semble évoluer fortement dans les premiers instants du décapage et du stockage et ne pratiquement plus évoluer au cours des deux années suivantes (Fig. 113). En effet, le pourcentage de C organique est de l'ordre de 12% dans le Topsoil décapé au temps t0 et il semble que la matière organique fournie par l'horizon A1 (TOP A) ait considérablement disparu. En revanche le rapport C/N passe de 22 pour TOP A et 27 pour le TOP B (moyenne tournant autour de 25) à 30 pour le TOP T0. Cette valeur tend à diminuer ensuite avec la profondeur.

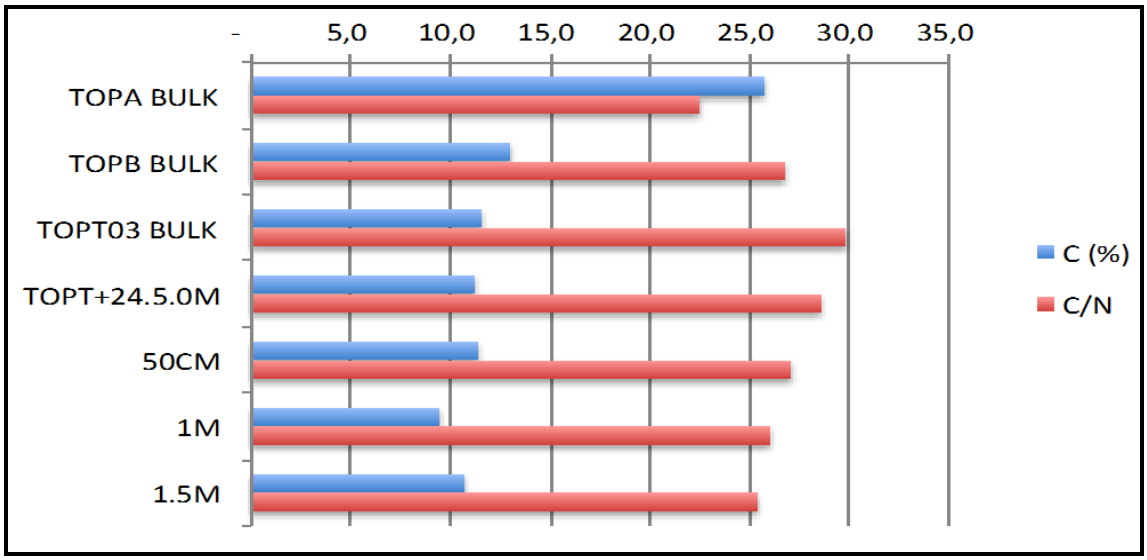


Figure 113 : Pourcentage de carbone organique et rapport C/N dans les différents échantillons de terre

L'analyse de la composition en azote minéral lors des expériences en batch et les données de FTIR sur les échantillons permettront de faire des hypothèses quant à l'évolution de la MO avec la profondeur et le temps de stockage. Une hypothèse possible est que l'azote labile est minéralisé en surface et que les ions nitrate et ammonium sont entrainés en profondeur, faisant décroitre le rapport C/N de 28,5 à 25,5. Toujours est-il que le stockage ne semble pas bouleverser le statut de la matière organique des topsoils et que le gros de la perte en C s'effectue au moment même du décapage et de la mise en pile (forte aération et stimulation de la microflore du sol). Par la suite et jusqu'à deux ans, les changements quantitatifs et qualitatifs semblent mineurs.

Séparation des différents pools de matière organique par densimétrie

Les fractions obtenues par séparation densimétrique sont les suivantes :

- la première fraction F1, de densité inférieure à 1, est constituée presque exclusivement de matière organique fraîche (fragments végétaux) ;
- dans la fraction F2 ($1 < d < 1,85$), des débris végétaux sont encore reconnaissables, mais ont été transformés, il s'agit vraisemblablement de matière organique déjà relativement dégradée ;
- les fractions F3 ($1,85 < d < 3,00$) et surtout F4 ($d > 3,00$) sont beaucoup plus minérales : F4 en particulier ne contient plus, dans les trois sols, que des particules minérales, essentiellement des oxydes de fer (la goethite ayant une densité moyenne proche de 4, ceci est cohérent).



Surnageant : fraction F2

Culot : futures fractions F3 et F4

Figure 114 : Séparation de phases solides distinctes après centrifugation lors de la séparation de la fraction F2

Par ailleurs, des phases se sont individualisées lors de la centrifugation (Fig. 114) : des particules fines et orangées ont dessiné une ligne au-dessus de grains plus gros et plus sombres ; s'agit-il d'une séparation *pisolithes plus riches en hématite*/*particules fines riches en goethite* ? Etant donné la quantité plus faible d'hématite dans les échantillons, il est plus probable qu'il s'agisse d'une séparation de différents types de goethite, selon leur densité mais aussi leur granulométrie (des particules plus fines, plus facilement mobilisables en suspension, même assez denses, peuvent se retrouver en haut).

Ces fractionnements devaient permettre d'étudier les phénomènes ayant affecté qualitativement et quantitativement la matière organique au cours du décapage. Le suivi de la teneur en C et de la valeur du rapport C/N de la matière organique selon la densité permet de tirer des conclusions sur la fonctionnalité du fonctionnement biologique de ces horizons. Le rapport C/N est proche de celui des Ferralsols. La matière organique fraiche est plus pauvre en N. Les fractions denses sont les plus riches en substances humifiées et donc plus réactives vis-à-vis de la fraction minérale mais aussi plus impliquées dans la constitution de la CEC.

Entre les deux horizons du Leptosol en place, TOP A et TOP B, on observe une diminution générale du pourcentage de C entre la surface et la profondeur mais les analyses nous montrent que dans chacune des fractions, les teneurs en C sont les mêmes d'un point de vue qualitatif (Fig. 114). C'est sans doute une augmentation relative de la fraction minérale plutôt qu'un changement qualitatif de la matière organique qui est observé entre TOP A et TOP B.

Lors du décapage et de la mise en pile (Figs. 115 et 116), il y a une perte qualitative en N des fractions denses (densité entre 1,85 et 3,00). En effet, le C/N passe d'une valeur comprise entre 23 et 28 (TOP B et TOP A respectivement) à 36 (TOP T0) pour les fractions légères, probablement du fait d'une minéralisation partielle des groupements fonctionnels les plus dégradable. Pour la fraction F3 (composés humifiés), cette minéralisation est aussi importante avec une forte perte en N des matières organiques : le C/N passe de 13 (biologiquement actif) dans le Leptosol à 23 (peu actif) dans le topsoil décapé. Cela est probablement dû à une minéralisation partielle des groupements $-NH_X$ et $-CH_X$ (à confirmer par les analyses en FTIR).

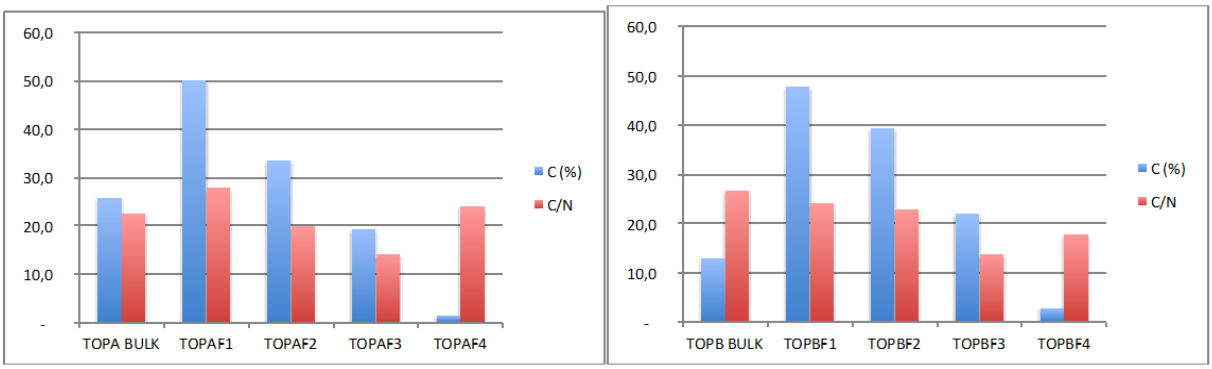


Figure 115 : Pourcentages de C organique et rapports C/N de la fraction totale (bulk) et des différentes fractions densimétriques des deux horizons du Leptosol d'origine (à gauche l'horizon A_1, à droite, l'horizon A_1/C)

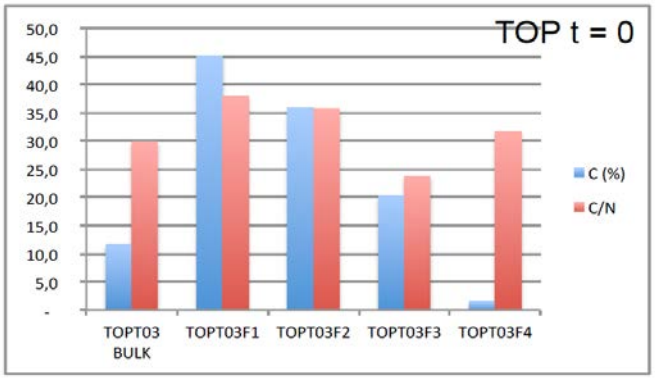


Figure 116 : Pourcentages de C organique et rapports C/N de la fraction totale (bulk) et des différentes fractions densimétriques du Topsoil après décapage (TOP T0).

Caractérisation biochimique de la Matière organique des topsoils (FTIR)

La comparaison des spectres FTIR entre le TOP A, le TOP T03 juste après décapage et mise en pile, le TOP T+24 en surface et à 1,50 m de profondeur confirme les résultats précédents (Fig. 117). Les longueurs d'ondes caractéristiques des effets d'étirement des liaisons (stretch) des groupements de la matière organique sur l'horizon A_1 du Leptosol en place sont : 1629 cm^{-1} : liaisons –C = O : 1715 cm^{-1} ; liaisons C = C ; 2420 cm^{-1} : groupements –CH, $-CH_2$, $-CH_3$; 3402 cm^{-1} : groupements –OH et groupements $-NH_x$ indifférenciés. Etonnamment, on ne retrouve aucune trace de liaisons C = C de cycle aromatique. Encore une fois, les différences constatées entre les échantillons ont lieu au décapage des topsoil et très rapidement on constate une perte en groupements –OH et $–NH_x$ qui se différencient (3365 cm^{-1} et 3157 cm^{-1}) mais perdent en intensité. On en déduit que la matière organique perd des groupements fonctionnels et de l'N minéralisable. Il semblerait que les liaisons –C = O ne soient pas affectées et même au contraire légèrement plus visible (peut-être du fait de la diminution de l'absorbance des liaisons C = C. Après 24 mois, on constate une régression encore plus poussée des groupements alkyls $–CH_x$ bien qu'il n'y ait pas de perte en C organique. Les groupements – C = O disparaissent à nouveau pratiquement après 24 mois de stockage. L'humification et la minéralisation des groupements labiles semblent être actives pendant le stockage des topsoils. Il y a en revanche peu de différences entre la surface de la pile et la profondeur. Ces résultats, notamment les changements constatés entre le Leptosol en place et le Topsoil immédiatement après décapage confirment les diminutions de CEC constatées ainsi que des diminutions attendues de la capacité complexante des matières organiques et la rétention d'éléments majeurs et de métaux par complexation de surface (éléments disponibles).

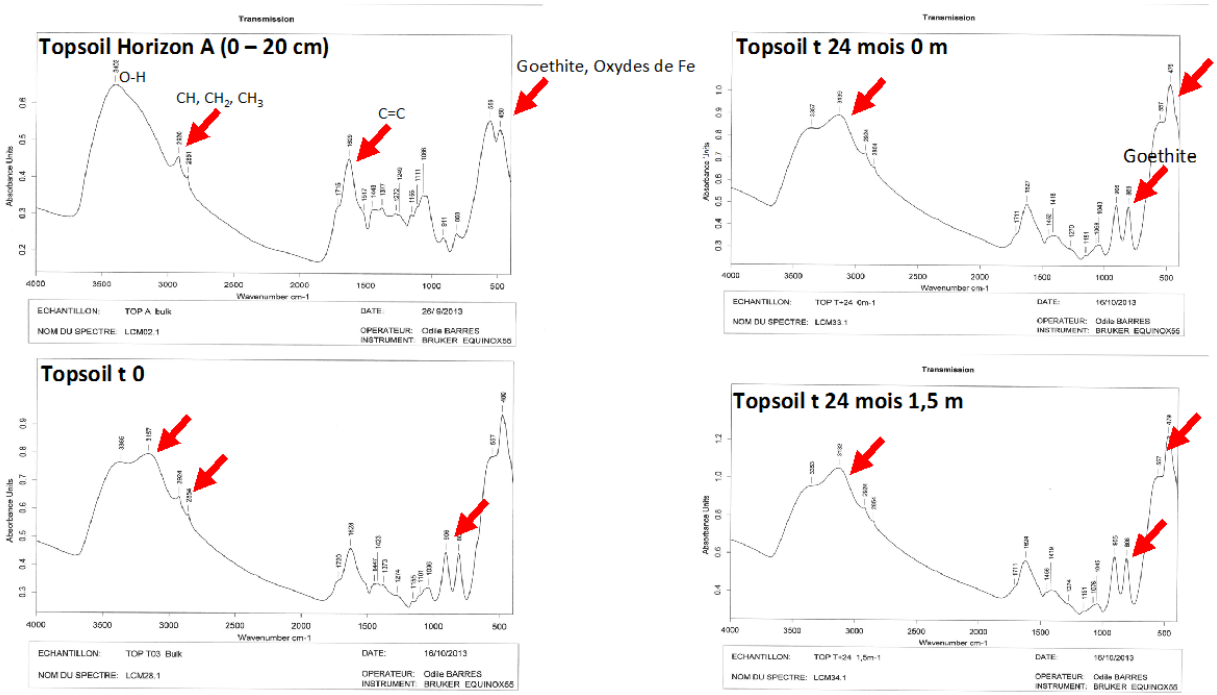


Figure 117 : Spectres Infra-Rouge à transformée de Fourrier effectués sur les différents échantillons de topsoil depuis le Leptosol en place jusqu'au topsoil stocké 24 mois.

5.2.2.2. Sous-tâche 2 : Modélisation de la disponibilité des métaux au cours des différentes étapes du stockage du topsoil

Concernant les expériences de désorption de métaux menées pour les échantillons TOP A, TP B, TOP T03 et SFFC2, le sodium pour le $NaNO_3$ et quelquefois le fer présentent un pourcentage d'erreur très élevé en analyse ICP-AES au niveau des standards en eau usée, et ce particulièrement pour le test à l'EDTA en ce qui concerne le fer ; plusieurs longueurs d'onde ayant été utilisées pour un même élément, et les valeurs choisies sont celles pour lesquelles l'erreur est la plus faible. Pour l'ensemble des autres éléménts, les erreurs ne dépassent jamais 7% et pour 90% des cas 3%. Le pH a été ajusté par des ajouts de quelques gouttes de NaOH ou de HNO_3 concentrés pour augmenter ou diminuer le pH. Les faibles apports de Na ou de NO_3^- ne modifient pas la spéciation des solutions (Raous, 2011). Les terres en général ont un pH compris entre 4 et 5. Le traitement à pH 6 permet de mieux mettre en évidence le caractère amphotère des goethites et dans une moindre mesure de la matière organique. Il affecte la charge de surface des goethites et permet une plus grande décomplexation des cations adsorbés à la surface des oxydes de fer. Le point de zéro charge des goethites est souvent compris entre 7 et 8 (Raous, 2011 ; Raous et al., 2013). Le pH mesuré est celui des solutions après 24h d'agitation et est parfois tamponné par la composition des terres, ou par le citrate.

La modélisation finale n'a pas pu être menée à bien car il manque les données des principaux anions (même si P et S sont dosés par ICP-AES et permettent de déterminer PO_4^{3-} et SO_4^{2-}. De même, les concentrations en ion chromate seront déterminées. Cependant, les données corroborent celles de Raous (2011) en ce qui concerne le Ferralsol et permettent par différence d'observer le rôle que joue la matière organique dans les topsoils en ce qui concerne la CEC (cations échangeables mobilisés par l'extraction au $NaNO_3$) et la complexation de surface (déterminée par les extractions au citrate et à l'EDTA).

5.2.2.2.1. Mobilisation des éléments dans la solution de $NaNO_3$

Les compositions des solutions pour les traitements pH4 et à pH6 sont données dans le tableau 26.

Tableau 26 : Valeurs de pH, teneurs en mg.kg^{-1} de sol en éléments, concentrations en carbone organique et inorganique total en solution dans les suspensions de $NaNO_3$ (0,01M) après 24 h d'agitation.

Extraction NaNO3 0,01M

	Echantillons	pH incubé	Al	Ca	Co	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Ni	P	S	Si	Zn	TOC (mg l-1)	TIC (mg l-1)
pH ajusté	Ferralsol 1,20 m	4,32	0,020	0,240	0,006	0,006	0,004	0,001	0,220	0,079	0,114	0,015	< LQM	0,300	0,071	0,003	6,960	< LQM
à 4	**Sol en place 0-20 cm**	**4,14**	**0,290**	**1,123**	**0,005**	**0,030**	**0,009**	**0,174**	**1,663**	**5,493**	**0,157**	**0,038**	**0,004**	**0,735**	**0,150**	**0,006**	**50,900**	**0,170**
	Sol en place 20-30 cm	**4,22**	**0,067**	**0,775**	**0,005**	**0,016**	**0,006**	**0,093**	**0,796**	**2,611**	**0,101**	**0,035**	**< LQM**	**0,489**	**0,056**	**0,006**	**22,060**	**0,035**
	Topsoil à t = 0 mois	4,12	0,056	3,254	0,005	0,031	0,004	0,262	2,551	3,329	0,330	0,010	0,034	1,440	0,228	0,012	24,990	0,024
	Topsoil à t = 12 mois (0 cm)	3,83	0,014	2,426	0,001	0,021	< LQM	0,226	0,965	1,871	0,188	0,004	< LQM	0,553	0,077	0,006	12,810	< LQM
	Topsoil à t = 24 mois (0 cm)	4,29	0,023	3,968	0,294	0,023	< LQM	0,146	1,088	2,953	0,333	0,011	0,004	1,035	0,112	0,012	15,890	0,331
	Topsoil à t = 24 mois (50 cm)	3,93	0,024	5,434	0,303	0,021	< LQM	0,070	1,059	3,419	0,630	0,015	< LQM	0,992	0,137	0,005	23,310	0,384
	Topsoil à t = 24 mois (100 cm)	4,12	0,013	4,214	0,919	0,017	< LQM	0,040	1,182	3,053	0,292	0,017	< LQM	1,147	0,122	0,009	14,250	0,204
	Topsoil à t = 24 mois (150 cm)	4,24	0,022	2,972	0,503	0,020	0,003	0,076	1,426	2,719	0,227	0,012	< LQM	1,063	0,101	0,005	18,910	0,104
		pH incubé	Al	Ca	Co	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Ni	P	S	Si	Zn	TOC (mg l-1)	TIC (mg l-1)
pH ajusté	Ferralsol 1,20 m	4,69	0,000	0,302	< LQM	0,009	0,003	0,006	0,268	0,080	0,020	0,003	0,004	2,117	0,115	0,003	8,990	0,313
à 6	**Sol en place 0-20 cm**	**4,33**	**0,194**	**0,613**	**0,002**	**0,049**	**0,008**	**0,587**	**1,911**	**2,958**	**0,069**	**0,028**	**0,008**	**0,841**	**0,147**	**0,004**	**60,780**	**3,403**
	Sol en place 20-30 cm	**4,29**	**0,101**	**0,862**	**0,003**	**0,031**	**0,010**	**0,178**	**8,137**	**2,013**	**0,067**	**0,025**	**0,011**	**1,182**	**0,094**	**0,006**	**45,900**	**4,575**
	Topsoil à t = 0 mois	4,71	0,048	1,263	0,001	0,043	0,004	0,551	2,402	1,712	0,120	0,006	< LQM	1,745	0,196	0,003	28,540	< LQM
	Topsoil à t = 12 mois (0 cm)	4,95	0,035	1,015	< LQM	0,043	< LQM	0,621	1,329	0,999	0,060	0,003	0,003	0,977	0,073	0,002	18,370	5,768
	Topsoil à t = 24 mois (0 cm)	4,55	0,019	2,709	0,173	0,021	< LQM	0,080	1,136	2,305	0,216	0,007	< LQM	1,196	0,106	0,006	19,780	< LQM
	Topsoil à t = 24 mois (50 cm)	4,75	0,022	2,856	0,123	0,023	0,003	0,110	1,119	2,299	0,305	0,007	< LQM	1,285	0,125	0,002	22,070	< LQM
	Topsoil à t = 24 mois (100 cm)	4,82	0,016	2,156	0,342	0,020	0,003	0,089	2,032	2,007	0,135	0,007	0,004	1,666	0,113	0,004	19,030	2,672
	Topsoil à t = 24 mois (150 cm)	4,56	0,026	1,326	0,160	0,027	< LQM	0,211	1,391	1,527	0,086	0,005	< LQM	1,490	0,088	0,002	24,170	3,817

L'ion majoritaire mobilisé dans tous les sols est le magnésium, suivi par le calcium est également important, surtout dans TOP T03. Le sol SFFC2, considéré comme un « témoin goethite » (assimilé à de la goethite pure) en raison de sa CEC très faible (0,067) et se comportant de manière similaire à la limonite étudiée par Sophie Raous (2011), libère en effet très peu d'éléments. Le Ca y est d'ailleurs le cation principal avec le K. Le Mn, le Mg sont les deux autres cations significativement présents. Pour les autres éléments métalliques : Al et Ni, les teneurs échangeables sont très faibles. Ceci corrobore le fait que le Ni n'est pas présent sur la CEC de ces matériaux limonitiques mais uniquement adsorbé par complexation de surface ou inclus dans la matrice cristalline des goethites. Parmi les anions, le sulfate et le nitrate sont les principales espèces en solution, il n'y a pas de carbonates détectables (TIC). Les solutions sont excessivement peu minéralisées.

En revanche pour le Leptosol (TOP A et pour une moindre mesure TOP B), le Ca échangeable est 4 fois supérieur à sa valeur dans le Ferralsol. Le potassium est plus élevé que le Ca traduisant ainsi le rôle du recyclage biogéochimique dans ces sols très squelettiques. Le Mg est le cation dominant en situation naturelle. Le décapage et le stockage induisent une forte augmentation du rapport Ca/Mg, probablement par une lixiviation beaucoup plus importante du Mg. Si le décapage n'a pas eu d'effet sur la perte en K, le stockage met en évidence des pertes (absence de recyclage par une végétation en place) et celui-ci a tendance à s'appauvrir en surface car les concentrations augmentent régulièrement avec la profondeur. Le nickel est peu échangeable dans le topsoil en place mais trois fois supérieur au Ferralsol. Il est très sensible au décapage et au stockage car les concentrations atteignent celles du Ferralsol dans la pile de topsoil après 24 mois. Les mêmes tendances sont observées pour le Cr (ici il ne s'agit essentiellement que de Cr^{3+} échangeable). Les concentrations en C organique soluble sont peut-être la cause de ces concentrations plus élevées dans TOP A et TOP B car elles baissent considérablement dans la pile de Topsoil après 24 mois. Le potentiel de lixiviation de ces deux métaux est donc faible et les eaux percolant à travers les piles de Topsoil ne présenteront donc aucun danger en termes de toxicité métallique.

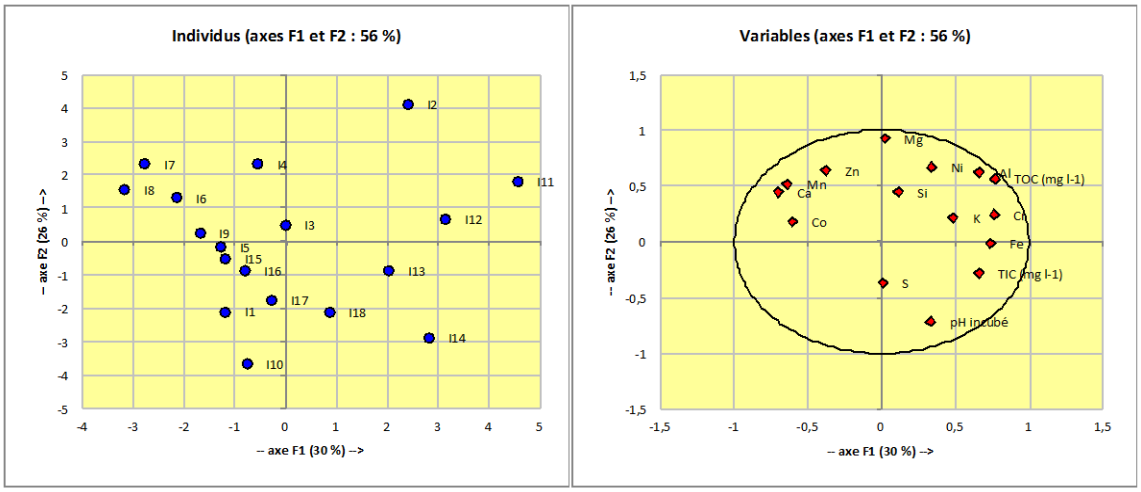


Figure 118 : Représentation des individus et vecteurs propres des paramètres (pH, éléments, TOC, TIC) dans le plan composé des axes F1 et F2 pour l'extraction à $NaNO_3$ (0,01 M). Les individus sont numérotés de I1 à I18. De I1 à I9, le pH a été ajusté à 4 en début d'incubation, de I10 à I18, il a été ajusté à 6. Les échantillons sont toujours dans le même ordre : TOP A, TOP B, TOP T0, TOP T+12 0cm, TOP T+24 de 0 à 150 cm, SFFC 2 (de 1 à 9 et de 10 à 18).

Les solutions de l'ensemble des terres pour les deux traitements pH on été utilisées pour une analyse en composantes principales (ACP). Les corrélations obtenues entre les paramètres des solutions ainsi que l'effet du traitement pH sur la composition des solutions peuvent ainsi être observés de manière statistique (Fig. 118). L'effet principal de la solution de $NaNO_3$ est de mobiliser les cations échangeables de la CEC. Ceux-ci sont plus facilement échangés à pH acide. Ainsi le pH est négativement corrélé au Mg, au Ca et au Ni en solution. Il est positivement corrélé aux anions (i.e. SO_4^{2-}) dont la mise en solution est positivement corrélée au pH (diminuant la charge positive des goethites et donc l'adsorption des anions). Les concentrations en ion HCO_3^- (TIC) augmentent également avec le pH ce qui est logique.

Le pH du Lithosol est tamponné par la forte teneur en matière organique. Les solutions restent toujours à un pH proche de 4. Le pouvoir tampon diminue avec le décapage et le stockage pour approcher les caractéristiques du Ferralsol. Les solutions de TOP A sont diamétralement opposées à celles du Ferralsol. Celles du TOP B puis TOP T0 et TOP T+12 sont au centre avec notamment un rapport Ca/Mg proche de 1 tandis que celles du TOP T+24 mois (pH 4) sont à gauche du plan et correspondent à une chimie où le rapport Ca/Mg est largement supérieur à 1. Pour les solutions TOP T+24 mois à pH 6, ce rapport revient vers 1. Les corrélations entre paramètres sont données en annexe du volet 3. Elles indiquent pour le Ni que la concentration est positivement liée à celle du Mg (pour la part échangeable). Elle est également liée à la teneur en carbone organique total de la solution (complexation en solution) ?

5.2.2.2.2. Mobilisation des éléments en présence de citrate et d'EDTA

Les compositions des solutions pour les traitements pH4 et à pH6 pour les deux complexants sont données dans les tableaux 27 et 28. De manière générale, l'EDTA est un complexant plus fort du Fe, du Ni, du Mn, du Cu et du Zn, tandis que le citrate complexe plus facilement le Ca (voir détail des constantes de complexation de l'EDTA et du citrate avec les cations dans Raous, 2011). De plus, le citrate et l'EDTA peuvent se complexer à la surface des goethites (Raous, 2011). Ceci est confirmé par la teneur en COT dans le Ferralsol (unique phase réactive : goethite avec absence de CEC) qui perd près de 200 mg l^{-1} de COT par rapport à TOP A pour lequel l'adsorption de citrate est négligeable. En s'adsorbant à la surface des oxydes de fer, le citrate libère des anions dont les constantes de complexation sont plus

élevées : les anions du CrVI (CrO_4^{2-} ou $HCrO_4^-$) qui ont des concentrations pouvant dépasser 1,7 mg l^{-1} et surtout les sulfates (teneurs de plus de 20 mg l^{-1}) pour le Ferralsol. La encore, le pH de la solution influence cette réaction d'autant plus que le citrate a tendance à tamponner le pH de la solution entre 5 et 6 (valeur d'un de ses pK). Le citrate est aussi complètement dissocié pour des valeurs de pH supérieures à 5 et les constantes des complexes formés par le $citrate^{3-}$ sont plus élevées. Tous les cations sont donc plus mobilisés à pH 6 qu'à pH 4 contrairement au traitement $NaNO_3$ pour lequel le mécanisme de mobilisation était l'échange d'ion. Ceci démontre que le mécanisme de mobilisation par le citrate concerne bien les formes adsorbées par complexation de surface. Les quantités mobilisées pour le Mg sont identiques que pour le $NaNO_3$ car cet élément ne forme pas de complexes stables avec la matière organique des sols et les goethites. Pour le Ca, l'effet est plus important car il se complexe plus facilement aux groupements OH des surfaces.

Tableau 27 : Valeurs de pH, teneurs en mg.kg^{-1} de sol en éléments, concentrations en carbone organique et inorganique total en solution dans les suspensions de citrate (0,01M) après 24 h d'agitation.

Extraction Citrate 0,01M

	Echantillons	pH incubé	Al	Ca	Co	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Ni	P	S	Si	Zn	TOC (mg l-1)	TIC (mg l-1)
pH ajusté à 4	Ferralsol 1,20 m	4,03	3,884	0,211	0,285	1,302	0,010	13,840	0,309	0,102	1,163	0,171	< LQM	21,360	0,537	0,019	921	0,251
	Sol en place 0-20 cm		**3,947**	**2,399**	**0,026**	**0,202**	**0,014**	**7,524**	**1,562**	**7,507**	**0,259**	**0,313**	**0,083**	**1,123**	**< LQM**	**0,027**	**1 119**	**0,060**
	Sol en place 20-30 cm	**4,07**	**4,937**	**1,047**	**0,015**	**0,220**	**0,009**	**6,394**	**0,970**	**2,893**	**0,133**	**0,227**	**0,045**	**1,163**	**< LQM**	**0,018**	**1 030**	**1,370**
	Topsoil à t = 0 mois	3,52	2,006	7,024	0,029	0,294	0,008	10,030	2,434	5,469	0,771	0,106	0,010	2,206	0,201	0,026	1 060	0,130
	Topsoil à t = 12 mois (0 cm)	3,79	1,132	4,644	0,006	0,260	0,007	6,711	1,050	2,448	0,342	0,044	0,008	1,225	< LQM	0,019	1 035	0,053
	Topsoil à t = 24 mois (0 cm)	3,42	1,974	8,923	1,051	0,241	0,006	8,962	1,479	2,938	0,644	0,089	0,008	1,669	< LQM	0,052	919	1,032
	Topsoil à t = 24 mois (50 cm)	4,40	2,357	7,722	1,049	0,276	0,006	11,820	1,198	3,350	0,894	0,131	0,009	1,764	< LQM	0,020	1 016	0,133
	Topsoil à t = 24 mois (100 cm)	3,80	2,018	6,124	2,303	0,302	0,005	11,570	1,248	2,749	0,401	0,101	0,010	2,194	0,007	0,028	1 023	0,250
	Topsoil à t = 24 mois (150 cm)	4,16	2,244	4,663	1,826	0,303	0,011	14,420	1,453	3,025	0,344	0,101	0,016	1,975	< LQM	0,018	1 056	0,174
		pH incubé	**Al**	**Ca**	**Co**	**Cr**	**Cu**	**Fe**	**K**	**Mg**	**Mn**	**Ni**	**P**	**S**	**Si**	**Zn**	**TOC (mg l-1)**	**TIC (mg l-1)**
pH ajusté à 6	Ferralsol 1,20 m	6,19	5,214	0,217	0,069	1,743	0,013	51,670	0,398	0,089	0,528	0,484	0,004	23,810	0,505	0,039	958	0,439
	Sol en place 0-20 cm	**5,87**	**3,648**	**3,017**	**0,033**	**0,261**	**0,014**	**7,042**	**1,359**	**8,684**	**0,452**	**0,410**	**0,010**	**1,435**	**< LQM**	**0,027**	**1 126**	**0,302**
	Sol en place 20-30 cm	**6,11**	**4,444**	**1,280**	**0,016**	**0,271**	**0,017**	**6,740**	**0,804**	**3,175**	**0,196**	**0,266**	**0,007**	**1,491**	**< LQM**	**0,016**	**1 083**	**0,505**
	Topsoil à t = 0 mois	6,55	1,877	7,657	0,023	0,509	0,007	11,830	2,351	5,220	0,881	0,135	< LQM	2,983	0,070	0,021	1 153	0,958
	Topsoil à t = 12 mois (0 cm)	6,17	1,180	5,020	0,009	0,503	0,010	10,900	1,408	2,546	0,378	0,077	< LQM	1,631	< LQM	0,019	1 085	0,738
	Topsoil à t = 24 mois (0 cm)	6,16	2,050	8,412	1,314	0,297	0,007	9,232	1,399	3,608	0,731	0,130	< LQM	2,366	< LQM	0,046	1 073	2,094
	Topsoil à t = 24 mois (50 cm)	6,10	2,103	9,775	1,107	0,282	0,011	9,479	1,661	3,899	1,175	0,149	< LQM	2,375	< LQM	0,021	1 105	0,300
	Topsoil à t = 24 mois (100 cm)	5,49	1,991	6,558	2,765	0,289	0,008	9,953	1,121	3,142	0,446	0,129	< LQM	2,536	< LQM	0,025	1 063	0,342
	Topsoil à t = 24 mois (150 cm)	5,77	2,128	5,734	1,962	0,328	0,007	12,370	1,495	3,444	0,427	0,115	0,003	2,263	< LQM	0,017	1 085	0,171

De manière générale, l'EDTA a un effet moins important sur la mobilisation des cations sauf pour le Ni dans les sols riches en C organique (TOP A et TOP B) bien qu'il fasse jouer les mêmes mécanismes. Pour les anions, du fait de l'encombrement de la molécule, son effet de mobilisation des anions est faible. Le Cr mobilisé dans ce cas est plutôt du Cr^{3+} (la spéciation du Cr dans les solutions permettra de le confirmer). Nous pouvons en déduire que le Ni est peu complexé à la surface des goethites des Ferralsols gériques comme cela a été montré par Raous et al. (2010) et qu'il est constitutif de la maille cristalline de ces goethites (Massoura et al., 2006).

Tableau 28 : Valeurs de pH, teneurs en mg.kg^{-1} de sol en éléments, concentrations en carbone organique et inorganique total en solution dans les suspensions d'EDTA (0,01M) après 24 h d'agitation.

Extraction EDTA 0,01M

	Echantillons	pH incubé	Al	Ca	Co	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Ni	P	S	Si	Zn	TOC (mg l-1)	TIC (mg l-1)
pH ajusté à 4	Ferralsol 1,20 m	4,58	0,203	0,214	0,065	0,019	0,005	2,801	0,386	0,059	0,226	8,856	0,008	< LQM	3,236	0,187	< LQM	1 141	0,073
	Sol en place 0-20 cm	**3,89**	**0,177**	**0,983**	**0,022**	**0,078**	**0,009**	**< 0,0000**	**1,407**	**4,674**	**0,101**	**< LQM**	**0,578**	**< LQM**	**0,746**	**0,066**	**0,023**	**1 215**	**0,075**
	Sol en place 20-30 cm	**3,96**	**1,093**	**0,834**	**0,009**	**0,017**	**0,012**	**1,318**	**1,004**	**2,506**	**0,097**	**144,300**	**0,341**	**< LQM**	**0,537**	**0,056**	**0,005**	**1 187**	**0,049**
	Topsoil à t = 0 mois	4,17	0,071	2,227	0,026	0,040	0,012	< 0,0000	2,309	2,895	0,268	2,260	0,142	< LQM	1,551	0,233	0,020	1 191	0,129
	Topsoil à t = 12 mois (0 cm)	4,13	0,048	1,590	0,002	0,041	0,005	< 0,0000	0,971	1,492	0,116	1,798	0,059	< LQM	0,736	0,070	0,015	1 210	0,041
	Topsoil à t = 24 mois (0 cm)	4,42	0,031	3,138	0,967	0,023	0,006	< 0,0000	0,944	2,675	0,264	< LQM	0,113	< LQM	1,095	0,112	0,029	1 171	0,337
	Topsoil à t = 24 mois (50 cm)	4,51	0,037	3,603	0,840	0,025	0,007	0,260	1,105	2,811	0,423	< LQM	0,128	< LQM	1,123	0,130	0,008	1 185	0,151
	Topsoil à t = 24 mois (100 cm)	4,38	0,018	3,161	1,686	0,018	0,008	0,501	1,112	2,756	0,217	< LQM	0,101	< LQM	1,278	0,118	0,009	1 181	0,062
	Topsoil à t = 24 mois (150 cm)	4,23	0,035	2,378	1,203	0,023	0,006	0,673	1,207	2,491	0,178	8,218	0,098	< LQM	1,153	0,095	0,004	1 161	0,033
		pH incubé	**Al**	**Ca**	**Co**	**Cr**	**Cu**	**Fe**	**K**	**Mg**	**Mn**	**Na**	**Ni**	**P**	**S**	**Si**	**Zn**	**TOC (mg l-1)**	**TIC (mg l-1)**
pH ajusté à 6	Ferralsol 1,20 m	4,91	0,160	0,390	0,057	0,023	0,011	3,075	0,743	0,071	0,048	15,340	0,008	< LQM	8,162	0,311	0,003	1 157	1,356
	Sol en place 0-20 cm	**5,11**	**0,228**	**0,389**	**0,044**	**0,059**	**0,020**	**< 0,0000**	**1,752**	**1,589**	**0,035**	**7,136**	**0,713**	**< LQM**	**0,944**	**0,158**	**0,050**	**1 261**	**0,021**
	Sol en place 20-30 cm	**4,87**	**0,133**	**0,289**	**0,015**	**0,029**	**0,010**	**< 0,0000**	**0,802**	**1,096**	**0,007**	**6,032**	**0,254**	**< LQM**	**0,797**	**0,049**	**0,017**	**1 217**	**0,027**
	Topsoil à t = 0 mois	5,48	0,110	0,857	0,034	0,086	0,019	< 0,0000	2,588	1,201	0,136	9,481	0,129	< LQM	1,971	0,210	0,032	1 239	0,110
	Topsoil à t = 12 mois (0 cm)	5,29	0,112	0,604	0,005	0,109	0,009	< 0,0000	1,108	0,608	0,089	8,558	0,055	< LQM	1,122	0,068	0,023	1 227	3,191
	Topsoil à t = 24 mois (0 cm)	5,22	0,045	1,579	1,295	0,038	0,006	< 0,0000	2,813	1,641	0,115	< LQM	0,083	< LQM	1,370	0,102	0,048	1 188	0,019
	Topsoil à t = 24 mois (50 cm)	5,24	0,041	1,849	1,147	0,033	0,020	< 0,0000	1,148	1,739	0,204	< LQM	0,097	< LQM	1,418	0,120	0,017	1 213	0,018
	Topsoil à t = 24 mois (100 cm)	4,82	0,019	1,426	2,305	0,022	0,009	1,033	1,137	1,704	0,076	0,629	0,064	< LQM	1,740	0,105	0,017	1 206	0,010
	Topsoil à t = 24 mois (150 cm)	5,07	0,038	1,214	1,569	0,035	0,014	0,801	1,318	1,602	0,070	< LQM	0,065	< LQM	1,448	0,089	0,008	1 196	0,018

Les résultats des ACP faites sur les solutions de sol en présence de citrate et d'EDTA permettent de dégager d'autres points (Fig. 119). D'une part, pour le citrate, les sols se démarquent très clairement en trois groupes. Le premier constitué par les TOP A et TOP B quelle que soit la valeur de pH est corrélé au TOC élevé (pas d'adsorption de citrate), au P, au

Ni et au Mg. Il est inversement corrélé au Ca. Le second est constitué par le Ferralsol pour les deux valeurs de pH. Il est corrélé au Fe, au Cr et au S et inversement corrélé au TOC (adsorption de citrate sur la goethite). Enfin le dernier groupe correspond aux sols décapés et stockés 0, 12 ou 24 mois sans différences. Il est corrélé au Ca, au K. Le pH quant à lui n'a aucune influence sur la différenciation des individus. Le Ni n'est plus du tout corrélé au Mg qui est libéré par échange d'ion. Il s'agit donc d'un autre pool de Ni que celui échangeable et qui est en général 10 fois plus important et qui peut représenter jusqu'à quelques mg kg^{-1} de Ni. Nous sommes donc bien en présence de mécanismes de mobilisation des espèces adsorbées par complexation de surface.

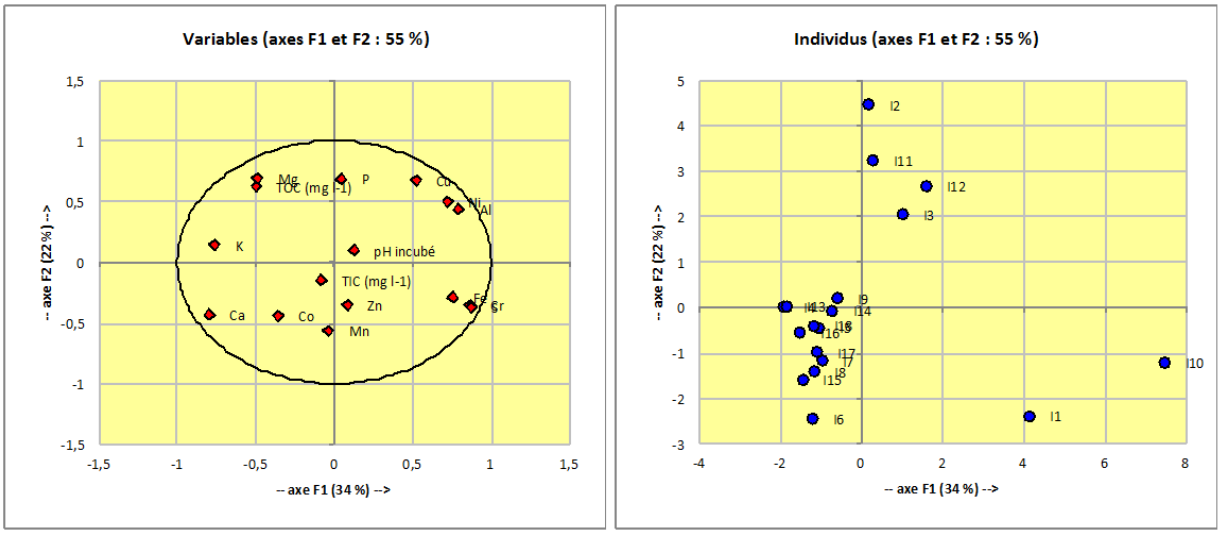


Figure 119 : Représentation des individus et vecteurs propres des paramètres (pH, éléments, TOC, TIC) dans le plan composé des axes F1 et F2 pour l'extraction au Citrate (0,01 M). Les individus sont numérotés de I1 à I18. De I1 à I9, le pH a été ajusté à 4 en début d'incubation, de I10 à I18, il a été ajusté à 6. Les échantillons sont toujours dans le même ordre : TOP A, TOP B, TOP T0, TOP T+12 0cm, TOP T+24 de 0 à 150 cm, SFFC 2 (de 1 à 9 et de 10 à 18).

D'autre part, pour l'EDTA les données sont moins tranchées et l'ACP révèle moins de discrimination des individus (Fig. 120). Quelques tendances restent identiques au citrate. Le Ferralsol reste très démarqué des autres sols et plutôt à l'opposé des TOP A et dans une moindre mesure des TOP B. Les Ferralsols sont à nouveau corrélés au S mais aussi au Si (on comprend pourquoi le Si est absent des horizons B latéritiques) et inversement corrélés au Mg et au Ni. Pour les topsoils stockés, la discrimination se fait surtout à pH 4 ou les topsoils stockés 24 mois sont tous regroupés à gauche, inversement corrélés au pH, au Cr et au TIC et positivement corrélés au Ca et au Mn. Pour ce dernier, il se pourrait que les conditions de la pile puissent être légèrement réductrices par moments et engendrer la réduction d'oxydes de Mn mais cela n'est qu'une hypothèse et d'autre part, les horizons les plus profonds de la pile ont des concentrations légèrement inférieures à 50 cm (maximum).

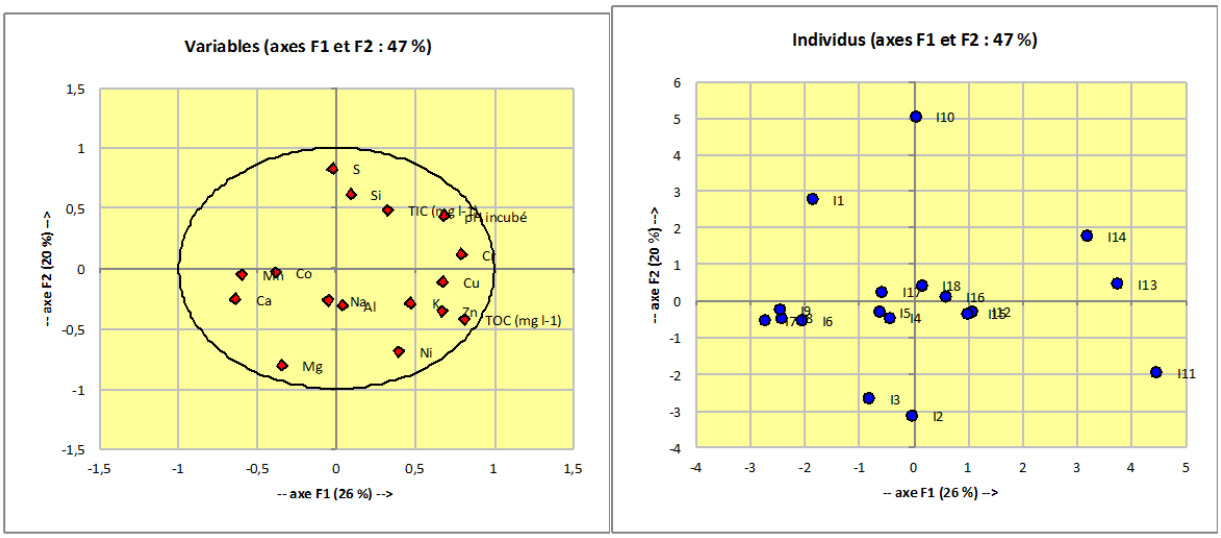


Figure 120 : Représentation des individus et vecteurs propres des paramètres (pH, éléments, TOC, TIC) dans le plan composé des axes F1 et F2 pour l'extraction à l'EDTA (0,01 M). Les individus sont numérotés de I1 à I18. De I1 à I9, le pH a été ajusté à 4 en début d'incubation, de I10 à I18, il a été ajusté à 6. Les échantillons sont toujours dans le même ordre : TOP A, TOP B, TOP T0, TOP T+12 0cm, TOP T+24 de 0 à 150 cm, SFFC 2 (de 1 à 9 et de 10 à 18).

5.2.2.3. Conclusions et recommandations de la tâche 2.2

Le stockage des topsoils issus de Leptosols sur cuirasse continue ne semble pas affecter la fertilité chimique et biochimique. Les éléments minéraux nutritifs semblent conservés à l'instar du calcium. Le potassium diminue légèrement. Les métaux secondaires comme le Ni et le Cr sont légèrement affectés par le stockage. En ce qui concerne le Ni, sa disponibilité est plus élevée dans les topsoils du fait des fortes concentrations en matière organique et de la constitution d'une CEC importante. Le recyclage biogéochimique des cations majeurs (Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^{+}) du P et du Ni dans les Leptosols sur cuirasse continue permet une réadsorption de ces éléments sur la CEC induite par la forte teneur en matière organique. La matière organique subit des changements quantitatifs et qualitatifs lors du décapage puis du stockage, mais l'essentiel de ces changements ont lieu lors du décapage. Le stockage pendant deux ans ne modifie que peu les propriétés de fertilité des topsoils par rapport au décapage. Malgré cela, la teneur en MO reste élevée et ses propriétés sont globalement plutôt stable dans les topsoils stockés, notamment en ce qui concerne la CEC des sols. Dans l'ensemble les propriétés de fertilité chimique restent proches de celles du matériau d'origine et globalement supérieures à celles des Ferralsols classiques.

Le CrVI, malgré les très fortes concentrations totales en Cr des topsoils et des conditions favorables à sa stabilité ne présente pas de concentrations dépassant les normes dans les eaux naturelles. Les expériences de lixiviation des éléments à des pH contrastés montrent une réserve mobilisable de métaux comme le Ni et le Cr plutôt limitée. Pour le Cr VI, cependant, la présence d'acides organiques complexants comme le citrate ou d'anions compétiteurs comme le phosphate pourraient provoquer d'importantes mobilisations de Cr, de l'ordre de plusieurs dizaines de mg kg^{-1}, avec une toxicité potentielle.

Les Cambisols hypermagnésiques peuvent, s'ils sont disponibles localement être une source de topsoil à très fort potentiel de fertilité. En revanche, leur destruction peut entraîner une disparition d'habitat pour une grande partie de la végétation native.

5.3. RÉFÉRENCES DU VOLET 3

Acosta J.A., Jansen B., Kalbitz K., Faz A. and Martínez-Martínez S. 2011. Salinity increases mobility of heavy metals in soils. Chemosphere,Volume 85, Issue 8, 1318–1324.

AFNOR : Association française de normalisation, Mai 2005. Recueil de normes : Qualité du sol, normes et règlementation. AFNOR Editions, La Plaine Saint-Denis, France. NF ISO 10390, *Détermination du pH*. Disponible sur http://www.afnor.org.

AFNOR : Association française de normalisation, Avril 2003. Recueil de normes : Qualité du sol, normes et règlementation. AFNOR Editions, La Plaine Saint-Denis, France. NF ISO 1127, D*étermination du potentiel d'oxydoréduction*. Disponible sur http://www.afnor.org.

AFNOR : Association française de normalisation, Janvier 1995. Recueil de normes : Qualité du sol, normes et règlementation. AFNOR Editions, La Plaine Saint-Denis, France. NF ISO 11265, *Détermination de la conductivité électrique spécifique*. Disponible sur http://www.afnor.org.

Bacon J. R., Davison C. M., 2008, "Is there a future for sequential chemical extraction?", Analyst, 133, 25-46

Becquer, T., Pétard, J., Duwig, C., Bourdon, E., Moreau, R. and Herbillon, A. J. (2001). Mineralogical, chemical and charge properties of geric ferralsols from New Caledonia. Geoderma, 103, pp. 291-306.

Becquer, T., Quantin, C., Rotte-Capet, S., Ghanbaja, J., Mustin, C. and Herbillon, A. (2006). Sources of trace metals in Ferralsols in New Caledonia. European Journal of Soil Science, 57, pp. 200-213.

Gäbler H-E. (1997), Mobility of heavy metals as a function of pH of samples from an overbank sediment profile contaminated by mining activities. Journal of Geochemical Exploration 58, 185- 194

Hellerich L. A. and P. Nikolaidis N.P. (2005) Studies of hexavalent chromium attenuation in redox variable soils obtained from a sandy to sub-wetland groundwater environment, Water Research 39 (2005) 2851–2868.

Huang P.M., Bollag J.-M. and Denesi N. (2002). Interactions between soil particules and microorganisms-Impact on the terrestrial ecosystem. IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental systems, Vol.8, Series Editors Buffle J. and van Leeuwen H.P.. John Wiley and Sons. ISBN 0 471 60790 8.

Kabata-Pendias A. (2004), Soil–plant transfer of trace elements—an environmental issue. Geoderma 122, 143–149

Massoura, S., Echevarria, G., Becquer, T., Ghanbaja, J., Leclerc-Cessac, E. and Morel, J.L. (2006). Nickel bearing phases and availability in natural and anthropogenic soils. Geoderma 136, 28-37.

Mench M., Juste C. and Soldâ P. (1992). Effets de l'utilisation de boues urbaines en essai de longue durée: accumulation des métaux par les végétaux supérieurs. Bull. Soc. Bot. Fr. 139, Actual.bot. 1,141-156.

Pueyo M., J. Mateu, A. Rigol, M. Vidal, J.F. López-Sánchez, G. and Rauret (2008), "Use of the modified BCR three-step sequential extraction procedure for the study of trace element

dynamics in contaminated soils". Environmental Pollution 152, 330-341.

Qian J., Wang Z.J., Shan X.Q., Tu Q., Wen B. and Chen B. (1996). "Evaluation of plant availability of soil trace metals by chemical fractionation and multiple regression analysis". Environmental Pollut., 91, 3, 309-315

Quantin C., Becquer T. and Berthelin J. (2002), Mn-oxide: a major source of easily mobilisable Co and Ni under reducing conditions in New Caledonia Ferralsols, C. R. Geoscience 334, 273–278

Raous, S. (2011). Dynamique du nickel et d'autres éléments en traces métalliques (Co, Cr, Cu et Mn) dans des matériaux ultramafiques. Thèse de doctorat, Laboratoire Sols et Environnement INPL/INRA.

Raous, S., Becquer, T., Garnier, J., Martins, É. D. and Echevarria, G. (2010). Mobility of metals in nickel mine spoil materials. Applied Geochemistry, 25, pp. 1746-1755.

Raous, S., Echevarria, G., Sterckeman, T., Hanna, K., Thomas, F., Martins, E.S. and Becquer, T. (2013). Potentially toxic metals in ultramafic mining materials: identification of the main bearing and reactive phases. Geoderma. 192:111-119.

Rocha L., S.M. Rodrigues, I. Lopes , A.M.V.M. Soares , A.C. Duarte and E. Pereira, (2011), The water-soluble fraction of potentially toxic elements in contaminated soils: Relationships between ecotoxicity, solubility and geochemical reactivity. Chemosphere 84, 1495–1505

Shtiza A., R. Swennen , A. Tashko (2005), Chromium and nickel distribution in soils, active river, overbank sediments and dust around the Burrel chromium smelter (Albania). Journal of Geochemical Exploration 87, 92– 108

Stengel, P. (1998). Sol : interface fragile. INRA/QUAE.

Weng L.P., Wolthoorn A., Lexmond T.M., Temminghoff E. J.M. and Van Riemsdijk W.H. (2004), Understanding the Effects of Soil Characteristics on Phytotoxicity and Bioavailability of Nickel Using Speciation Models, Environ. Sci. Technol., 38, 156-162

Xiao-Quan S. and Bin C. (1993). Evaluation of sequential extraction for speciation of trace metals in model soil containing natural minerals and humic acid". Anal. Chem., 65, 6, 802-807.

Zeng F., Ali F., Zhang H., Ouyang Y., Qiu B. and Wu F., 2011. The influence of pH and organic matter content in paddy soil on heavy metal availability and their uptake by rice plants. Environmental Pollution, 159, 84-91

Zhao S., Chenghong Feng C., Wang D., Liu Y. and Shen Z. 2013; Salinity increases the mobility of Cd, Cu, Mn, and Pb in the sediments of Yangtze Estuary: Relative role of sediments' properties and metal speciation. Chemosphere 91, 977–984

5.4. BILAN QUANTITATIF (PUBLICATIONS, COMMUNICATIONS, FORMATION)

5.4.1. MÉMOIRES, THÈSE

Liane-Clarisse MOUCHON, 2012. Disponibilité du nickel dans les sols ultramafiques de Goro en Nouvelle-Calédonie. Mémoire de Maser 2 (Géosciences : Planète, Ressources,

Environnement Minérales) Université de Lorraine.

Christophe Martins-Bernard, 2012. Etude de l'évolution de la chimie du topsoil minier au cours de son stockage. Mémoire de Master 1, Université Pierre et Marie-Curie.

Antoine Deffay, 2013. Le stockage des topsoils miniers en Nouvelle-Calédonie, applications à la restauration écologique. Mémoire de master 1 (environnement, parcours chimie) Université Paris XI, Orsay.

Liane-Clarisse MOUCHON . Thèse de doctorat en Sciences Agronomiques de l'Université de Lorraine (Allocation MESR) du 1er novembre 2012 au 31 octobre 2013. Thèse interrompue par la candidate pour des raisons de santé.

6. VOLET 4 « ETUDE DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DE QUELQUES ESPÈCES DE *TRISTANIOPSIS* ET *SCAEVOLA* DANS UNE PERSPECTIVE DE CONSERVATION ET DE RESTAURATION DES MILIEUX »

Intervenants :

Laurent MAGGIA, Iac axe II- CIRAD, responsable du volet 4

Adrien WULFF (étudiant en Thèse UNC-LIVE/ IAC_Axe II)

Géraldine BIDAU (stage d'ingénieur ISTOM, puis VSC IAC_axe II)

Marie-Laure TIOUCHICHINE (Stage de master 2 de l'UM2)

6.1. OBJECTIFS, ORGANISATION, ET DESCRIPTION DES TRAVAUX

La fragmentation des milieux et la perte de diversité biologiques sont les principaux effets négatifs de l'exploitation minière sur les milieux naturels. La préservation de sites choisis pour la qualité de la biodiversité présente, est donc préconisée, ainsi que la production de plants et leur réinsertion au sein d'aires protégées. Pour respecter au mieux l'état originel des sites concernés, il est nécessaire d'évaluer la biodiversité forestière par une approche estimative de la diversité génétique des espèces qui la composent et par la suite, de maintenir et favoriser cette diversité pour assurer les flux de gènes essentiels à la survie des populations résiduelles.

Parmi les espèces d'écotypes miniers calédoniens, celles des genres *Tristaniopsis* et *Scaevola*, et en particulier *Tristaniopsis calobuxus*, *T. guillainii*, et *Scaevola montana* y sont bien représentées. Dans le but d'optimiser l'emploi de ces trois espèces dans les campagnes de restauration, il a été convenu d'approfondir nos connaissances sur leur dynamique spatiale, et en particulier l'effet de l'impact de la fragmentation sur ces dernières, ainsi que leur dynamique temporelle, en mettant en évidence, s'il y a lieu, l'érosion dans le temps de la diversité génétique que leurs populations naturelles peuvent subir en milieu minier. Pour ce faire, une approche préconisant l'introduction d'outils moléculaires en complément de ce qui se fait plus classiquement, est préconisée. Elle est basée sur :

- une analyse de la structuration de la diversité génétique des trois espèces considérées à l'échelle du territoire,
- une estimation des distances de pollinisation et de dissémination des graines de *T. calobuxus* et de *S. montana*.
- une étude démographique d'une population de *T. calobuxus*.

D'autre part, en Nouvelle-Calédonie, le genre *Tristaniopsis* est représenté par 13 espèces endémiques et 2 variétés. Certaines de ces espèces sont classées sensibles sur la liste de l'UICN, c'est pourquoi une étude particulière de ce genre en Nouvelle-Calédonie, à l'aide d'outils moléculaires, est aussi conduite afin de permettre un appui à la caractérisation de sa

diversité spécifique.

Le modèle *Tristaniopsis*

C'est une angiosperme de la famille des Myrtaceae, arbres/arbustes largement représentée dans les forêts et dans les maquis, 40 espèces dans le monde, 13 décrites en Nouvelle-Calédonie, toutes endémiques, dont 2 sont protégées (liste rouge UICN). Une de ces 13 espèces n'a pu être retrouvée sur le terrain, T. jaffreï, identifiée par Tanguy Jaffré, elle n'avait été observée qu'une seule fois, en 1985. Elle ne fait donc pas partie de l'ensemble étudié.

Ce projet, de par les résultats acquis, a vocation à contribuer à la protection d'espèces rares et/ou menacées, ainsi qu'à la conservation et restauration des milieux, dans un souci de bonne gestion du patrimoine environnemental de la Nouvelle-Calédonie.

- Tâche 1 : Etudes des diversités génétiques des populations de *Tristaniopsis calobuxus* et de *Scaevola montana*

Afin de ne pas perturber la distribution spatiale naturelle de la diversité génétique des espèces aux niveaux des sites à revégétaliser, il est essentiel de prêter une attention toute particulière aux choix des lots de semences à partir desquels les plants à introduire seront produits, la diversité génétique du lot de plants à introduire pour une espèce donnée devant être à l'image de celle de la population du site d'accueil pour cette même espèce.

De fait, une analyse de la structuration spatiale de la diversité génétique des espèces étudiées à l'échelle de leur distribution sur le territoire s'impose. Cette analyse conduit à la définition des différents niveaux de richesse de la diversité rencontrés sur chaque site, ce qui les compose, leurs spécificités s'il y a, et, plus largement, comment s'organise spatialement cette diversité génétique en Nouvelle-Calédonie pour chacune des espèces retenues.

Ainsi, pour chaque site calédonien concerné par un programme de revégétalisation et/ou d'enrichissement pour l'une ou l'autre des espèces étudiées, des groupes semenciers potentiels leur correspondant génétiquement pourront être identifiés et référencés.

- Tâche 2 et 3 : Etude des flux de gènes par pollen et graines – distances de pollinisation et de dissémination

L'objectif de cette partie d'étude est d'évaluer les distances de pollinisation et de dissémination de graines, à partir de différentes approches, l'une centrée vecteurs et l'autre axée sur l'identification de liens de parenté via l'analyse de profils-empreintes génétiques, pour respectivement les deux espèces *S. montana* (zoophile et zoochore) et *T. calobuxus* (anémophile et anémochore).

Ceci afin de définir les distances optimales à respecter entre deux populations-plantations d'une même espèce pour garantir le bon fonctionnement des flux de gènes entre elles.

En ce qui concerne *T. calobuxus*, il a été initié en parallèle une étude démographique afin d'apprécier la dynamique de pertes en effectifs en fonction des classes de tailles observées au sein d'une même population.

- Tâche 4 : Outil moléculaire d'identification des différentes espèces calédoniennes de *Tristaniopsis*

Il s'est agi d'effectuer une taxonomie, par approche moléculaire, du groupe des *Tristaniopsis* calédoniens. Cet outil, véritable base de données de profils moléculaires, élaboré à partir de l'étude de profils de séquences d'ADN pour chaque espèce de *Tristaniopsis* néo-

calédoniens, permet aujourd'hui d'identifier, quelque soit l'époque de l'année ou le stade de vie du plant concerné, l'espèce à laquelle il appartient.

Ainsi, à la demande, des individus observés sur le terrain pourront être identifiés en laboratoire, à partir de prélèvements tissulaires qui leurs auront été faits, sur la base d'analyses comparatives de leur profil génétique à ceux contenus dans la base de référence.

6.2. TRAVAUX RÉALISÉS ET RÉSULTATS OBTENUS

6.2.1. TÂCHE 1 : ETUDE DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS DE TRISTANIOPSIS ET DE SCAEVOLA

6.2.1.1. Etude de la structuration génétique des populations de Scaevola montana

(voir par ailleurs le mémoire de doctorat d'Adrien Wulff : « Le micro-endémisme dans un hot-spot de biodiversité : approche globale sur la flore vasculaire de Nouvelle-Calédonie et analyse comparative au sein du genre *Scaevola* » (2012))

6.2.1.1.1. Echantillonnage

6.2.1.1.2. Acquisition de données en laboratoire et analyses

Des échantillons de feuilles de S. montana ont été recueillis auprès d'individus répartis dans neuf populations sur l'île principale (Col d'Amoss, Dôme de Tiébaghi, Ouaco, Koniambo, presqu'ile de Pindai, Kouaoua, col de Ho, col de Plum et vallée de la Tontouta) et une d'une île au large des côtes (Ile des Pins). Ces populations se situent sur des substrats ultramafiques, autour des sites miniers, ainsi que sur des substrats différents, tels que les sols acides à Amoss et de calcaires à Pindai.

Pour chaque individu, les jeunes feuilles fraîches ont été recueillies, séchées et stockées avec des billes de gel de silice jusqu'à l'extraction d'ADN. Lorsque c'est possible, nous avons échantillonné des individus séparés de plus de 10 m afin de réduire la probabilité d'échantillonnage à partir de plusieurs familles étroitement apparentées.

- **Choix des microsatellites**

9 paires d'amorces microsatellites ont été développées dans cette étude.

- **Extraction d'ADN et PCR**

Le broyage du matériel végétal a été réalisé à partir de 40mg de matière sèche. Les extractions d'ADN sont réalisées à l'aide du kit d'extraction d'ADN génomique de plante : Dneasy Plant Mini Kit QIAGEN® suivant la technique de Doyle et Doyle (1990). L'amplification par PCR pour le génotypage est réalisée à l'aide d'amorces spécifiques (marquées par fluorochrome) au locus microsatellite ciblé.

Génotypage des individus

Le profil allélique de chaque individu a été obtenu par l'analyse des tailles de fragments microsatellites sur génotypeur à capillaire (3130xl genetic analyzer®, Applied Biosystems®). Les produits PCR sont dilués au 125ième et mis en présence d'un marqueur de taille co-migrant (GeneScanTM-500 LIZ, Applied Biosystems).

Lecture des données

Les données issues du génotypage sont analysées à l'aide du logiciel GeneMapper® Software V4.0 (Applied Biosystems®). Elles sont présentées sous forme d'électrophorégrammes. On peut ainsi définir le profil allélique de chaque individu pour chaque locus étudié.

6.2.1.1.3. Résultats

Echantillonage

Deux cent treize individus ont été récoltés sur les 9 populations de *S.montana*.

Analyse des données

L'indice de différenciation (Fst) significatif entre populations comparées deux à deux, met en évidence une structuration entre les populations étudiées.

En approche bayésienne (Fig. 121), sans assignation préalable d'un individu appartenant à une population, nous avons mis en évidence quatre groupes distincts pour S. montana. Deux groupes ont été identifiés sur une large échelle géographique : le groupe des populations du grand massif ultramafique du sud et le groupe des massifs miniers de la côte ouest. Deux autres groupes bien distincts sont identifiés, caractérisé pour chacun par de petites aires géographiques. C'est le cas de la population de S. montana de l'Ile des Pins, dont le caractère insulaire peut facilement expliquer son isolement par l'absence de flux de gènes avec celles de la Grande Terre. L'autre population particulière est celle du col d'Amoss qui semble constituer une entité unique. Cette population se développe sur un type de sol très particulier qui est peu représenté en Nouvelle-Calédonie. Il est possible que cette caractéristique écologique ait contribué à la mise en place de phénomènes particuliers tel qu'un décalage de la phénologie, comme observé pour d'autres espèces (Foster et al., 2007), limitant les flux de gènes avec les autres populations, favorisant la mise en place d'écotypes particuliers.

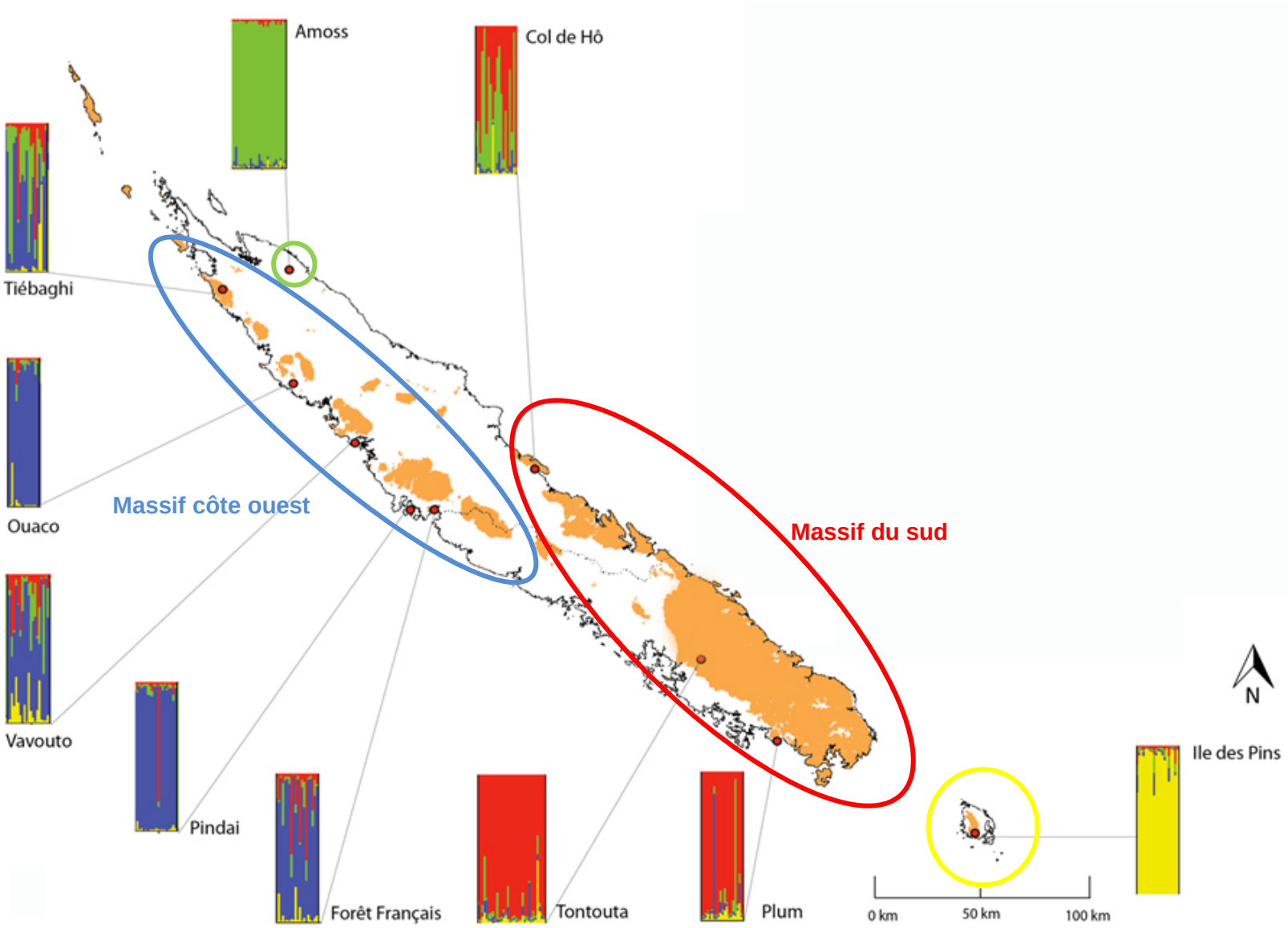


Figure 121 : structuration des populations de *S. montana*

6.2.1.1.4. Discussion et conclusion

Il est souvent conseillé de recueillir les graines sur le site qui doit être revégétalisé afin de conserver les particularités du site. Vis a vis des déficits en hétérozygotes chez S. montana, il serait préférable d'échantillonner sur une grande zone pour pouvoir récupérer le plus de diversité possible. Toutefois, il n'est pas toujours possible de le faire pour différentes raisons (accès aux populations, productivité insuffisante de graines). Pour cette espèce, il est tout à fait envisageable d'échanger le matériel biologique entre les différents massifs de la Côte Ouest sans apporter de grandes modifications dans la structure génétique de l'espèce. C'est aussi le cas si on veut échanger du matériel biologique entre les populations du Sud. Par contre, il serait déconseillé d'échanger du matériel entre ces deux grands groupes. Vis à vis des populations très particulières du Col d'Amoss et de l'Ile des Pins, le matériel biologique ne devrait être utilisé que pour revégétaliser le site sur lequel il a été collecté.

6.2.1.2. Etude de la diversité génétique des populations de Tristaniopsis calobuxus

Cette étude a permis de définir la structuration de la diversité génétique de l'espèce *T. calobuxus* présente sur sols ultramafiques et volcano-sédimentaires.

6.2.1.2.1. Echantillonnage

Sur un total de 30 populations de *T. calobuxus* recensées en Nouvelle-Calédonie (Dawson J.W, 1992), 9 ont été sélectionnées pour mener l'étude. Les populations choisies s'étendent sur toute la Grande Terre. Pour que l'échantillonnage soit le plus représentatif possible et afin d'essayer de capturer le maximum de la diversité génétique, l'échantillonnage a été réparti sur toute la superficie de chacune des populations étudiées. La distance de récolte entre les individus d'une même population va de 3 à 200 m.

Chaque feuille prélevée a été mise en sachet en présence de billes de gel de silice et chaque individu a été géo-référencé (point GPS).

Les feuilles sont ensuite traitées au laboratoire de la Plate Forme du Vivant (PFV) de Nouméa.

6.2.1.2.2. Acquisition de données en laboratoire et analyses

- **Choix des microsatellites**

Pour caractériser la diversité génétique d'une espèce il est possible d'utiliser plusieurs types de marqueurs tels que les marqueurs morphologiques, biochimiques, chromosomiques ou moléculaires. Cette étude est menée par approche moléculaire avec des marqueurs microsatellites.

La création d'une banque de loci microsatellites spécifique à *T. calobuxus* a permis l'identification et le développement de 43 paires d'amorces, chacune caractéristique d'un locus microsatellite. Sur ce total, cinq loci facilement amplifiables et reconnus polymorphes ont été retenus pour mener l'étude (B03, B06, E05, A10a et D03) (Tab. 29).

Tableau 29 : Liste des loci microsatellites utilisés pour l'étude de diversité génétique et de flux de gène de *Tristaniopsis calobuxus*

Nom locus	Motif microsat	Poids (pb)	amorce	Ta (°C)
Tcalo A10a	$GA_{34}+AG_{28}$	170-212	A10a F A10a R	55
Tcalo B03	AG_9+AG_6	416-462	B03 F B03 R	55
Tcalo B06	GA_{13}	225-269	B06 F B06 R	55
Tcalo D03	AG_{15}	398-444	D03 F D03 R	55
Tcalo E05	$TC_{11}+CT_4$	321-375	E05 F E05 R	55

Extraction d'ADN et amplification en chaine par polymérase (PCR)

Le broyage du matériel végétal a été réalisé à partir de 20 mg de matière sèche à l'aide d'un broyeur à billes (Retsh MM400). Les extractions d'ADN conduites à l'aide du kit d'extraction d'ADN génomique de la plante : Dneasy Plant Mini Kit QIAGEN® suivant la technique de Doyle et Doyle (1990). L'amplification par PCR pour le génotypage est réalisée à l'aide d'amorces spécifiques (marquées par fluorochrome) au locus microsatellite ciblé.

Génotypage des individus

Cf Tache 1.a.

Lecture des données

Cf Tache 1.a.

Analyse des données

- - Analyse de la diversité génétique
  - Richesse allélique : nombre moyen d'allèles par locus.
  - Taux d'hétérozygotie : proportion d'hétérozygotes observée dans une population et comparaison à un taux d'hétérozygotie attendue (taux pour une population idéale, panmixie).
  - Indice de fixation (Fis) : estimateur de la corrélation des « gènes » chez les individus dans une population, aussi appelé indice de fixation ou de consanguinité.
- - Analyse de structuration
  - Indice de différenciation génétique (Fst) : estimateur de la corrélation des gènes entre individus dans une population par rapport à l'ensemble des populations, révèle l'existence, ou non, d'une structuration entre les populations étudiées tout en quantifiant leurs différences.
  - L'AMOVA (Analyse de la Variance Moléculaire) permet d'estimer la part de variabilité inter et intra-populationnelles.
  - Approche bayésienne : permet d'obtenir le nombre de groupe le plus probable dans lesquels se repartissent les individus étudiés.

– Corrélation entre distance génétique et géographie : permet de voir s'il existe un isolement par la distance entre chaque population (test de Mentel).

6.2.1.2.3. Résultats

Echantillonnage

Cent soixante deux individus, répartis dans 9 populations présentes sur sol ultramafique ou volcano-sédimentaire, ont été échantillonnés (Fig. 122).

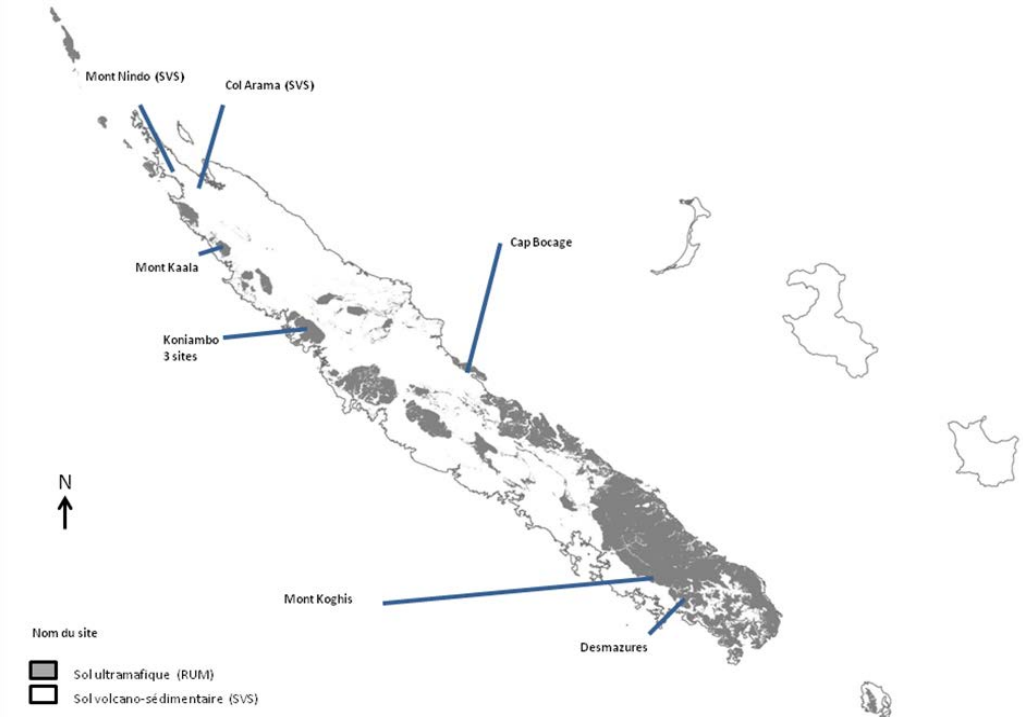


Figure 122 : Carte des récoltes de *Tristaniopsis calobuxus* pour l'étude de diversité génétique

Acquisition de données en laboratoire et analyses

Cent trente deux échantillons ont été analysés à partir des 5 loci microsatellites retenus.

Analyse des données

- Analyse de la diversité génétique

Richesse allélique

L'analyse révèle une importante richesse allélique avec 93 allèles identifiés pour les 5 loci microsatellites. Le nombre d'allèles par locus s'étend de 13 à 23 (Fig. 123).

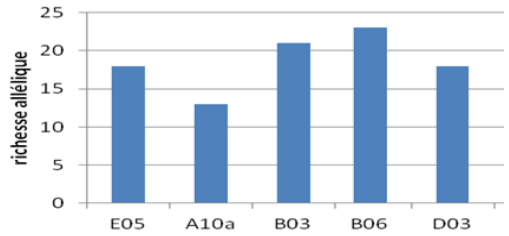


Figure 123 : Richesse allélique par locus

L'étude de la répartition de la richesse allélique pondérée par population fait apparaître une influence se rapportant au substrat. On y observe aussi une richesse plus faible sur substrat volcano-sédimentaire (3.7<x< 4,6) qu'en substrat ultramafique (4.9< x <8,5) (Fig. 124).

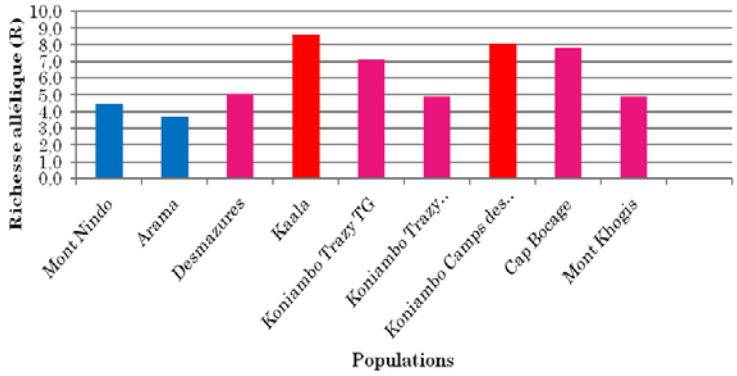


Figure 124 : Richesse allélique pondérée par populations

L'analyse des profils de génotypage, à partir de l'ensemble des 5 loci, a permis de mettre en évidence que chacun des individus admettait un profil génotypique qui lui était propre, permettant ainsi de le différencier de tous les autres, et que des allèles rares apparaissaient au niveau de certaines populations. De fait, l'identification de la présence d'un de ces allèles dans le profil d'un individu, permet de rattacher automatiquement ce dernier à la population marquée par l'allèle rare observé.

De l'ensemble de ces remarques, il ressort que notre outil moléculaire se révèle être performant et tout à fait approprié aux études envisagées.

◎ Taux d'hétérozygotie et indice de fixation (Fis)

Parmi l'ensemble des populations étudiées, certaines apparaissent à l'équilibre, c'est le cas de : Mont Nindo, Arama, Desmazures, Koniambo Trazy Sommet, et Cap Bocage. Elles se situent toutes en milieu ouvert et plutôt mono-spécifique. Alors que les autres populations, plus enclavées et/ou en milieu plutôt plurispécifique : Kaala, Koniambo Trazy TG, Koniambo Camps des chinois, et Mont Koghis admettent des déficits en hétérozygotes, indices révélateurs de perturbations faisant obstacle aux flux de gènes, ce qui est le cas de par l'environnement où elles se situent.

Il apparait donc différents états possibles pour les populations à l'échelle du territoire en fonction de leur histoire et/ou conditions environnementales, ce qui préfigure l'existence d'une structuration entre elles.

- *Analyse de structuration*

Indice de différenciation génétique (Fst), test de Mendel, et approche bayésienne

L'ensemble des analyses révèlent globalement les mêmes résultats avec des appréciations qui ne diffèrent que très légèrement.

Si le Fst global obtenu reflète l'existence d'une différenciation modérée entre les populations au sein de l'échantillonnage total, l'analyse par comparaison deux à deux de chacune d'elles montre qu'il n'y a aucune différenciation génétique apparente entre elles, excepté pour les populations présentes sur substrat volcano-sédimentaire (Mt Arama et Mt Nindo) qui se différencie génétiquement des autres populations sur substrat ultramafique.

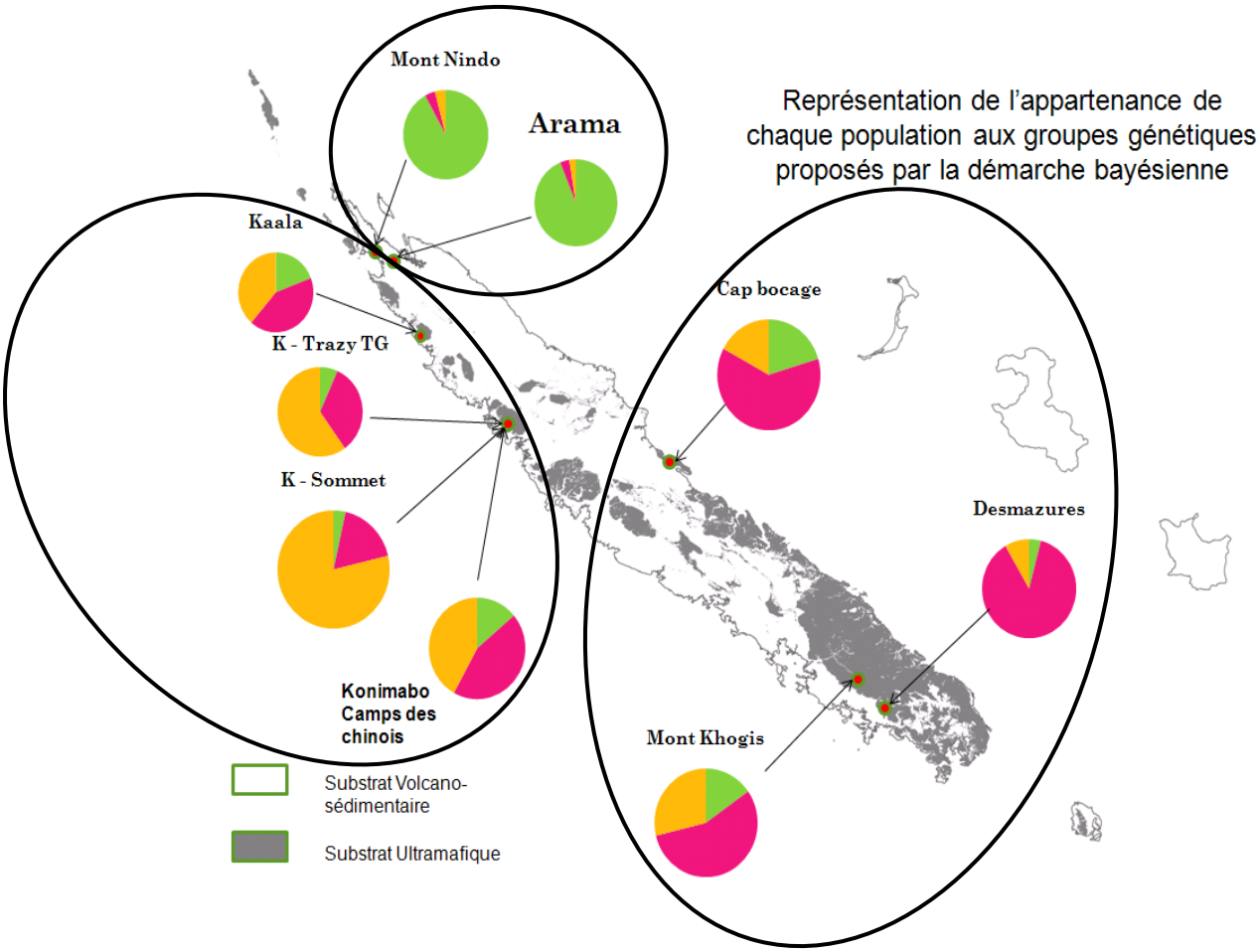


Figure 125 : Représentation de l'appartenance de chaque population aux groupes génétiques proposés par la démarche bayésienne

L'approche bayésienne elle, laisse apparaître trois groupes distincts (Fig. 125). Un premier regroupant les individus présents en substrat volcano-sédimentaire, un deuxième groupe qui rassemble principalement les individus du Konimabo, et un dernier groupe réunissant les autres populations.

Enfin, le test de Mentel, réalisé sur les individus présents sur substrat ultramafique, est lui aussi faiblement significatif en faisant apparaitre une faible structuration démarquant les populations du sud de celles de l'ouest.

Trois grands groupes de populations semblent être ainsi identifiés à l'échelle du territoire, d'une part en fonction des substrats fréquentés et d'autre part, de manière moins marquée, sur un axe sud ouest. L'aspect modéré de la structuration suggère l'existence d'importants brassages génétiques au niveau de l'aire de distribution des *T. calobuxus* en Nouvelle-Calédonie.

- **AMOVA**

L'analyse de variance (AMOVA) révèle une part de l'expression de la variabilité observée entre les populations de seulement 5,94% contre un pourcentage intra-populationnelle de 94,06. La diversité génétique pour l'espèce à l'échelle du territoire s'explique donc en grande partie par la part de diversité génétique abritée au sein même des populations et ne laisse qu'une faible part à ce qui différencie les populations entre elles.

6.2.1.2.4. Discussion et conclusion

La richesse allélique observée est élevée ce qui indique que la diversité génétique au sein de l'espèce *T. calobuxus* est importante. Cependant cette richesse varie selon les populations et surtout se trouve plus importante pour celles présentes sur substrat ultramafique que pour celles présentes sur substrat volcano-sédimentaire. De plus, la proportion des allèles diffère également selon les populations, certains allèles sont présents en proportion nettement plus importante dans les populations sur substrat volcano-sédimentaire. Il semble que certains génotypes soient plus disposés à un développement sur substrat volcano-sédimentaire plutôt qu'ultramafique. Inversement aux phénomènes de diversification et de préservation des espèces présentes sur substrat ultramafique (Jaffré *et al.*, 1987/1996), les deux populations présentes sur substrat volcano-sédimentaire semblent avoir subies des phénomènes de pression de sélection et d'adaptation sur leur milieu.

Les taux d'hétérozygotie et les valeurs de Fis nous montrent que certaines populations telles que Mont Nindo, Arama, Desmazures, Trazy Sommet et Cap Bocage suivent un mode de reproduction panmictique. Cela peut s'expliquer premièrement par la situation environnementale de ces populations. En effet, il existe une corrélation entre l'habitat dans lequel évoluent ces populations et leur mode de reproduction (Juan *et al*, 2009). Chacune d'elles se développe dans un milieu ouvert plutôt mono-spécifique donc favorable à des échanges de gènes. A *contrario*, Kaala, Koniambo Trazy TG, Camps des chinois et Monts Koghis révèlent un déficit en hétérozygotes. Leur mode de reproduction semble plus contraint. Là encore, en effet, ces populations sont installées dans des milieux fermés, enclavés et en situation multi-spécifique (mêlées à d'autres espèces de maquis). Dans ces situations l'échange de gènes peut être moins favorisé. Deuxièmement, le cycle phénologique de cette espèce peut être variable selon le lieu, l'année et les individus (L'Huillier *et al*, 2010). La période de floraison peut être temporellement décalée entre les individus de populations différentes mais aussi au sein d'une même population. Par conséquent le nombre de reproducteurs efficaces d'une population à un temps « t » n'est pas égal au nombre total de reproducteurs présents sur le site et est de fait restreint au nombre des plants qui admettent une période de floraison synchronisée entre eux. Leur effectif au temps « t » en est diminué ce qui peut être considéré comme une cause conjoncturelle de la réduction des flux de gènes.

Les variations observées dans cette partie de l'étude, ne sont pas assez significatives pour avoir une idée précise sur l'érosion de la diversité génétique des populations de milieux miniers. C'est pourquoi dans nos résultats, il ne semble pas que les populations étudiées subissent une érosion de la diversité génétique due à l'exploitation minière.

Les analyses de structuration montrent qu'il existe une structuration au sein de l'espèce *T. calobuxus*. La différenciation génétique qui est exprimée entre les populations, est faible mais néanmoins significative. Elle indique également que la haute diversité génétique admise au sein

de l'espèce s'exprime essentiellement à l'intérieur des populations et non entre elles, exception faite de la différenciation significative observée entre les populations d'une part de Mont Nindo et d'Arama, et d'autre part de l'ensemble des autres populations. Ce dernier résultat confirme qu'il existe une distinction marquée entre les populations présentes sur substrat volcano-sédimentaire et celles sur substrat ultramafique.

L'ensemble de ces résultats indique que le type de substrat est le principal facteur à l'origine de la structuration chez *T. calobuxus*.

Il existe également une structuration au sein des populations présentes sur substrat ultramafique. Effectivement le test de Mentel nous indique qu'il y a un isolement (très léger) par la distance de nos populations qui traduit un flux de gènes chez *T. calobuxus*. De plus, l'approche bayésienne sépare les populations de substrat ultramafique en deux groupes distincts (populations du Sud de la Grande-Terre et populations de l'Ouest de la Grande-Terre). L'isolement par la distance n'est pas le seul facteur de structuration il semble qu'il y ait également des facteurs liés aux conditions régionales. Le fractionnement des massifs ultamafiques à l'échelle du territoire pourrait expliquer cette différenciation entre les populations du Sud et celles de l'Ouest. Les terrains à substrat volcano-sédimentaire qui séparent les massifs ultramafiques pourraient se comporter comme des barrières physiques.

Malgré la légère structuration Sud/Ouest des populations présentent sur substrats ultramafiques, il existe néanmoins un réel partage d'allèles (flux de gènes) entre les deux groupes.

Cette étude permet la mise en évidence de trois groupes semenciers différents (sol et géographie) pour l'espèce *T. calobuxus*. Ce qui nous amène à émettre une recommandation importante en rapport avec la restauration, plus précisément avec les plantations qui pourraient être effectuées. Les individus à planter sur un site défini devront être issus de graines récoltées dans la zone semencière de rattachement de ce site (cf. groupes génétiques définis) ou sur des parcelles semencières spécifiques installées à ces fins.

6.2.2. TÂCHE 2 ET 3 : IDENTIFICATION DES DISTANCES DE POLLINISATION ET DE DISSÉMINATION DES GRAINES

6.2.2.1. Etude des flux de gène de Scaevola montana par l'étude des vecteurs

6.2.2.1.1. Acquisition de données

Quarante individus matures de *S. montana* appartenant à la population de la vallée de Tontouta, ont été suivis entre Juin 2009 et Octobre 2011. Par date de suivi, nous avons noté pour chaque plante si elle était en période de floraison quand elle avait au moins une fleur. La même règle a été appliquée pour la période de fructification. Trente séquences de 5 minutes ont été filmées en période de pics de floraison (entre Novembre et Décembre) sur 8 individus choisis au hasard. Ce suivi a été réalisé par des enregistrements vidéo utilisant le Sony® HD Handycam. Les observations ont été complétées par des observations de nuit afin d'identifier d'éventuels visiteurs nocturnes (5 h d'enregistrement vidéo avec détection infrarouge).

Pour déterminer le type de dispersion, nous avons suivi au pic de fructification, cinq individus pendant deux jours consécutifs avec une Focus Digital Wildlife Surveillance System (Faunatech® Australie). Les observations de terrain ont eu lieu aussi la nuit pour identifier les possibles dispersions nocturnes. Les matières fécales près des plantes de *S. montana* appartenant à un oiseau ont été recueillies. Le contenu de ces matières fécales a été étudié afin de déterminer si nous pouvions trouver des restes de graines. Vingt et une fèces ont été

recueillies et étudiées en 2010, trente-sept en 2011.

6.2.2.1.2. Résultats

Pollinisation

En ce qui concerne *S. montana*, l'*Apis mellifera* (Fig. 126) exogène était le visiteur le plus important. D'autres visiteurs tels que deux espèces de diptères (Bombyliidae) et deux espèces d'hyménoptères

(Halictidae) ont été observés. Certaines autres espèces ont été observées sur les fleurs, mais pas pendant le pic de la floraison (leurs visites ne seront pas prises en compte). Aucun visiteur n'a été observé pendant la nuit.



(Photo S. Cazères et C. Milles)

Figure 126 : Visiteur des fleurs de *S. montana*, *Apis mellifera* (Apidae)

De la consanguinité a été relevée chez *S. montana*. Ceci peut être expliqué par la présence d'allèles nuls (un hétérozygote apparaît comme un homozygote à cause d'une anomalie d'amplification). En effet, deux loci présentaient des déficits en hétérozygote plus importants que les autres. L'autogamie peut être écartée comme l'a montré l'étude du système de reproduction de cette espèce.

Toutefois, on ne peut mettre de côté la geitonogamie[1] ou alors une forte similitude génétique des parents. Il est aussi possible de lier ce phénomène aux comportements et à l'identité mêmes des pollinisateurs. En effet, il est fort probable que l'introduction de l'abeille domestique en Nouvelle-Calédonie qui date de 1848 (Lamaignere, 2001) ait fortement changé les flux de gènes entre les individus et les populations de plantes à fleurs sur le territoire. Cette espèce qui s'est révélée être le principal pollinisateur de *S. montana* a aussi un impact sur de nombreuses autres espèces du maquis minier. En effet, il a été montré qu'*Apis mellifera* a fortement perturbé certains types de mutualisme de pollinisation d'espèces qui étaient initialement effectuées par des abeilles solitaires indigènes (Kato & Kawakita, 2004).

Dissémination des graines

Les fruits de *S. montana* sont charnus allant du noir à la couleur bleu (Fig. 127), qui suggère une probable dispersion par les animaux. Aucun animal consommant les fruits de cette espèce n'a été observé de jour comme de nuit. Cependant des fientes trouvées à proximité des individus de *S. montana* attribuées à *Columba vitiensis ssp. hypoenochroa* (Columbidae) (la

[1] *Gynécée fécondé par un pollen d'une autre fleur du même plant.*

nature du disperseur a été déduite en fonction de la taille des fientes et des animaux présents sur la zone), ont permis de statuer sur la dissémination zoochore de *S. montana*. Cet oiseau peut véhiculer des graines sur de longues distances, tout comme une autre espèce de la même famille, *Ducula goliath* (Columbidae), pouvant disperser des graines jusqu'à 800 m de la plante mère (Munzinger, unpublished data).

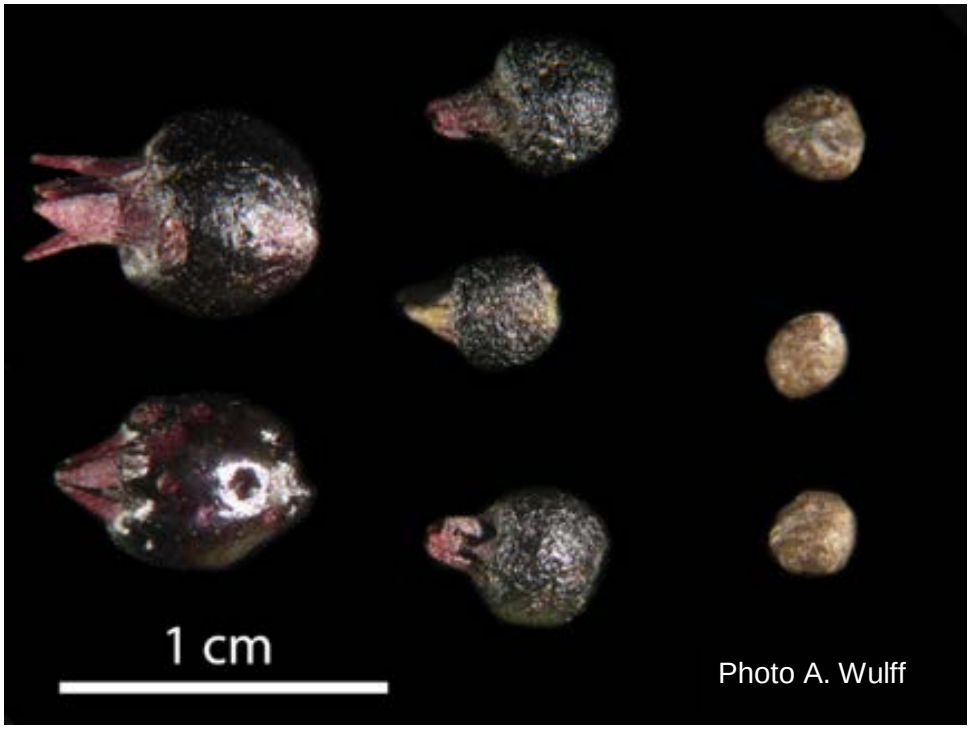


Figure 127 : Fruits et endocarpes de *Scaevola montana*

In fine, des observations simples effectuées sur la biologie de la reproduction de *S. montana*, il a été possible de définir ses modes de pollinisation et de dissémination de graines. Les distances qui y sont liées peuvent en être déduites *via* l'étude bibliographique sur les vecteurs considérés. Cette première approche a permis d'avoir une idée des possibles flux de gènes entre les populations de *S. montana* et de fait, de mieux orienter les priorités de gestion de leurs environnements en prenant en compte notamment l'écologie des vecteurs de flux impliqués.

6.2.2.2. Etude de descendance pour T. calobuxus (flux de gènes par pollen)

6.2.2.2.1. Echantillonnage

- **Echantillonnage terrain**

Une parcelle de 10 ha a été délimitée sur le site du Col de Mouirange.

Dans un premier temps, 20 pieds-mères ont été identifiés au sein de cette parcelle d'étude, et échantillonnés. Lors de la période de fructification, environ une centaine de fruits a été récoltée. Dans un deuxième temps, un échantillonnage de 250 adultes reconnus reproducteurs par la présence de fruits, et de 220 juvéniles, a été fait (Fig. 128).

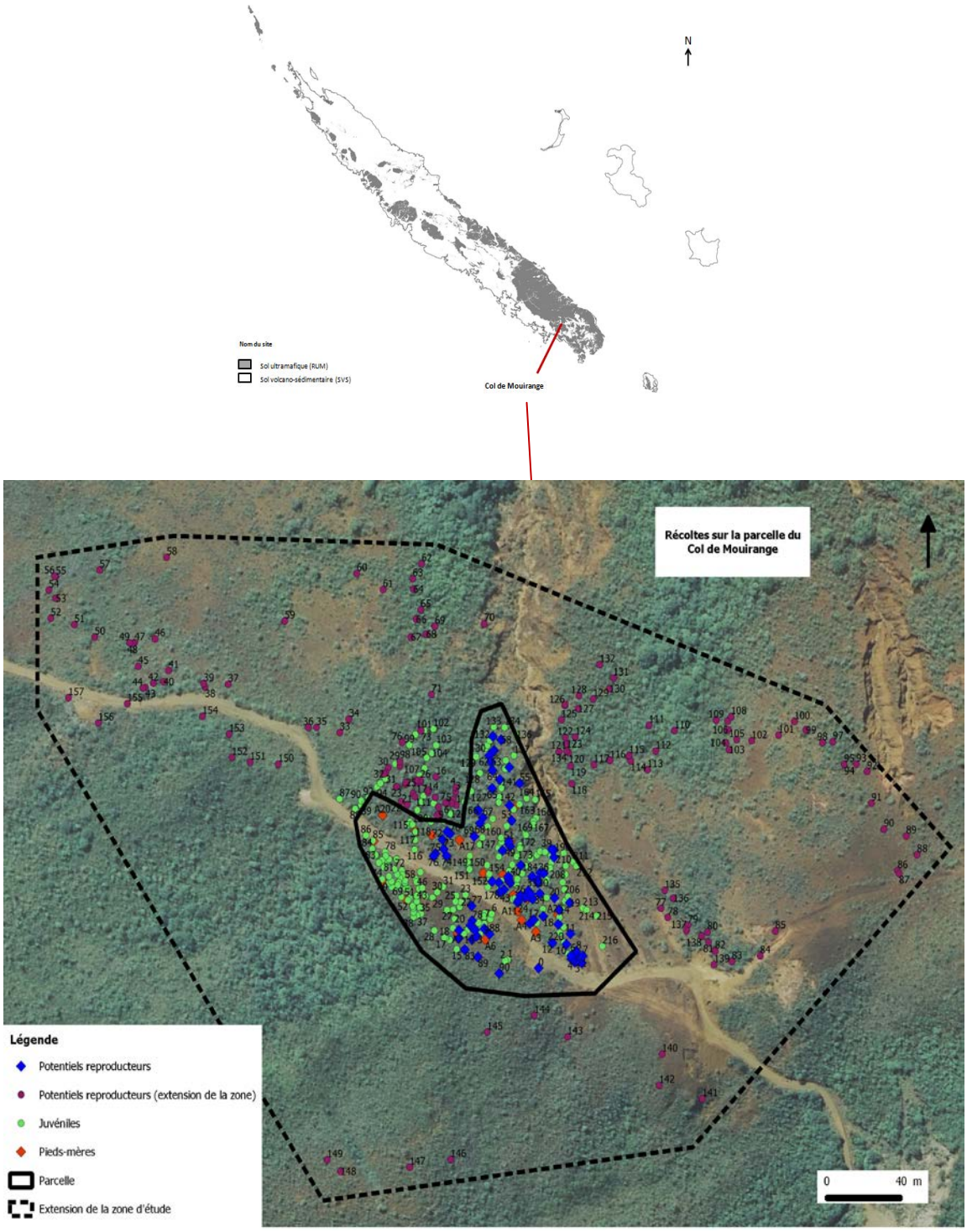


Figure 128 Récoltes des individus (pieds-mère, adultes et juvéniles) de la parcelle du Col de Mouirange

Grâce à l'étude sur la diversité génétique de *T. calobuxus* qui a été menée à l'échelle du territoire (cf. & 1 b et 3), 180 individus, répartis sur 16 sites, ont pu être intégrés dans l'étude de descendance (Fig. 129).

Chaque feuille prélevée a été mise en sachet en présence de billes de gel de silice et chaque individu a été géo-référencé par un point GPS.

Les feuilles sont ensuite traitées au laboratoire de la Plate Forme du Vivant (PFV) de Nouméa.

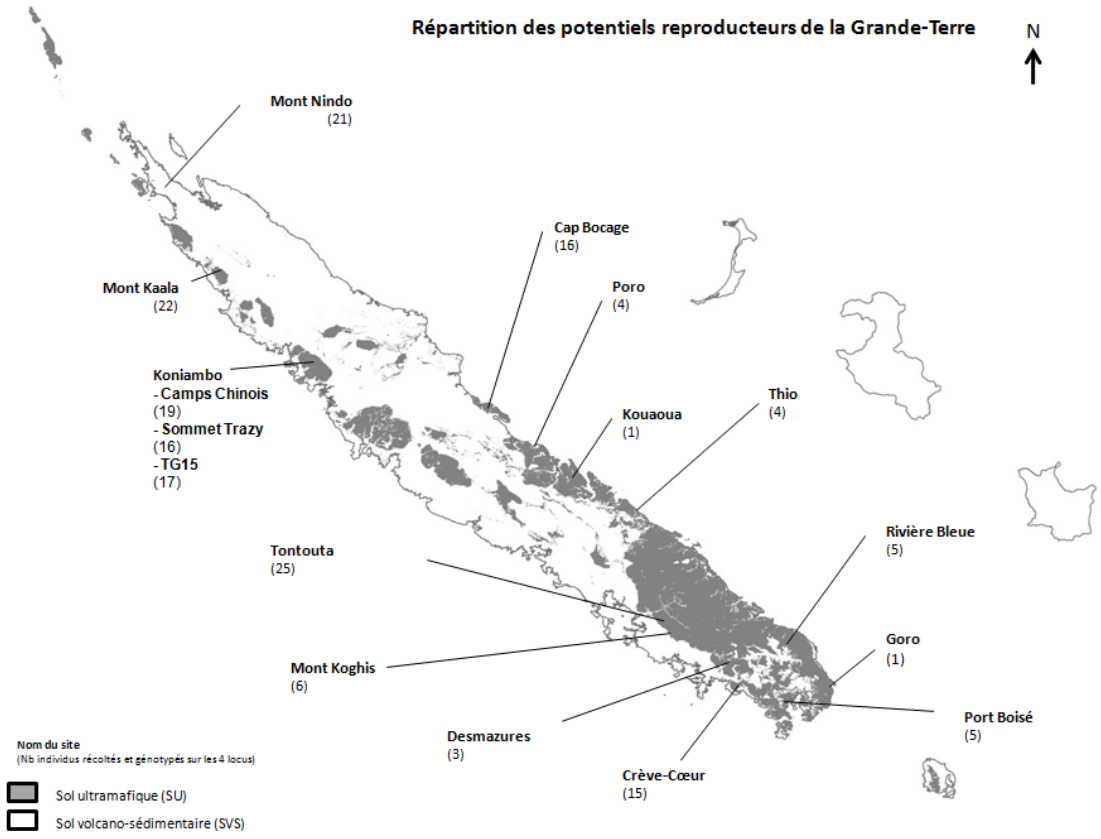


Figure 129 : Répartition des potentiels reproducteurs intégrés à l'étude

Echantillonnage pépinière

Les graines des fruits récoltés ont été semées en vrac dans des bacs. Une fois levés, les plantules de trente descendants par pieds-mère sont prélevées et traitées au laboratoire de la PFV de Nouméa pour analyse de génotypage.

6.2.2.2.2. Acquisition de données en laboratoire et analyses

La caractérisation des relations d'apparentement entre individus a été réalisée grâce à l'outil microsatellite. En effet, les microsatellites sont de courtes séquences d'ADN très variables, composés de motifs de nucléotides répétés admettant un fort taux de polymorphisme et étant co-dominants. Ils peuvent se révéler être spécifiques d'une espèce, ou partagés entre espèces phylogénétiquement proches. D'où leur utilisation dans cette étude, afin d'estimer la filiation entre les individus (partage d'allèles identiques).

Choix des microsatellites

Pour cette partie d'étude les mêmes marqueurs microsatellites précédemment utilisés pour l'étude sur la diversité génétique de *T. calobuxus* ont été retenus, à l'exception du locus D03 qui dans certains cas d'amplifications admettait dans les profils obtenus des artéfacts néfastes à leur bonne lecture.

Extraction d'ADN et PCR

Les techniques utilisées sont les mêmes que celles décrites en Tâche 1.b.

- **Génotypage des individus**

Les techniques utilisées sont les mêmes que celles décrites en Tâche 1.a.

- **Lecture des données**

Les techniques utilisées sont les mêmes que celles décrites en Tâche 1.a.

- **Analyse des données**

  - ***- Diversité génétique de la population étudiée***

Des analyses classiques de génétique des populations (fréquences alléliques, indices de diversité, indices de distance génétique, …) ont été conduites à partir des profils alléliques individuels obtenus. Les résultats donnent une information sur la structuration de la population et sa diversité génétique.

  - ***- Distance de pollinisation et dissémination des graines***

L'analyse de parenté est réalisée avec le logiciel Cervus (Marshall et al., 1998). C'est un programme destiné aux analyses de parenté à grande échelle utilisant des marqueurs co-dominants. Les analyses se basent sur les rapports de vraisemblance (LOD score) entre présence de lien, ou absence de lien, pour des parents potentiels avec une descendance identifiée. Les valeurs s'acquièrent par la comparaison des profils alléliques pour identifier le parent, ou le couple de parents, le plus probable dans le cas où les génotypes d'un groupe de descendants et d'un groupe de parents potentiels sont connus. Plus le chiffre obtenu est grand, plus la probabilité de parenté de ces individus est forte.

6.2.2.2.3. Résultats

- **Echantillonnage pépinière**

Il n'a pas été possible d'obtenir systématiquement 30 descendants pour chacun des 19 pieds-mère retenus. Au total ce sont 526 descendants qui ont pu être prélevés.

- **Acquisition de données en laboratoire et analyses**

Au total, 935 individus ont été génotypés sur les quatre loci microsatellites (19 pieds-mères, 85 adultes reproducteurs de la parcelle, 143 adultes reproducteurs en extension de la parcelle, 196 juvéniles récoltés sur le terrain et 492 descendants).

- **Analyse des données**

  - ***Diversité génétique de la population étudiée***

Diversité génétique et fréquences alléliques

Le nombre d'allèles par locus en fonction des individus analysés est présenté dans le Tableau 30. On constate que les quatre loci (E05/B03/B06/A10a) présentent entre 18 et 27 d'allèles ce qui souligne un très fort polymorphisme. Le résultat des fréquences alléliques est présenté dans la figure 130.

Tableau 30 : Récapitulatif du nombre d'allèles par locus

Nb allèles / locus	Nb d'individus	E05	A10a	B03	B06	Moyenne du nb d'allèles	Nb moyen d'allèles avec une fréquence supérieur à 5%
Tous les individus	1115	28	17	25	26	24	7.5
Individus de la parcelle et de la Grande-Terre	623	28	16	25	26	23.75	8.5
Individus de la parcelle	443	22	16	23	24	21.25	8.25
Individus de la parcelle + pépinière	935	24	17	24	24	22.25	7.5

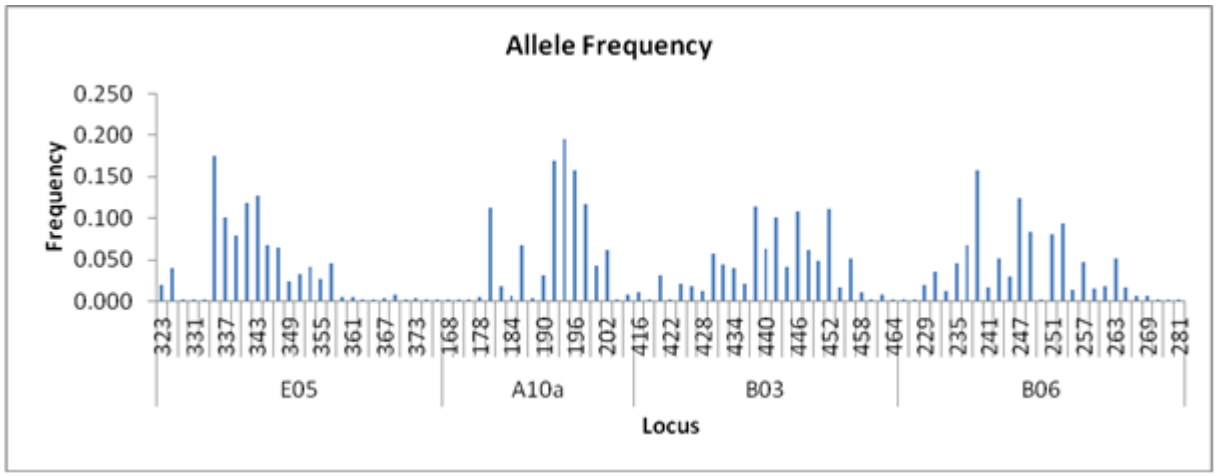


Figure 130 : Les fréquences alléliques par locus de tous les individus

La totalité des 4 loci admet en moyenne plus d'une vingtaine d'allèles différents. Mais seulement une petite dizaine de ces allèles (entre 7.5 et 8.5) sont largement répandus dans la population (avec une fréquence supérieure à 5%).

D'une manière générale, on considère qu'un allèle est qualifié de rare lorsque sa fréquence avoisine les 0,1‰. Ainsi, d'après le Tableau 31 sur l'ensemble des 4 loci et des individus étudiés, 6 des allèles trouvés, sont des allèles "rares".

Tableau 31 : Les allèles rares par locus

Nb allèles rare / locus	E05	A10a	B03	B06	Nb total d'allèles rares	% d'allèles rares
Tous les individus	2	1	1	2	6	6.25%
Individus de la parcelle et de la Grande-Terre	2	0	1	2	5	5.26%
Individus de la parcelle	4	3	1	1	9	10.59%
Individus de la parcelle + pépinière	4	2	0	1	7	7.78%

De plus, le test "Matches Multilocus" de GenAlex indique que chaque individu a un profil génétique unique grâce à la combinaison des quatre loci microsatellites utilisés. Les marqueurs sélectionnés pour cette étude se révèlent donc encore une fois assez polymorphes pour permettre l'identification individuelle de l'ensemble des individus concernés par l'étude.

⊙ *Structuration de la population*

Avant de procéder à une étude de descendance, nous avons voulu observer la structuration au sein de la population afin de définir si la population se structurait suivant les classes d'âge (adultes et juvéniles) ou non. Les résultats obtenus mettent en évidence une structuration (Fig. 130), non fondée sur les classes d'âge mais par contre liée aux distances géographiques. Effectivement, les individus apparaissent groupés en deux clusters (Fig. 131) : les individus au centre de la parcelle et les individus à la périphérie de la parcelle. Les individus du centre de la parcelle sont plus proches génétiquement les uns des autres que des individus en périphérie, et inversement.

Cette population, implantée sur un site subissant des impacts dû à l'anthropisation, notamment par la présence de voies de communication, ne semble pas être pour autant marquée par une dépréciation de son capital de diversité génétique au cours des différentes générations d'individus qu'elle admet.

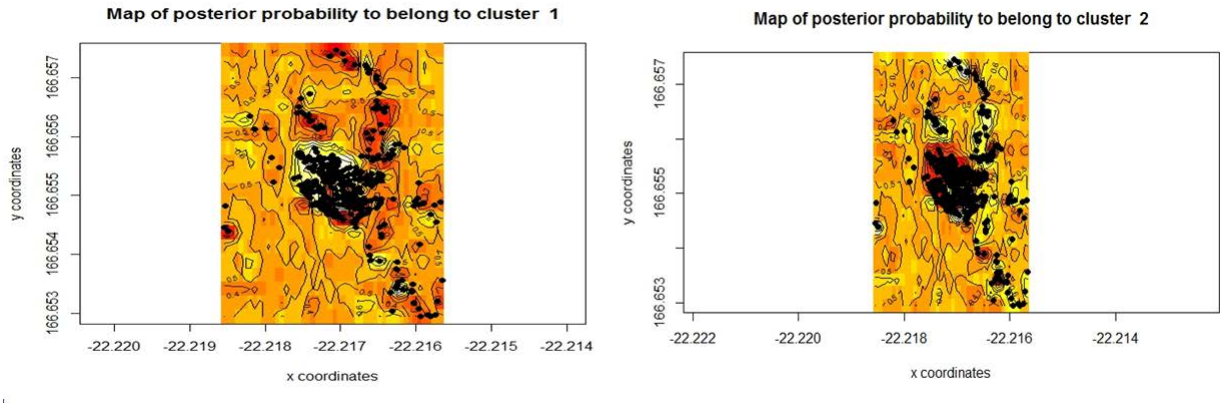


Figure 131 : étude de structuration de la population de *T.calobuxus* de la parcelle du col de Mouirange

⊙ *Pollinisation - Etude de descendance (analyse de paternité)*

T. calobuxus est une plante monoïque, la reproduction par autofécondation y est possible. Cependant au vue des résultats sur l'étude de la diversité génétique, cette éventualité est globalement peu probable. Car si cela avait était le cas il y aurait eu une diversité et un taux d'hétérozygotie amoindris. En outre, l'autofécondation n'est pas systématique chez les plantes monoïques. Il existe en effet de nombreux systèmes de barrières à ce phénomène (phénologie étalée dans le temps, barrières anatomiques ou incompatibilité génétiques). Ce type de barrière a été démontré chez d'autres Myrtaceae comme chez *Acca sellowiana* (Finatto et al., 2011) et *Kumzea pomifera* (Page et al., 2010), où les résultats obtenus traduisent davantage un mode de reproduction allogame. Dans cette étude, on considèrera le mode de reproduction de cette espèce comme allogame.

L'analyse de paternité assigne 201 descendants, sur l'ensemble des 492 descendants répertoriés (soit 40,85%), à au moins un père potentiel qu'il soit dans la parcelle ou hors parcelle (Tab. 32). La répartition géographique de ces pères reconnus admet 37% des pères locaux (de la parcelle), et 63% hors parcelle.

Tableau 32 : Récapitulatif des résultats de l'étude de descendance

Nombre de descendants…			
… total	… assigné à au moins un père potentiel	**… assigné à au moins un père potentiel de la parcelle (descendant local)**	… assigné à au moins un père potentiel de l'échantillonnage hors parcelle
492	201	**182**	19
100%	40.85%	**36.99%**	3.86%

Le choix d'intégrer des pères potentiels hors de la parcelle, à de longues distances, permet de mettre en évidence le cas échéant un brassage conséquent des gènes à l'échelle du territoire et la possible existence de flux de gènes sur de longues distances (Fig. 132). Il est important de souligner que ces pères potentiels, à longue distance, ne sont pas forcément les vrais géniteurs, d'autres pères potentiels moins éloignés peuvent exister, mais ils n'ont pas été échantillonnés. Dans l'exemple mis en évidence pour cette étude, le potentiel père le plus éloigné se trouve au Mont Kaala (environ 300 km).

Chaque père potentiel de la parcelle a été relié sur la figure 133 aux pieds-mères auxquels il a été assigné afin de déterminer la distance de pollinisation.

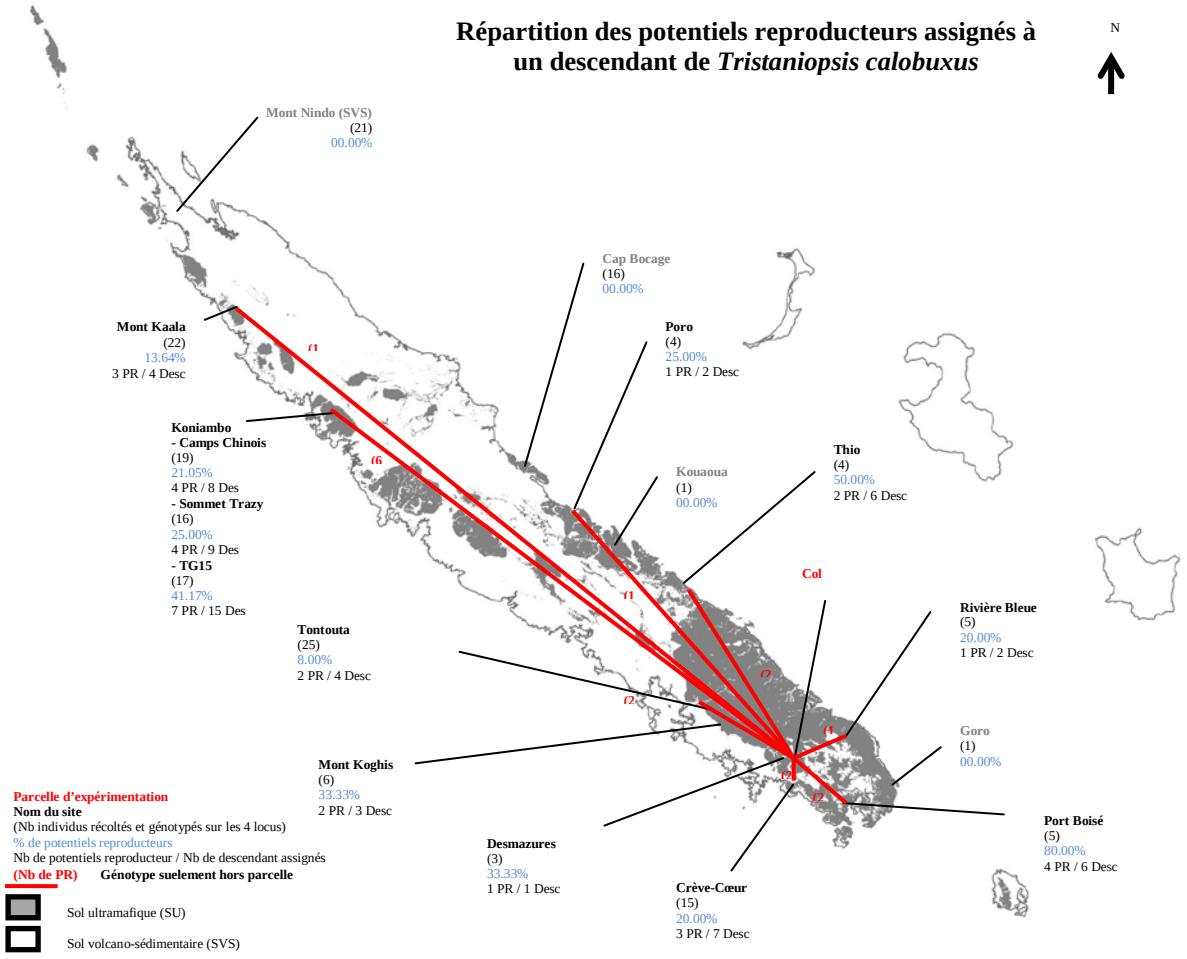


Figure 132 : Répartition des pères potentiels présents hors de la parcelle d'étude

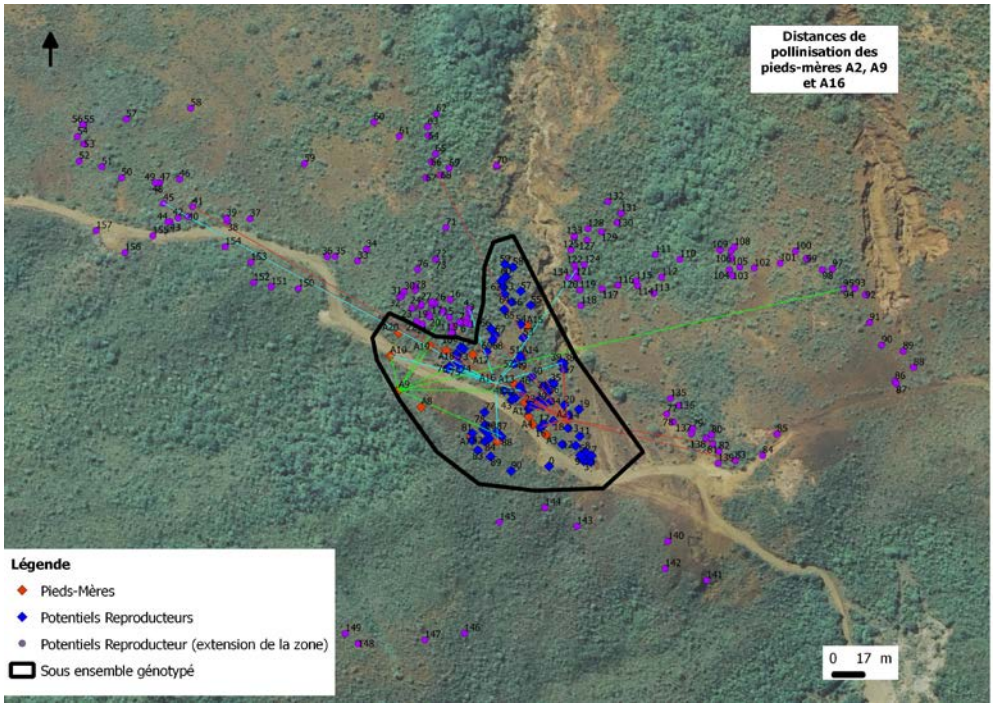


Figure 133 : Exemple de distances géographiques de pollinisation par pieds-mère

La distance moyenne de pollinisation, au niveau du groupe des pères potentiels de la parcelle est de 51,89 mètres avec un écart-type de 33,99 m. La distance maximum observée est de 287,12 m, soit la longueur de la parcelle (Tableau 33 :). Il faut noter que ces distances ne sont pas très significatives puisque 40% des descendants ont un géniteur pollinique qui se trouve à l'extérieur de la parcelle.

Tableau 33 : Distances de pollinisation moyenne par pieds-mères

PM	Distance moyenne / PM	Ecartype	Distance maximale au sein de la parcelle
A1	34.40	14.96	66.76
A2	64.15	55.60	259.76
A3	48.70	27.08	80.45
A4	38.58	17.56	77.31
A5	10.22	8.28	25.90
A6	68.35	52.44	287.12
A7	54.96	27.75	137.41
A8	81.77	27.88	172.88
A9	74.49	51.55	254.91
A10	65.58	35.58	221.65
A12	46.54	44.68	197.81
A13	44.32	15.74	66.65
A14	44.97	30.74	183.28
A15	49.64	32.17	152.55
A16	55.61	37.84	214.21
A17	61.02	35.78	145.49
A18	39.05	21.01	68.18
A19	34.90	24.59	88.32
A20	37.44	19.79	85.60
Moyenne total	51.89	33.99	287.12

On observe que seulement 16% des pieds-mères ont plus de 50% de leurs descendants qui ont été assignés à un potentiel père de la parcelle (Fig. 134 et Tableau 34). La moitié des pieds-mères ont moins de 30% de leur descendance assignée.

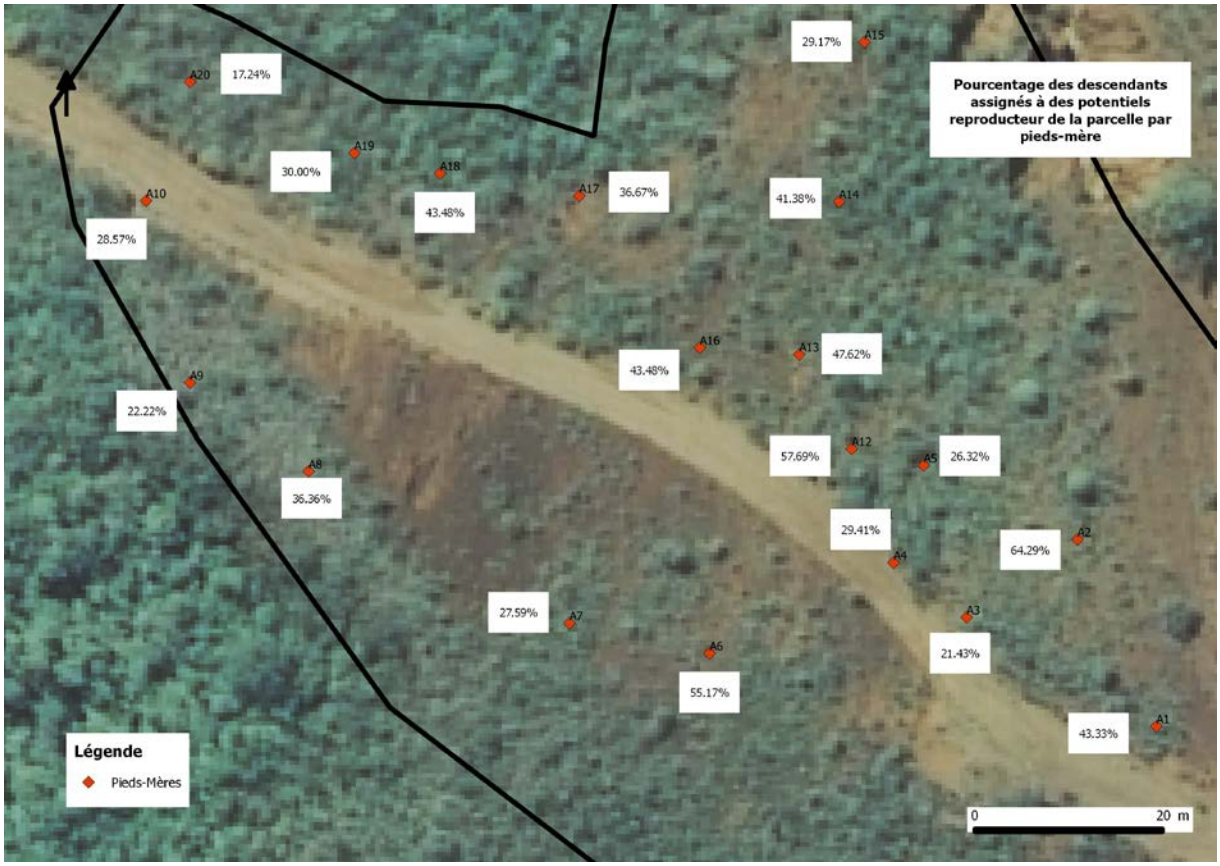


Figure 134 : Pourcentage par pieds-mères des descendants assignés à des pères potentiels hors ou dans la parcelle.

Tableau 34 : Pourcentage par pieds-mères des descendants assignés à des pères potentiels

% des descendants assignés à des potentiels pères	Nb de pieds mères dans la catégorie
0 à 30 %	9
30 à 50 %	7
50 à 60 %	3

Le constat précédent pourrait remettre en question l'effort d'échantillonnage des potentiels reproducteurs. En effet, un échantillonnage trop faible pourrait expliquer un faible pourcentage d'individus assignés. Or, la courbe du cumul des potentiels reproducteurs intra-parcelle en fonction de la distance au pied-mère, montre bien une saturation des effectifs qui suggère, elle, plutôt un bon effort d'échantillonnage (Fig. 135A). En extrapolant cette courbe aux parcelles voisines distantes de 200m et 300m (Fig. 136), et plus encore, son profil devrait évoluer vers une incrémentation au niveau du cumul qui amènerait, à terme, à retrouver les 492 pères impliqués (Fig. 135B).

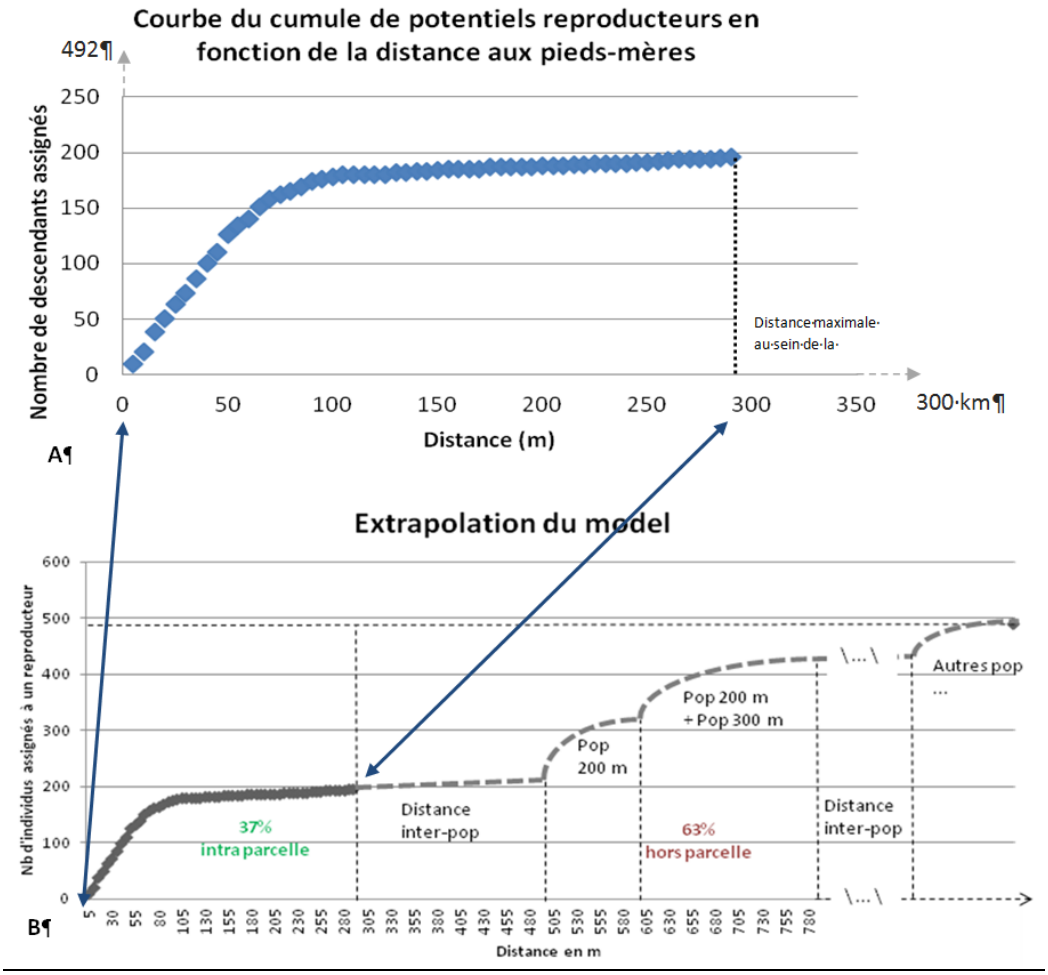


Figure 135 : Populations de *Tristaniopsis calobuxus* les plus proches de la parcelle.

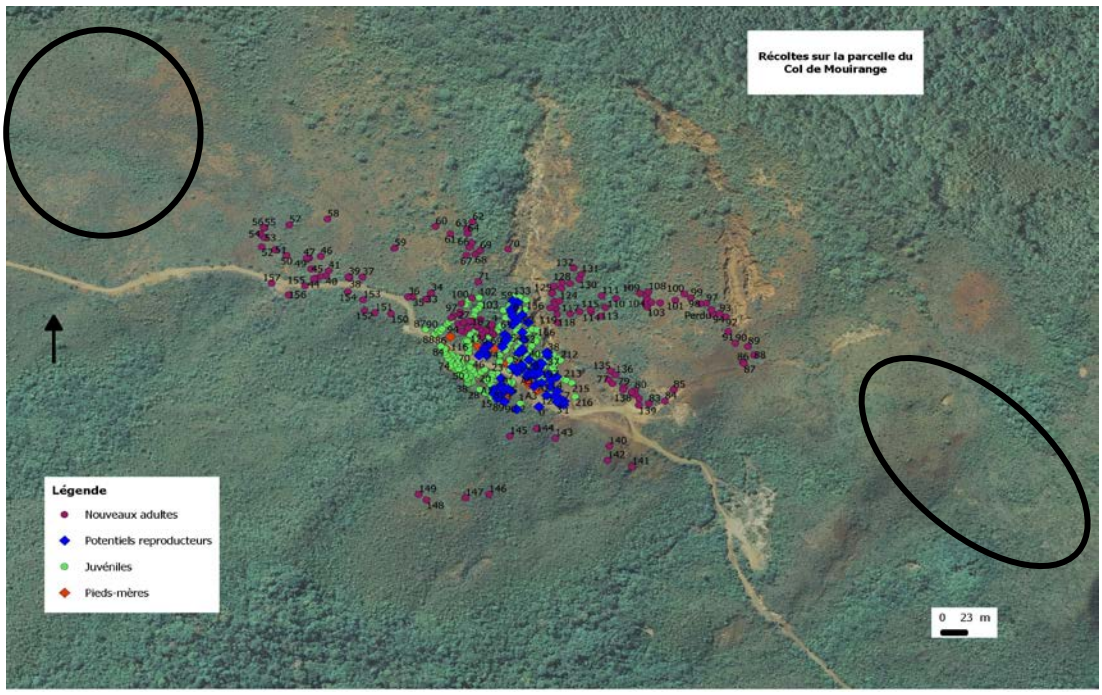


Figure 136 : Populations de *Tristaniopsis calobuxus* les plus proches de la parcelle.

- ***Dissémination** des graines - analyse de parenté*

L'analyse de parenté (Tableau 35) assigne à 42 juvéniles, sur les 195 analysés, soit 21,54% (≈ 1/5^{e} des juvéniles), un couple de parents de la parcelle, ce qui fait d'eux des juvéniles « locaux ».

La grande majorité des juvéniles relève donc d'un statut de mixité impliquant un parent de la parcelle avec un autre de l'extérieur, ou d'un statut d'entrants (issus de deux parents hors parcelle). Les résultats montrent également qu'il n'a pas été possible d'assigner de parents à 37 d'entre eux et que pour 7 autres un parent a bien été assigné mais à l'extérieur de la parcelle. Il y a donc 44 juvéniles (=37+7), soit 22,56% de tous les juvéniles (un peu plus d'1/5^{e}), qui sont issus de parents extérieurs à la parcelle, des entrants. Enfin, par déduction comme par calcul, 109 juvéniles (=151-42 ou =195-44-42), soit 55,9% (une grosse moitié) sont issus de croisement d'un parent de la parcelle avec un autre parent hors parcelle, « mixte ».

Tableau 35 : Résultat de l'analyse de parenté

Nb total de juvéniles	**195**	**100.00%**
Nb juvéniles assignés à un couple de Parent Potentiel (PP)	50	25.64%
Nb juvéniles assignés à un couple de PP de la parcelle	**42**	**21.54%**
Nb juvéniles assignés à un couple de PP (hors parcelle+parcelle)	7	3.59%
Nb juvéniles assignés à un couple de PP hors parcelle	1	0.51%
Nb juvéniles assignés à 1 PP	158	81.03%
Nb juvéniles assignés à 1 PP de la parcelle	**151**	77.44%
Nb juvéniles assignés à 1 PP hors parcelle	**7**	3.59%

Ces derniers résultats sont à rapprocher avec ceux de l'analyse des distances de pollinisation où plus de la moitié (63%) des descendances admettaient un statut « mixte ».

L'ensemble suggérant, là aussi, l'existence de grands brassages de gènes sur de larges aires géographiques.

Enfin, le géo-référencement des juvéniles permet de constater l'inexistence d'organisation particulière au nive*au* de leur assignation dans la parcelle (Fig. 137).

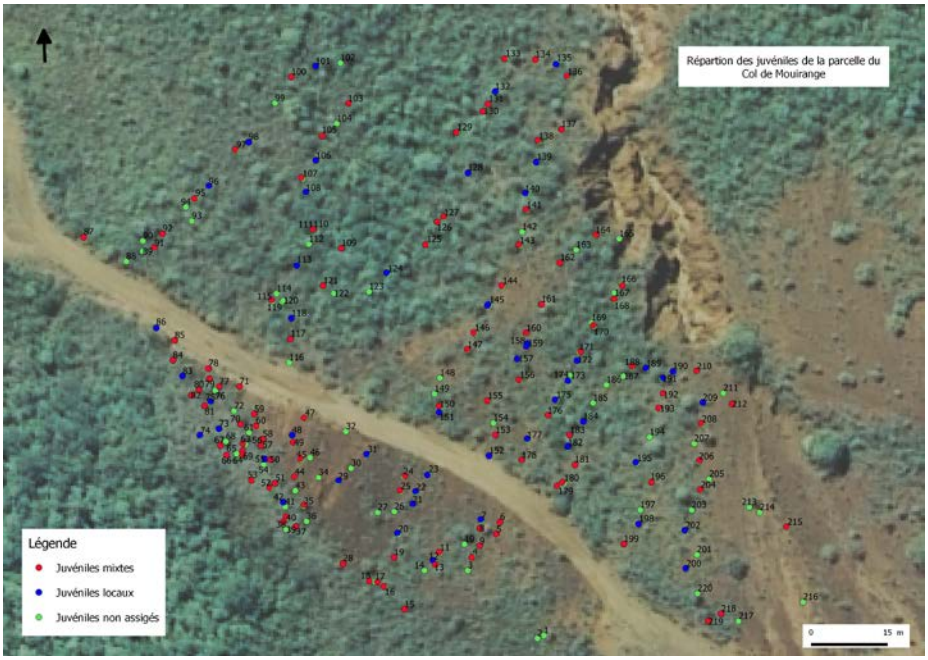


Figure 137 : Distribution à l'échelle de la parcelle de la dissémination des graines

Afin de déterminer les distances de dissémination des graines, chaque juvénile assigné, a été relié à ses potentiels parents. La distance moyenne de dissémination des graines au sein de la parcelle est de 87,04 m avec un écartype de 62,64 m et une distance maximale d'environ 300 m (Tableau 36).

Tableau 36 : Distance moyenne de dissémination des graines des individus locaux

Dissémination au sein de la parcelle		
Distance moyenne (m)	**Ecartype (m)**	**Distance maximale (m)**
87.04	**62.64**	**299.12**

Pour exemple, et à partir de notre jeu de données très incomplet en ce qui concerne les individus hors parcelle, le couple de parents potentiels admettant une distance géographique entre eux la plus grande possible, est Tontouta-Houaïlou (100 km) (Fig. 138).

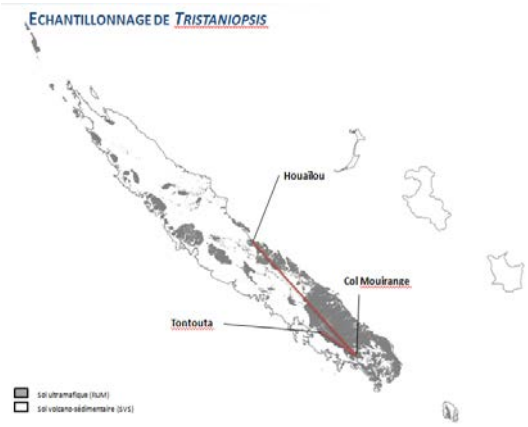


Figure 138 : carte de positionnement Tontouta-Houailou

6.2.2.2.4. Discussion et conclusion

Les populations de *T. calobuxus* des milieux ultramafiques néo-calédoniens admettent une grande diversité génétique, sans pour autant être fortement structurées en fonction des distances qui les séparent à l'échelle du territoire. Le caractère commun de cette espèce au sein des maquis miniers, ainsi que les forts potentiels de pollinisation et dissémination à plus ou moins longues distances (flux de gènes) qui la caractérisent, supportent ce dernier résultat, et ce malgré les fracturations géographiques (fragmentation des massifs ultramafiques) et géologiques existantes (hétérogénéité des substrats ultramafiques *versus* non ultramafiques). De plus, pour les populations testées, aucune dégradation significative des niveaux de diversité génétique entre génération n'a pu être observée. Ce qui est aussi à rattacher à une forte circulation des flux de gènes entre populations de *T. calobuxus*.

Pour preuves et en fonction des analyses conduites au sein de la population de *T. calobuxus* du Col de Mouirange, ≈2/5^{ième} de la production de graines récoltées ont été fécondés par des reproducteurs de la parcelle, ce qui fait que la descendance qui en est issue est à 100% locale. Les autres ≈3/5^{ième} des descendants ont eux un père provenant de l'extérieur de la parcelle, ce qui suggère de la pollinisation à plus longue distance. Au sein même de la parcelle, des flux de pollen ont pu être identifiés avec des distances de 300 m entre les pieds parents. L'étude de dissémination des graines quant à elle met en évidence que les juvéniles de la parcelle sont à seulement ≈1/5^{ième} d'origine locale, pour une grosse moitié mixte (un parent local et un autre provenant de l'extérieur), et pour le reste, ≈1/5^{ième}, des entrants.

Ces résultats informent eux aussi sur le fort pouvoir de pollinisation et de dissémination des graines de cette espèce. L'ensemble est en cohérence avec l'étude de diversité qui démontrait un fort brassage génétique entre les populations. Au vu de la faible structuration génétique de *T. calobuxus*, il n'est pas surprenant de trouver des parents potentiels géographiquement éloignés. Notons à titre indicatif, qu'aucun individu présent sur substrat volcano-sédimentaire n'a été reconnu comme un potentiel parent pour les juvéniles et plants issus des levées de semences étudiées.

Les modes de pollinisation et de dissémination des graines (ailées et légères) de *T. calobuxus* sont tous deux sujets au vent (anémophile et anémochore). Ces modes sont réputés pour pouvoir s'exercer sur de longues distances. D'un point de vue dissémination cela permettrait également de limiter la compétition entre individus et de favoriser le brassage génétique par échanges de graines entre populations, ou de créer de nouvelles populations en colonisant des milieux libres en *T. calobuxus*. Ce qui a pu être observé au cours de l'étude, avec la présence sur le terrain de juvéniles isolés à plus d'une centaine de mètres d'un pied adulte. De plus, le cycle phénologique de cette espèce est très variable suivant les lieux, les années et les individus. En général, la floraison et la fructification sont étalées tout au long de l'année (Dawson, 1992).

6.2.2.3. Etude démographique à l'échelle du site

Une étude démographique de la population de *T. calobuxus*, a été réalisée afin de compléter les recommandations issues de ce rapport. Cette étude a permis de mettre en évidence la taille minimum des juvéniles à planter afin d'avoir un bon pourcentage de survie au champ.

6.2.2.3.1. Méthodologie d'échantillonnage

Trente parcelles de 9m² ont été déterminées sur trois milieux différents (ouvert, semi-ouvert et fermé), localisées par un point GPS au centre (Fig. 139). L'inventaire des *T. calobuxus* a été réalisé dans chacune des parcelles et les individus sont classés en fonction de leur taille.



Figure 139 : Répartition des parcelles de 9 m² de *Tristaniopsis calobuxus* en fonction des

milieux.

D'après la littérature, un fruit contient 15 à 30 graines, 80 à 90% de ces graines sont vides (sans ovule) ou parasitées, et 90% des graines restantes pourront germer (L'Huillier *et al.*, 2010) (Tab. 37).

Tableau 37 : Résumé littérature sur la germination de *Tristaniopsis calobuxus*

Bibliographie Germination		
Nb graines dans 1 fruit	De 15	à 30
Graines vides/parasitées -(80-95%)	0,75	6
Germination (90%)	0,675	5,4

6.2.2.3.2. Résultats

Les résultats de l'inventaire sont présentés dans le Tableau 38. Une moyenne des 10 parcelles suivant les trois milieux différents a été calculée, ainsi qu'une moyenne des 3 milieux et la part de chaque catégorie de taille par rapport au total des *T. calobuxus* présents sur la parcelle.

Les résultats montrent (Tableau 38) que les individus de moins de 3 cm représentent entre 25% (milieu ouvert) et 70% (milieu fermé) des individus de la parcelle. Les individus adultes (à partir de 50 centimètres) représentent 16,22% des individus en milieu ouvert, 13,26% en milieu semi-ouvert, et 0,58% en milieu fermé. La comparaison des effectifs du nombre de graines germées à ceux d'adultes, met en évidence une différence entre la survie des individus en fonction des milieux fréquentés. Ainsi, 62,50% des individus arrivent au stade adulte en milieu ouvert, 31,36 % en milieu semi-ouvert et seulement 0,81% des individus arrivent à s'établir en milieu fermé.

Tableau 38 : Résultats de l'inventaire des *T. calobuxus* en fonction de leur taille et de leur milieu

Moyenne des parcelles de 9m²		**Total MF**	**% part catégories**	**Total MSO**	**% part catégories**	**Total MO**	**% part catégories**	**Moyenne 3M**	**% part catégories**
Graines germées	**≤3 cm**	167,50	70,99%	36,78	42,30%	10,40	25,95%	71,56	59,14%
Juvéniles	**3 cm≤x≤15 cm**	57,30	24,28%	24,40	28,06%	12,93	32,26%	31,54	26,07
Jeunes plants	**15 cm≤x≤50 cm**	9,80	4,15%	14,24	16,38%	10,25	25,57%	11,43	9,45
Adultes	**50 cm≤x≤4 m**	1,36	0,58%	11,53	13,26%	6,50	16,22%	6,46	5,34%
TOTAL		235,96	100,00%	86,95	100,00%	40,08	100,00%	121,00	100,00%

Les effectifs chutent rapidement dans les 15 premiers centimètres (Fig. 140), de 97,90% dans le milieu fermé, 73,29% dans le milieu semi-ouvert, et de 63,19% dans le milieu ouvert, et il semblerait que la revégétalisation puisse être assurée à partir des pieds de 15 à 30 cm.

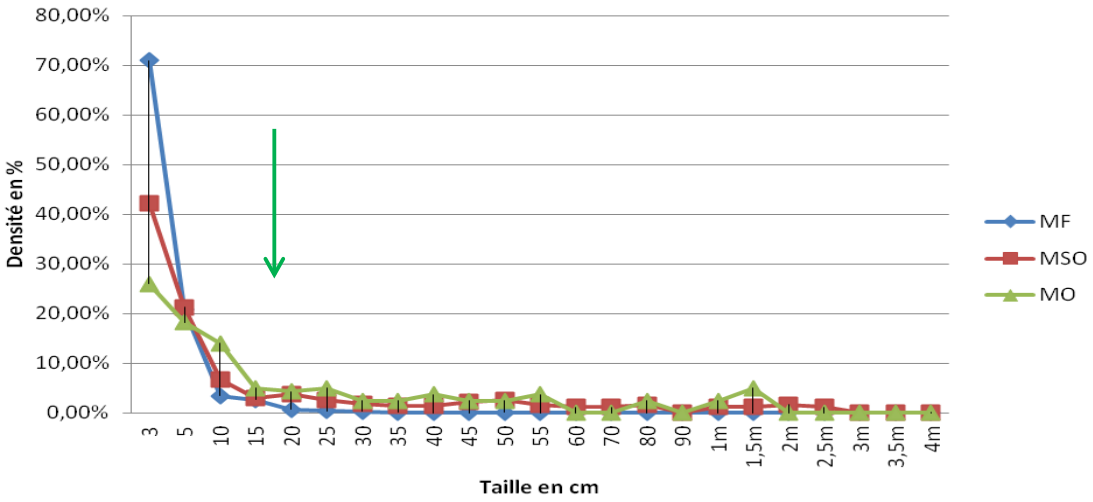


Figure 140 : Evolution de la densité de *T. calobuxus* en fonction de la taille et du milieu

A contrario des milieux fermés, dans les milieux semi-ouverts et ouverts, les plants de la taille préconisée semblent pouvoir se maintenir avec un bon pourcentage de survie au cours de leur croissance jusqu'au stade d'adultes (Tableau 39). La survie tend aux 100%, en milieux semi-ouverts et ouverts, pour des plants de 25 cm.

Tableau 39 : Survie des jeunes plants de 25 cm

Moyenne des parcelles /m²		Total MF	Total MSO	Total MO
Jeunes plants / m²	**25 cm≤x≤50 cm**	0,22	0,93	0,72
Adultes / m²	**50 cm≤x≤4 m**	0,12	1,28	0,72
% survie		55	100	100

6.2.2.3.3. Discussion et conclusion

Des résultats acquis, il ressort en premier lieu que les plants d'une taille inférieure à 25 cm subissent de lourdes pertes dans leurs effectifs et que les milieux fermés, là où il s'exerce le plus de compétition, soient moins enclins à supporter des densités encore plus élevées. Ce qui parait assez logique sans compter que pour ce type de milieu il n'est nullement besoin de renforcer les effectifs. Le fait que la densité de graines germées y soit plus forte qu'ailleurs n'a rien d'étonnant également puisque pour une production de graines par pieds, en milieu fermé l'espace libre pour les accueillir est plus restreint que dans les deux autres conditions.

En milieux ouverts et semi-ouverts, la restauration semble possible et rentable à partir de plants d'une taille minimale de 25 cm sans trop surcharger en densité pour ne pas exacerber les phénomènes de compétition.

6.2.3. TÂCHE 4 : OUTIL MOLÉCULAIRE D'IDENTIFICATION DES DIFFÉRENTES ESPÈCES DE TRISTANIOPSIS NÉO-CALÉDONIENNES

Parmi les espèces présentes sur substrat ultramafique, certaines sont classées sensibles sur la liste de l'UICN. Néanmoins, elles restent difficiles à identifier par approche botanique classique en l'absence d'organes reproducteurs et/ou de fruits. Pour se libérer des contraintes saisonnières et permettre la continuité des chantiers miniers, il convient de mettre au point un outil d'appui à l'identification de ces espèces utilisable à tout moment de l'année.

Une approche taxonomique à l'aide d'outils moléculaires, type barcoding, apparait tout à fait

appropriée pour répondre à cette demande issue du secteur minier. Il s'agit donc, à l'occasion de ces travaux, de fournir un appui moléculaire à la caractérisation de la diversité spécifique des 13 espèces et variétés identifiées à ce jour de *Tristaniopsis* néo-calédoniens.

6.2.3.1. Echantillonnage terrain

Pour les besoins de l'étude, 5 individus par espèce et par site à *Tristaniopsis* prospecté ont été échantillonnés. Chacun d'eux est nommé, et géo-référencé au GPS, puis mis en sachet en présence de billes de gel de silice. Un herbier est également réalisé afin de permettre en parallèle une identification botanique.

6.2.3.2. Acquisition de données en laboratoire et analyses

Les échantillons sont ensuite traités au laboratoire de la Plate Forme du Vivant (PFV) de Nouméa, où des techniques décrites précédemment (Tache 1 et 2) ont été réalisées pour l'extraction d'ADN, l'amplification par PCR de portions choisies des génomes, et leur séquençage.

6.2.3.3. Choix des marqueurs moléculaires

Six marqueurs couvrant les génomes nucléaires, chloroplastiques et mitochondriaux ont été utilisés, et le travail a été étendu à 18 marqueurs supplémentaires pour deux espèces demeurées non différenciables. L'analyse comparative des séquences obtenues a été conduite et les groupes de similitudes génétiques identifiés (taxons génétiques). La comparaison de ces derniers aux espèces de la classification botanique a par la suite été effectuée.

6.2.3.4. Résultats

6.2.3.4.1. Echantillonnage

Douze espèces sur les 13 connues en Nouvelle-Calédonie ont été identifiées sur le terrain et échantillonnées (*T. jaffrei* non retrouvée). Parmi les échantillonnages récoltés, un taxon supplémentaire (New 1) a été identifié par ses profils de séquence. Il doit faire l'objet d'analyses complémentaires afin de pouvoir définir son statut botanique. Toutes espèces confondues, l'étude a été conduite sur 445 individus récoltés à partir de 36 sites répartis sur l'ensemble de la Grande Terre (Fig. 141).

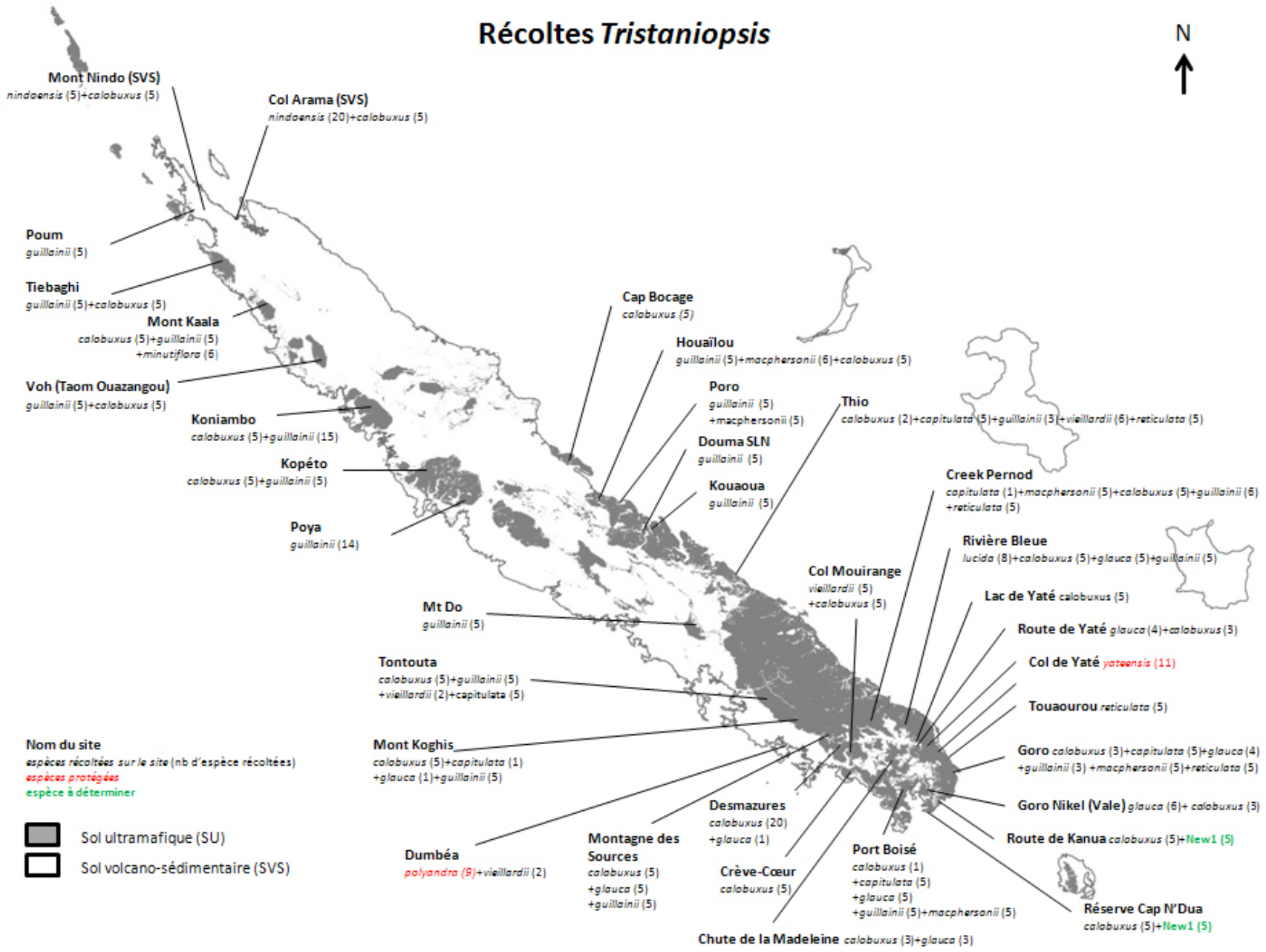


Figure 141 : Répartition des individus de *Tristaniopsis* récoltés pour l'étude de "code-barre ADN"

6.2.3.4.2. Acquisition de données en laboratoire et analyses

Une base de données a été créée. Elle comprend 1139 séquences (foward et reverse) obtenues à partir de l'ensemble des 24 loci retenus (Tableau 40). Au cours des travaux, et en fonction des résultats acquis, il a été choisi de ne poursuivre l'analyse de tous les échantillons récoltés qu'à l'aide des loci nucléaires ITS et ETS qui présentaient à eux deux une information suffisante pour répondre à l'objectif de l'étude : « identification des espèces protégées *T. polyandra* et *T. yateensis* ».

Tableau 40 : Liste des marqueurs moléculaires utilisés pour l'étude "code-barre ADN" du genre *Tristaniopsis*

Locus	Type de marqueur	Primer F	Primer R	Nb d'individus
ITS	ADNn	ITS-2F	ITS-3F	303
ETS	ADNn	Myr-F	ETS 18S	281
HA	ADNcp	trnH(GUG)	psbA	148
MatK	ADNcp	MatK1R	Matk3F	173
cox I	ADNmt			62
trnTF	ADNcp	trnTF-F	trnTF-C	29
HK1	ADNcp	trnH	trnK1	7
CS	ADNcp	psbC	trnS	10
QS	ADNcp	trnQF	trnScR	4
K1K2	ADNcp	trnK1	trnK2	7
ITS	ADNcp	ITS-2F	ITS-3F	
CD	ADNcp	trnC	trnD	4
Locus	**Type de marqueur**	**Primer F**	**Primer R**	**Nb d'individus**
DT	ADNcp	trnD	trnT	5
ML	ADNcp	trnM	rbcL	2
GS	ADNcp	trn G	trnS	9
rps16x1-trnQ	ADNcp	rps16	trnQ	16
rps16x2-trnK	ADNcp	rps16	trnK	20
rpl32-trnL	ADNcp	rpL32-F	trnL (UAG)	17
QR	ADNcp	trnQ	trnR	4
rbcL	ADNcp			16
ccmp3	microsat cp	ccmp3F	ccmp3R	2
ccmp5	microsat cp	ccmp5F	ccmp5R	2
NTCP9	microsat cp	NTCP9F	NTCP9R	16
gscp	ADNn sp cop			2

6.2.3.4.3. Analyse des données

In fine, il s'est révélé que le *locus* ITS permet à lui seul d'identifier 11 des 12 espèces étudiées. L'ensemble des taxons génétiques obtenus correspond bien aux espèces de la classification botanique à l'exception près d'une unité taxonomique génétique constituée des deux espèces *T. calobuxus* et *T. capitulata*. Ces deux dernières espèces demeurent indifférenciées par l'approche développée (résultats reconduits avec les 23 autres loci).

Ces travaux ont aussi permis d'identifier génétiquement deux sous-groupes taxonomiques au sein de l'espèce *T. guillainii*. Il est également fait référence dans la classification botanique de deux sous-espèces pour cette même entité : *T. guillainii* var *guillainii* et *T. guillainii* var. *balansana*. La comparaison entre les aires géographiques de distribution des deux sous-espèces avec celles des sous-taxons génétiques fait apparaitre une parfaite concordance entre elles (Fig. 142).

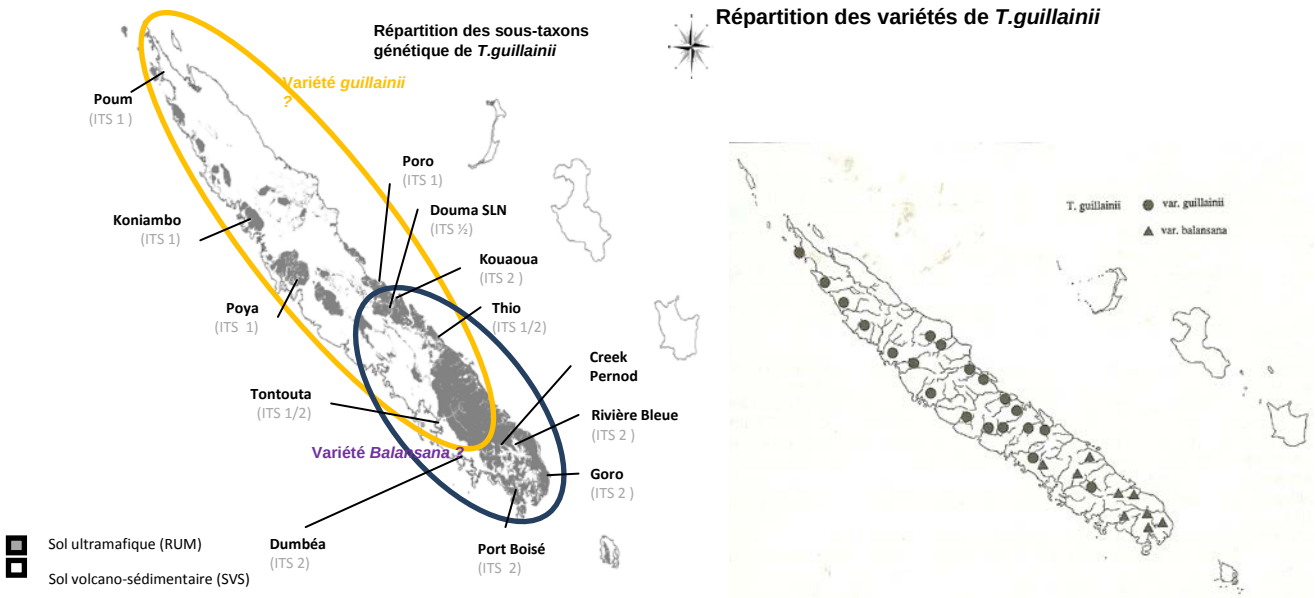


Figure 142 : Répartition des sous-taxons de *Tristaniopsis guillainii* identifiés par code-barres et répartition des variétés de *T. guillainii* selon la flore calédonienne

6.2.3.5. Discussion

L'approche « Code-barres ADN » est une approche innovante en Nouvelle-Calédonie, elle a permis de répondre aux objectifs fixés dans ce travail, soit l'identification des deux espèces *T. polyandra* et *T. yateensis* quelque soit l'époque de l'année. Plus largement, la création de la base de données de séquences des *Tristaniopsis* locaux, consécutive à cette étude, permet dorénavant d'identifier rapidement et spécifiquement un spécimen récolté sur le terrain, quelque soit son âge ou stade biologique pour le genre en Nouvelle-Calédonie.

Le locus ITS seul a permis d'identifier avec certitude 10 espèces sur les 12 étudiées. Un 11^{ième} taxon génétique regroupant les deux espèces *T. calobuxus* et *T. capitulata* a bien été observé sans pour autan pouvoir distinguer ces dernières, et ce, malgré des analyses complémentaires conduites dans ce sens. Ce résultat suggère que ces 2 espèces, différenciables l'une de l'autre par étude morphologique, doivent être génétiquement très proches.

Au niveau infra-spécifique, il a également été possible d'identifier deux sous-groupes taxonomiques pour l'espèce *T. guillainii* qui pourraient, vu leurs aires respectives de distribution, correspondre aux deux variétés décrites dans la classification botanique (*T guillainii var guillainii* et *T guillainii var balansana*).

Enfin, l'outil élaboré a aussi permis de définir un nouveau groupe taxonomique se différenciant des autres et, à ce jour, non encore identifiés botaniquement. Les individus qui le composent pourraient être reconnus comme formant une espèce qu'il reste à décrire formellement. L'intérêt de cet outil en appui à la systématique est aujourd'hui indéniable que ce soit dans le règne végétal ou animal. Au niveau des microorganismes, et particulièrement des champignons, l'approche moléculaire *via*

l'analyse comparative de séquences, est aujourd'hui à la base même de la définition des unités taxonomiques opérationnelles (OTU).

D'une manière générale, l'outil « barre-code », rapide et efficace, peut être considéré comme un outil de « police » au service de la protection des espèces et dans ce sens pourrait faire l'objet adaptation à d'autres espèces sensibles du territoire. A noter, qu'il a déjà été utilisé à l'occasion d'une expertise commanditée par une société minière locale.

6.2.4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS POUR LE VOLET 4

Les objectifs à atteindre, dans leur ensemble, ont été réalisés et pour ce faire, différentes approches ont été conduites.

L'étude des diversités génétiques, et de leur organisation propre à l'échelle du territoire, pour les trois espèces choisies *T. calobuxus*, *T. guillainii*, et *S. montana*, a permis de mettre en évidence des structurations plus ou moins significatives mettant en cause en premier lieu, et de façon marquée, la qualité des substrats rencontrés ultramafique *versus* volcano-sédimentaire, puis avec moindre effets les distances géographiques entre populations globalement arrangées sud/ouest au niveau de la Grande Terre. A chaque fois, et pour chaque espèce, des empreintes d'aires spatiales cohérentes, groupables par la similitude des profils génétiques qu'elles admettent respectivement, profils de génotypages et/ou de séquences, ont pu être définies. Elles regroupent donc des populations, ou variétés dans le cas de *T. guillianii*, génétiquement plus proches les unes des autres quelles ne le sont des autres populations de la même espèce sur le territoire. Ce qui s'est traduit par la démarcation de : 4 groupes différenciés de *S. montana*, 3 pour *T. calobuxus*, et 2 en ce qui concerne T. *guillainii*. Ces groupes, pour les espèces respectives auxquelles elles sont rattachables, représentent les aires semencières naturelles à partir desquelles il pourra être récolté les graines nécessaires à la restauration des sites dégradés positionnés en leur sein, ou à partir desquelles y pourra être établi *ex situ* des parcelles semencières qui leurs seront dédiés et permettront de ne pas épuiser la ressource naturelle.

De cette même étude, enrichie par les données des analyses intergénérationnelles effectuées pour les populations de *T. calobuxus* ciblées, aucune dégradation des niveaux de diversité génétique, révélatrice d'impact possible, n'a pu être décelée. Certaines populations ont été observées en souffrance mais cela semblerait être rattachable à leur environnement propre, petites populations encaissées en milieu fortement plurispécifique dénotant d'un isolement certain, plutôt qu'à charge de fragmentations dues à l'activité minière. Il est aussi possible que pour les cas étudiés, il n'y ait pas assez de recul par rapport aux dégradations potentielles subies pour pouvoir observer une réponse identifiable et attribuable à l'activité anthropique en cours. Le temps de renouvellement des populations sur place ainsi probablement que les temps générationnels nécessaires à une telle observation, ne sont sans doute pas encore atteints.

En ce qui concerne l'observation des distances de pollinisation et de dissémination des graines, deux approches ont été conduites. L'une indirecte, pour les populations de *S. montana*, a été basée sur l'étude des vecteurs de pollinisation et de dissémination suite à l'observation de signes (aspect des fleurs, fruits charnus) suggérant l'intervention d'animaux dans leurs processus reproductifs. L'autre, pour les populations de *T. calobuxus*, espèce qui s'affiche plus comme une plante à modèle anémophile et anémochore, a été orientée sur la recherche de parenté *via* l'utilisation de marqueurs moléculaires (empruntes génétiques). Les résultats acquis ont permis, dans un cas comme dans l'autre, de pouvoir approcher les distances de pollinisation et de dissémination de graines dont il faudra tenir compte à l'occasion de travaux en restauration pour définir les distances seuils à respecter qui permettront la continuité des flux de gènes à travers le territoire. Dans le cas particulier de *T. calobuxus*, l'approche choisie a permis d'affiner ces distances et également d'obtenir des résultats complémentaires informant sur la composition des populations en individus : individus 100%

locaux, individus issus de croisement avec des reproducteurs extérieurs, ou encore individus totalement exogènes. Ces dernières observations mettent en exergue le fort potentiel d'échanges de gènes entre populations pour cette espèce tout en démontrant également l'importance de la proximité d'autres populations, à bonne distance, dans le voisinage.

La forte activité de flux de gènes pour *T. calobuxus*, probablement possible aussi sur de longues distances, ce qui va de paire avec l'observation faite de faibles structurations en substrat ultramafique, et le caractère commun de l'espèce sur le territoire, permettent de soutenir les niveaux élevés de la diversité génétique observés à l'échelle de la Grande Terre, et expliquent l'apparente absence d'érosion de cette dernière au cours du temps.

En complément des études de distances, une approche démographique a été conduite à partir de la parcelle du col de Mouirange afin d'estimer les pourcentages de réussite, vis à vis de l'accès au statut d'adulte reproducteur, en fonction de la taille des plants au sein de la population présente. Il s'est avéré que la population subissait une grande perte d'effectif dans les jeunes stades de développement des plants et qu'à partir d'une taille avoisinant les 25 cm cela se stabilisait. Cette perte pourrait être liée au moins partiellement à un état de surpeuplement de la population du fait de la quasi saturation des surfaces par des juvéniles. Ce qui s'observe encore plus fortement dans les populations fermées, là où les densités sont les plus importantes, *a contrario* des sites ouverts ou semi ouverts qui semblent plus enclins à accepter de nouveaux arrivants, ce qui paraît normal !

Dans la dernière partie des travaux il a été question d'élaborer un outil d'appui à la détermination spécifique d'espèces répertoriées sur la liste rouge de l'UICN et ce quelque soit le stade biologique ou de développement des individus. L'approche « barcoding » a été un bon choix puisqu'il est aujourd'hui possible d'identifier l'une des 2 espèces protégées des autres *Tristaniopsis* néo-calédoniens quelque soit le stade du plant en question. L'outil élaboré permet même d'aller au delà de ce qui était attendu puisqu'il s'est avéré assez fin pour reconnaître la quasi totalité des espèces botaniques connues, d'en différencier les variétés, voir de déceler de nouvelles espèces. C'est un outil à généraliser aux profits d'autres espèces mises en danger.

La pertinence de l'approche moléculaire développée à l'occasion des travaux présentés dans ce rapport repose dans celle des résultats qui y ont été acquis et celle des attendus délivrés (cf. tableau qui suit). Les modèles biologiques choisis, *Tristaniopsis* et *Scaevola*, sont représentants pour le premier des espèces anémophiles et anémochores structurantes des milieux de maquis néocalédoniens, et pour *S. montana*, d'essences admettant des vecteurs de type abeilles et oiseaux au niveau de leur processus de reproduction. Il est évident que ces caractéristiques sont loin de couvrir l'ensemble des possibles au niveau de la flore néo-calédonienne. Beaucoup d'autres caractères écologiques et critères de répartition géographique reste à étudier.

Afin de mieux exploiter les résultats obtenus pour cette partie de projet, et aussi plus généralement améliorer fortement nos connaissances sur les dynamiques spatiales et temporelles des espèces, il conviendrait de s'attacher aussi à la haute écologie des espèces ainsi qu'à leur cycle de vie (relation taille et stade de vie, effectif d'une population et effectif efficace dans la reproduction, …)

Un tableau synthétique des recommandations est présenté en fin de rapport (conclusion générale).

6.3. - RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES CITÉES

DAWSON J. W. 1992. — Myrtaceae-Leptospermoideae, in MORAT P. & MACKEE H. S. (eds), Flore de la Nouvelle-Calédonie et Dépendances. Muséum national d'Histoire naturelle, Paris: 1-251

DOYLE J.J., DOYLE D.J., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus : 12, 13-15.

FINATTO, T. DOS ANTOS, KSTEINER, N.BIZZCOCHI, L.HOLDERBAUN, D.DUCROQUET, J.GUERRA, M.& NODARI, R. 2011 Late-acting self-incompatibility in Acca sellowiana (Myrtaceae). Australian Journal of Botany, 59: 53–60.

Foster, S. A., McKinnon, G. E., Steane, D. A., Potts, B. M., & Vaillancourt, R. E. (2007). Parallel evolution of dwarf ecotypes in the forest tree Eucalyptus globulus. *The New phytologist*, *175*(2), 370-80. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02077.x

JAFFRÉ T., MORAT P., VEILLON J.M., MACKEE H.S. 1987 Changements dans la végétation de la Nouvelle-Calédonie au cours du Tertiaire : la végétation des roches ultrabasiques. Bulletin Musée national d'Histoire naturelle, section B, Adansonia, n°4 : 273-288.

JAFFRÉ T. 1996 Etude comparative des formations végétales et des flores des roches ultramafiques de Nouvelle-Calédonie et d'autres régions tropicales du monde. In : Phytogéographie tropicale, réalités et perspectives (eds Guillaumet J.L., Berlin M.) pp. 137-149. Colloques et Séminaires ORSTOM, Paris.

JUAN, P., VARO, G., RAFAEL, G., ALBALADEJO 2009. Mating patterns and spatial distribution of conspecific neighbours in the Mediterrannean shrub Myrtus communis (Myrtaceae). Plant ecol. 203, 207-215.

Kato, M., & Kawakita, A. (2004). Plant-pollinator interactions in New Caledonia influenced by introduced honey bees. *American Journal of Botany*, *91*(11), 1814-1827.

Lamaignere, H. (2001). *L'apiculture en Nouvelle-Calédonie*. Thèse. Université Paul Sabatier-Toulouse III.

L'HUILLIER L., JAFFRÉ T. ET WULFF A. 2010 Mines et Environnement en Nouvelle- Calédonie : les milieux sur substrats ultramafiques et leur restauration. 1ière édition. Nouméa, Nouvelle-Calédonie : Editions IAC, 412p.

MARSHALL, TC, SLATE, J, KRUUK, LEB & PEMBERTON, JM 1998 Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* **7**: 639-655.

PAGE T., MOORE G.M., WILL, J., HALLORAN G.M 2010 Breeding behaviour of Kunzea pomifera (Myrtaceae) : self-incompatibility, intraspecific and interspecific cross-compatibility, SexPlantReprod, 23:239-253.

Adrien WULFF 2012 Mémoire de thèse : « Le micro-endemisme dans un hotspot de biodiversité : approche globale sur la flore vasculaire de Nouvelle-Calédonie et analyse comparative au sein du genre *Scaevol* », 226PP.

A.WULFF and J.MUNZINGER 2012 Une nouvelle espèce micro-endémique de *Scaevola L.* (Goodeniaceae) de Nouvelle-Calédonie en danger critique d'extinction, BioOne, Adansonia, 34(1):123-128.

A.WULFF *et al* 2012 Smoke stimulates germination in two divergent Gondwanan species (*Hibbertia pancheri* and *Scaevola montana*) endemic to the biodiversity hotspot of New Caledonia, Seed Science Research: 1-6.

A.WULFF *et al*. 2012 Ten nuclear microsatellites markers cross-amplifying in *Scaevola montana* and *S. coccinea* (Goodeniaceae), a locally common and a narrow endemic plant species of ultramafic scrublands in New Caledonia, Conservation Genet Resources, 4:725–728.

6.4. BILAN QUANTITATIF (PUBLICATIONS, COMMUNICATIONS, FORMATION, ETC.)

G. BIDAU 2012, MFE ISTOM, « Différenciation des espèces du genre *Tristaniopsis* par approche code-barres ADN »

L. MAGGIA, G. BIDAU, M-L TIOUCHICHINE, “Molecular approach to support the management and restoration of degraded site”. 2th conference of SERA, 17-21 Nov. 2014, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.

M.-L. TIOUCHICHINE 2011, rapport de M2, UM2, « Diversité génétique de *Tristaniopsis calobuxus*, espèce endémique de la Nouvelle-Calédonie »

Adrien WULFF 2012 Mémoire de thèse : « Le micro-endemisme dans un hotspot de biodiversité : approche globale sur la flore vasculaire de Nouvelle-Calédonie et analyse comparative au sein du genre *Scaevol* », 226pp.

A.WULFF and J.MUNZINGER 2012 Une nouvelle espèce micro-endémique de *Scaevola L.* (Goodeniaceae) de Nouvelle-Calédonie en danger critique d'extinction, BioOne, Adansonia, 34(1):123-128.

A.WULFF *et al* 2012 Smoke stimulates germination in two divergent Gondwanan species (*Hibbertia pancheri* and *Scaevola montana*) endemic to the biodiversity hotspot of New Caledonia, Seed Science Research, 1-6.

A.WULFF *et al*. 2012 Ten nuclear microsatellites markers cross-amplifying in *Scaevola montana* and *S. coccinea* (Goodeniaceae), a locally common and a narrow endemic plant species of ultramafic scrublands in New Caledonia, Conservation Genet Resources, 4:725–728.

7. CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET RECOMMANDATIONS

Après quatre années de recherches pluridisciplinaires, ce projet a permis des avancées importantes sur les topsoils, les symbiotes mycorhiziens et la diversité génétique de certaines plantes et ceci non seulement en termes de connaissances, mais aussi en termes d'applications concrètes en vue d'une restauration écologique des milieux ultramafiques dégradés.

Nous énumérons ci-dessous les conclusions les plus saillantes et les recommandations correspondantes pour les quatre volets du projet :

7.1. VOLET 1 : CARACTÉRISATION DU TOPSOIL ET DE SON ÉVOLUTION PENDANT SON STOCKAGE EN MINE

- Potentialités de la banque de graines des topsoils
  - Les topsoils des terrains miniers de Nouvelle-Calédonie comportent une diversité et une densité de graines qui peut beaucoup varier, notamment en fonction de la composition floristique. Il est possible de récupérer en moyenne entre 15% et 30% de la diversité initiale des espèces végétales à partir des germinations obtenues sur ces topsoils, avec des densités > 10 germinations/m^2 (voire >100/m^2 en serre), ce qui est particulièrement intéressant dans les opérations de restauration des sites dégradés.
  - Lors de la récupération d'un topsoil en place (dans son milieu naturel), il est recommandé de **prélever dans un premier temps une épaisseur très fine** (le « topsoil », si possible 0-10cm, sinon 0-30 cm au plus) où sont concentrées toutes les semences (97% dans les premiers 5 cm), puis dans un second temps la couche inférieure (le « subsoil », sur environ 10-50 cm, 100 cm au plus). La réutilisation de ces couches de sol (dans l'ordre : subsoil puis topsoil), pourra se faire selon des épaisseurs d'étalage plus faibles qu'à l'origine, de façon à pouvoir traiter des surfaces plus grandes. Ce traitement différencié des deux couches évitera la dilution du topsoil (donc des graines) dans le subsoil.
  - La date de prélèvement du topsoil en place est un autre paramètre important à prendre en compte. Ainsi **il apparaît préférable de prélever des topsoils en saison chaude, en fin d'année ou tout début d'année (décembre à mars)**, période pendant laquelle la banque de graines a plus de chance d'être bien pourvue en quantité et en diversité. Il faut cependant éviter de prélever trop tardivement en fin de saison chaude et humide (après mars), période pendant laquelle une grande quantité de graines non dormantes, majoritaires en maquis minier, auront déjà germé *in situ* et dont la manipulation entrainera leur perte.
  - Durant le stockage d'un topsoil, que ce soit sous climat sec ou humide, et même sur une épaisseur de 2 mètres, **le pouvoir de germination de la majorité des graines dormantes est bien conservé sur une assez longue durée**, de 24 à 36 mois (voire probablement plus pour les graines à forte dormance). Les graines à tégument fin (généralement non dormantes) sont elles plus sensibles aux variations climatiques que celles à tégument épais (généralement dormantes). Ceci est vrai tant au niveau de leur germination que de leur conservation dans la banque de graines du sol. Il a été montré dans cette étude que les graines dormantes peuvent se conserver pendant une période d'au moins 24 mois et ce quelle que soit la profondeur d'enfouissement. Au-delà, une perte de la capacité germinative

et d'installation de la plantule est observée. Par ailleurs les potentialités microbiolotiques diminuent rapidement (voir point suivant).

- Durant le stockage d'un topsoil en conditions humides (pluviométrie élevée comme dans le grand Sud), **les graines non dormantes ne sont pas conservées** (fortes pertes dès les premiers mois). Toutefois, en climat sec (ex. sur Toutouta), et même sur une épaisseur de stockage de 2m, les graines non dormantes sont assez bien conservées sur une durée de stockage de 24 mois.
- Ainsi, deux facteurs semblent le plus influencer le maintien des graines durant le stockage du topsoil : la composition en graines du topsoil (importance du nombre de graines dormantes / graines non dormantes) et le climat (humide / sec). Selon ces facteurs, le stockage du topsoil pourrait être envisagé sur environ 2 m d'épaisseur pendant 2 à 3 ans, avec une perte de la viabilité des semences pouvant être modérée à forte (modérée en climat sec et avec une part importante de graines dormantes ; forte en situation humide et avec une prépondérance de graines non dormantes). Mais, dans tous les cas, les pertes de potentialités microbiologiques pendant la conservation n'encourage pas un tel stockage (cf. ci-dessous).
- **Le topsoil doit être prioritairement utilisé frais** (transfert direct du site de prélèvement au site de restauration), pour **éviter au maximum la perte de diversité spécifique par perte des semences non dormantes**, lesquelles sont majoritaires en maquis minier. S'il est stocké, il est conseillé de le conserver au maximum 24 mois, période au delà de laquelle les graines dormantes commencent à perdre leur pouvoir germinatif.
- **Il est conseillé de ré-étaler le topsoil en saison chaude** en fin d'année ou tout début d'année (qu'il soit frais ou qu'il ait été stocké pendant une longue durée de 24 à 26 mois), afin d'optimiser la réinstallation des espèces à graines dormantes présentes dans un topsoil. Cet élément est renforcé par le fait, révélé par cette étude, que les graines à dormance physiologique (combinée ou non avec une dormance physique) présentes dans la banque du sol, possèdent une période de levée de dormance correspondant à la fin de la saison fraîche et jusqu'à la fin de la saison chaude (novembre-mai).

- Potentialités microbiologiques des topsoils
  - Les topsoils néo-calédoniens comportent une microflore active et diversifiée. Les champignons mycorhiziens y sont relativement fréquents à l'état naturel.
  - Le stockage du topsoil (après son décapage pour l'extraction du minerai) est nocif pour ses potentialités microbiologiques. A partir de 3 mois de stockage, le niveau général des bactéries du sol baisse très nettement, cette baisse s'accentuant ensuite progressivement. Le nombre de spores mycorhiziennes (AMF) est réduit de 3 à 4 fois après 6 mois, mais remonte légèrement en surface à partir de 12 mois en relation probable avec les plantules qui s'y développent. Des résultats similaires, mais avec des baisses plus importantes ont été obtenus au cours d'autres expérimentations sur d'autres topsoils.
  - Il apparaît donc clair que **la solution la plus efficace pour la revégétalisation est de réutiliser le topsoil dès son décapage**. Toutefois, si le sol n'est pas stocké trop longtemps (quelques mois), il peut récupérer ses potentialités microbiologiques initiales, avec un délai de 1 à 2 ans après plantation ou semis, donc avec un retard pour le bon développement des plantes.
  - **Si le topsoil doit être stocké, il est clairement préférable de le stocker étalé, et de préférence de stimuler un développement végétal dessus** (arrosage, semis…).
- Stockage des graines en conditions contrôlées
  - La conservation des graines en conditions contrôlées avant leur utilisation que ce soit pour de l'hydroseeding ou de la production en pépinière est spécifique à chaque espèce et il convient de l'étudier au moins à l'échelle du genre.

- Notre étude montre que quelle que soit l'espèce considérée (*Alphitonia neocaledonica, Gymnostoma deplancheanum, Machaerina deplanchei, Scaevola cylindrica*), une conservation à une humidité relative de 12% et une température de 4°C est favorable.

- Même conservées au froid les graines à dormance physiologique semblent posséder une horloge interne fixant la période de levée de dormance entre novembre et mai. **Il conviendrait donc de les utiliser pour le semis durant cette même période.**

7.2. VOLET 2 : CONNAISSANCE ET UTILISATION DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS

- Diversité et adaptation des champignons mycorhiziens

  - La diversité en AMF et ECM est aussi importante dans les sols ultramafiques néocalédoniens que dans les écosystèmes plus productifs classiques. Ces symbiotes sont fortement adaptés à ces milieux de sorte qu**e des champignons provenant d'autres milieux (notamment importés) ne pourront pas s'adapter à ces écosystèmes particuliers**. Des gènes de résistance au nickel ont notamment été mis en évidence pour les ECM.

- Fonctions des champignons mycorhiziens dans les milieux ultramafiques

  - Il a été clairement démontré que les champignons mycorhiziens ECM et AMF jouent un rôle important dans la croissance et l'adaptation des espèces végétales aux conditions difficiles des sols ultramafiques.

  - Ainsi les plantes inoculées avec des souches de champignons provenant de ces sols ont des croissances fortement améliorées (amélioration variant selon l'affinité de chaque espèce avec le type de champignon). Ces symbiotes interviennent dans la nutrition minérale des plantes, en particulier phosphatée. Une amélioration des teneurs en N, K et Ca a aussi souvent été relevée.

  - En termes de rôle dans l'adaptation des plantes, il a été montré une amélioration du ratio Ca/Mg dans les organes de la plante, ratio souvent fortement déséquilibré sur sol minier, ainsi qu'une réduction de la translocation de certains métaux lourds vers les parties aériennes.

  - Un rôle dans l'adaptation des plantes aux dessèchement régulier du sol est également mis en évidence en serre (amélioration de l'absorption de l'eau grâce au mycélium extraradiculaire qui prospecte un grand volume de sol), mais non confirmé sur le terrain probablement du fait que la zone d'expérimentation a subit peu de dessèchements (zone très humide).

  - Les essais en serre, puis sur terrain montrent un avantage important pour les plantes inoculées avant plantation. Même lorsqu'il y a un inoculum mycorhizien (peu important) dans le topsoil à revégétaliser, la différence entre les plants inoculés en pépinière et ceux qui se mycorhizent (plus lentement) sur le terrain est importante. Il est donc **fortement recommandé de s'assurer que les plantes utilisées en revégétalisation sont correctement mycorhizées avant des les planter**. Il existe plusieurs techniques de mycorhization adaptables (voir chap. 5 de l'ouvrage de L'Huillier et al. 2010). Il est également possible d'estimer le potentiel de mycorhization d'un sol (décrit dans le même ouvrage) et le degré de mycorhization de plantes élevées en pépinière (ou de le faire estimer par un laboratoire).

    Il est important dans ces conditions, de bien distinguer les espèces végétales endomycorhizées des espèces ectomycorhizées, car elles n'ont pas les mêmes exigences en termes de mycorhization.

- Une **fertilisation minérale et/ou organique modérée** est non seulement directement favorable à la croissance des plantes, (en apportant les éléments manquants et ou en structurant le sol), mais elle **permet aussi d'améliorer la mycorhization des plantes**. En effet, nous avons maintenant la certitude que la carence en phosphore des sols ultramafiques néocalédoniens maintient à un niveau bas la mycorhization. Ainsi, nous avons pu montrer qu'un apport de phosphore, mais aussi un apport de boues de station d'épuration (généralement riches en P) est fortement favorable à la mycorhization. Toutefois, des excès de fertilisation sont nocifs aussi bien pour la mycorhization qu'en favorisant le développement des espèces invasives.

- En ce qui concerne la revégétalisation par semis (hydraulique ou sec), les travaux réalisés montrent clairement qu'il est possible d'apporter les champignons mycorhiziens avec les graines à l'intérieur du mulch utilisé. Ceci est d'autant plus important que le semis est parfois utilisé en absence de tout topsoil, situation où un apport de champignons mycorhiziens devient indispensable. Les travaux réalisés dans ce projet n'ont toutefois pas encore atteint le stade terrain, bien qu'une petite expérience de terrain ait été réalisée hors projet Ecomine BioTop. D'autres essais seront nécessaires avant d'aboutir à une solution concrètement utilisable en revégétalisation. Mais dores et déjà, **il est possible de préconiser pour les surfaces sans topsoil, des apports d'une fine couche de topsoil frais riche en spores mycorhiziennes, avant l'hydroseeding ou le semis sec, à semer comme on le fait pour les graines**.

- Effet des boues de STEP sur la fertilité des sols et la mycorhization d'espèces végétales endémiques :

  - L'apport de matière organique sous la forme de boues d'épuration permet une forte amélioration de la croissance des plants de *Carpolepis laurifolia*. Ces essais coonfirment les résultats d'autres essais déjà réalisés sur cet amendement organique.

  - L'amendement en boues de STEP stimule nettement la mycorhization des plants en réduisant l'aspect limitant de la carence en phosphore. La deuxième espèce végétale testée (*Tristaniopsis glauca*) a été soumise à des inondations qui ont faussé les résultats, de sorte que des essais avec d'autres espèces végétales seraient utiles, notamment pour confirmer la complémentarité des effets des boues de STEP et de la mycorhization.

7.3. VOLET 3 : DYNAMIQUE DES MÉTAUX ET DE LA MATIÈRE ORGANIQUE *IN SITU*

- Distribution des éléments métalliques ; variation du potentiel redox du pH et de la conductivité électrique au cours du stockage du topsoil.

  - Le suivi des concentrations pseudo-totales a permis de constater que les concentrations en fer, nickel, cobalt, chrome, manganèse et magnésium sont globalement constantes avec le temps quel que soit le type de stockage, étalé ou en andain.

  - Le fer, le nickel et le chrome des topsoils étudiés sont peu mobiles, la fraction résiduelle qui représente les métaux n'étant pas ou très peu mobilisables. Le manganèse et le cobalt sont un peu plus mobilisables. Il n'a pas été observé de migration massive d'éléments métalliques d'une fraction peu mobilisable vers une fraction plus facilement mobilisable, y compris en profondeur. La mobilité de ces différents métaux ne semble donc pas affectée par le mode de stockage.

  - Globalement, les concentrations en chrome, nickel et cobalt solubles dans l'eau sont faibles pour le topsoil de Goro. Une augmentation des concentrations en chrome hexavalent soluble dans l'eau est toutefois notée pour le topsoil de Goro après 12 mois de stockage, même si ces concentrations restent faibles. Pour le topsoil de Tontouta, les concentrations en Ni et Cr hexavalent solubles dans l'eau sont plus élevées.

- La mobilité des éléments métalliques dans le sol pendant le stockage évoluant très peu à l'échelle de temps considéré, **elle ne devrait pas engendrer de problème de toxicité lors de l'utilisation des topsoils pour la revégétalisation**.

- Fonctionnement géochimique des sols
  - Le stockage des topsoils ne semble pas affecter la fertilité chimique et biochimique. Les éléments minéraux nutritifs semblent conservés à l'instar du calcium. Le potassium diminue légèrement. Toutefois cette stabilité relative, dans des conditions d'affaiblissement de la microflore est problématique, car le sol ne pourra pas renouveler rapidement les éléments prélevés par les plantes lors de la revégétalisation, cette fonction étant dévolue à l'activité microbienne.
  - Les métaux secondaires comme Ni et Cr ne sont que légèrement affectés par le stockage. En ce qui concerne le Ni, sa disponibilité est plus élevée dans les topsoils du fait des fortes concentrations en matière organique et de la constitution d'une CEC importante.
  - La matière organique subit des changements quantitatifs et qualitatifs lors du décapage puis du stockage, mais l'essentiel de ces changements négatifs ont lieu lors du décapage. Dans l'ensemble les propriétés de fertilité chimique restent proches de celles du matériau d'origine.
  - Le CrVI (le plus toxique), malgré les très fortes concentrations totales en Cr des topsoils et des conditions favorables à sa stabilité, ne présente pas de concentrations dépassant les normes dans les eaux naturelles.
  - **Les Cambisols hypermagnésiques peuvent, s'ils sont disponibles localement être une source de topsoil à fort potentiel de fertilité. En revanche, leur destruction peut entraîner une disparition d'habitat pour une grande partie de la végétation native**.

7.4. VOLET 4 : ETUDE DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DE QUELQUES ESPÈCES DE *TRISTANIOPSIS* ET *SCAEVOLA* DANS UNE PERSPECTIVE DE CONSERVATION ET DE RESTAURATION DES MILIEUX

Voir en fin de tableau pages suivantes

Tableau des recommandations			
Objet	**Commande**	**Résultats**	**Recommandations**
Potentialités de la banque de graines des topsoils	Evaluer la capacité à germer des graines contenues dans le topsoil, et à être conservées lors du stockage du topsoil	- Les graines contenues dans les topsoils permettent de récupérer entre 15% et 30% de la diversité végétale initiale ; - 97% des graines se trouvent dans les premiers 5 cm ; - La banque de graines des topsoils a plus de chance d'être bien pouvue en quantité et en diversité en saison chaude ; - Le stockage du topsoil sur 24 à 36 mois montre que la majorité des graines dormantes est bien conservée, même sur une épaisseur de 2 m. Par contre les graines non dormantes, majoritaires, ne se conservent pas en condition de milieu à forte pluviométrie. - Les graines dormantes, et surtout à dormance physiologique, possèdent une période de levée de dormance surtout en fin d'année à début d'année.	- **L'utilisation des topsoils est une des clés essentielles dans les opérations de restauration écologique ;** - **Prélever le topsoil sur une épaisseur la plus faible possible (moins de 30cm voir 10cm) ;** - **Prélever les topsoils entre décembre et mars de préférence, en évitant les périodes très pluvieuses (un topsoil trop humide se tassera lors de la manipulation) ;** - **En prenant uniquement en compte l'aspect banque de graines, un stockage du topsoil en climat sec (ex. Tontouta) peut être envisagé pendant 2 ans, avec une perte modérée de graines. Toutefois les potentialités microbiologiques étant fortement diminuées, ce n'est pas recommandé** - **Dans tous les cas, et surtout en climat humide, le topsoil doit être prioritairement réutilisé frais (transfert direct) ;** - **Ré étaler le topsoil de préférence en saison chaude, entre novembre et mai, pour faciliter l'implantation des espèces à graines dormantes.**
Caractérisation des dormances d'espèces pionnières	Optimiser la germination d'espèces pionnières	- *Gymnostoma deplancheanum*, espèce non dormante à tégument fin ; - *Alphitonia neocaledonica,* espèce à dormance physique combinée à une physiologique à tégument imperméable et épais : - *Machaerina deplanchei,* espèce à dormance	- ***G. deplancheanum* : Germination aisée à 25°C en deux à trois semaines** - ***A. neocaledonica* : Scarifier les graines par abrasion ou les scarifier par trempage dans un bain d'eau chaude à 80°C** - ***M. deplanchei* : Sacrifier les graines par abrasion**

		physiologique profonde à tégument épais; - *Scaevola cylindrica*, espèce à dormance physiologique très profonde à tégument épais.	**à minima et réaliser un trempage dans du GA_3 à 0,3 g/L** - ***S. cylindrica* : Réaliser un pré-trempage de 24h dans de l'eau fumigée à 10% (Regen^{TM})**
Conservation *in situ* de semences d'espèces pionnières par enfouissement	Evaluer la capacité de maintien *in situ* de semences jusqu'à 50 cm d'enfouissement	- *G. deplancheanum* a des graines non dormantes qui germent très rapidement si les conditions sont humides au moment du stockage du topsoil. - *A. neocaledonica, M. deplanchei* et *S. cylindrica* ont des graines dormantes et orthodoxes qui sont toujours vivantes après 24 et 18 mois de suivi et quelle que soit la profondeur.	- **Ne pas conserver le topsoil au-delà de 24 mois (attention au regard des graines dormantes uniquement) et il est important de noter qu'un stockage a toutes les chances de conduire à la perte des graines non dormantes qui sont majoritaires en maquis minier.**
Conservation *ex situ* en conditions contrôlées de semences d'espèces pionnières	Trouver le meilleur moyen de stocker les graines sur une longue période	- pour *A. neocaledonica* à 4, 15 ou 25°C avec à un taux d'humidité relative de 12% : - pour *G. deplancheanum* à 4°C et à un taux d'humidité relative de 5 à 12% : - pour *M. deplanchei* toutes les températures et taux d'humidité étudiés. Cependant, pour optimiser leur germination après conservation, utiliser la température de 25°C et le taux d'humidité relative de 12% ; - pour *S. cylindrica*, toutes les températures et taux d'humidité étudiés.	- **Identiques aux résultats**
Effet du stockage du topsoil sur ses potentialités mcrobiologiques	Y a t-il changement des potentialités microbiologiques du topsoil après stockage en mine ?	- Le stockage du topsoil est nocif pour ses potentialités microbiologiques. Il induit une baisse de la quantité de microorganismes ainsi qu'une réduction des spores de champignons mycorhiziens. - Toutefois, si le sol n'est pas stocké longtemps (quelques mois), il peut récupérer ses potentialités microbiologiques avec un délai de 1 à 2 ans après plantation ou semis.	- **la solution la plus efficace pour la revégétalisation est de réutiliser le topsoil dès son décapage. Il faut éviter, si possible, de le stocker au delà de 3 mois.** - **Si le topsoil doit être stocké, il est préférable de le stocker étalé, et de stimuler un développement végétal dessus. Une revitalisation plus poussée peut être réalisée en inoculant les plants en pépinières avec des AMF**

			pendant la revégétalisation.
Diversité et adaptation des champignons mycorhiziens	Les champignons mycorhiziens des sols ultramafiques sont-ils particuliers ?	- Les AMF natifs sont fortement adaptés aux milieux ultramafiques, notamment aux métaux - - Des gènes de résistance au nickel ont notamment été mis en évidence pour les ECM.	- **Des champignons mycorhiziens provenant d'autres milieux (notamment importés) ne pourront pas s'adapter à ces écosystèmes particuliers**
Fonctions des champignons mycorhiziens dans les milieux ultramafique	Quelles sont les fonctions des champignons mycorhiziens ? Comment les favoriser sur le terrain ?	- Différents rôle fonctionnels importants ont été mis en évidence, notamment dans la nutrition minérale (en particulier P), l'adaptation au ratio Ca/Mg faible de ces sols, la tolérance au stress hydrique et la tollérance aux métaux de la plante. - Un apport modéré de P améliore la mycrohization des plants par les AMF. - Des spores AMF peuvent être placées à la surface des graines enrobées avec de l'alginate.	- **Il est fortement recommandé de s'assurer que les plantes utilisées en revégétalisation sont correctement mycorhizées avant des les planter.** - **Une fertilisation minérale et/ou organique modérée (notamment en P) permet aussi d'améliorer la mycorhization des plantes** - **Il est possible d'apporter les champignons mycorhiziens sous forme de spores avec les graines à l'intérieur du mulch utilisé en ensemencement hydraulique ou sec. Des essais supplémentaires sont toutefois nécessaires.** - **On peut aussi apporter ces symbiotes sur les surfaces sans topsoil, par un apport d'une fine couche de topsoil frais riche en spores mycorhiziennes, avant l'hydroseeding ou le semis sec (sol à semer comme on le fait pour les graines).**
Effet des boues de station d'épuration en liaison avec les AMF	Les boues de STEP améliorent-elles la croissance des plantes sans géner la mycorhization ?	- L'apport de matière organique sous la forme de boues d'épuration permet une forte amélioration de la croissance des plants. - L'amendement du sol en boues de STEP stimule La	- **Une combinaison boues de STEP /inoculation en AMF des plants en pépinière est souhaitable ; elle donne d'excellent résultats, en termes de croissance et d'adaptation des plants.**

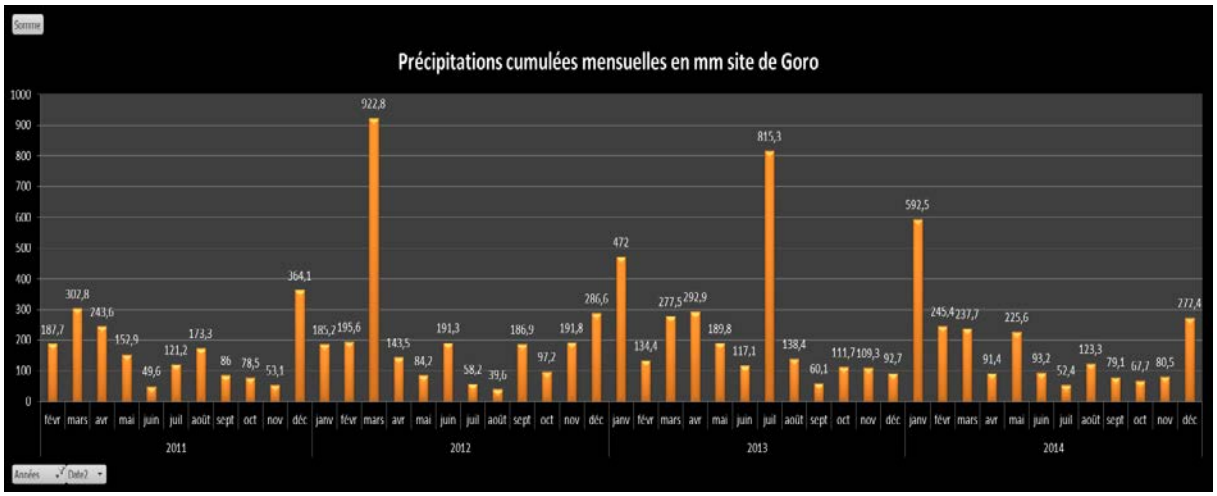
		mycorhization.	

Structure génétique de *Tristaniopsis calobuxus ; T. guillainii, Scaevola montana*	Définir des groupes semenciers compatibles	- *T. calobuxus* : structure influencée par les conditions édaphiques et pour moindre mesure en fonction des distances géographiques, délimitation géographique de 3 groupes - *T. guillainii* : structuration en 2 sous espèces délimitées géographiquement - *S. montana* : structure influencée par les conditions édaphiques, d'isolement insulaire, et les distances géographiques, délimitation géographique de 4 groupes	- **Respecter la structuration naturelle des populations à l'échelle du territoire en adoptant, lors de campagne de reboisement, une stratégie qui colle au mieux aux dynamiques naturelles. Renforcer les populations dégradées à partir des ressources en graines issues des groupes de rattachement observés pour chacune des espèces** - **Mettre en place des parcelles semencières pour chacune des unités génétiques observées par espèces afin de préserver les ressources naturelles en graines**
Etude des flux de gènes	Mise en place de "populations starters"	*T. calobuxus* - Existence d'un potentiel de pollinisation à longue distance important (cf. modèle de pollinisation établi) - Potentiel de dissémination à grande distance des graines (≈1/5 de graines exogènes/site) - Grand brassage génétique *S. montana* - Identifications du pollinisateur et de la distance de dissémination des graines (≈800m)	- **Distance minimum de plantation entre "populations-starters" de 300 à 600 m (*T. calobuxus*)** - **Confirmer le modèle de pollinisation établi par l'étude de diversité des reproducteurs potentiels des populations voisines au site étudié, afin de déterminer leur taux de participation à la pollinisation et au recrutement sur ce dernier. L'identification, de proche en proche, de l'ensemble des reproducteurs qui participent à la dynamique de croissance de cette parcelle, et par là même, permettra d'avoir une idée plus juste des distances de pollinisations et de dissémination pour l'espèce considérée.**

			- **Respecter des distances d'environ 800m entre les plantations à effectuer, et/ou prévoir des relais en autres espèces capables d'assurer la continuité dans le déplacement des vecteurs impliqués.**
Etude démographique de *Tristaniopsis calobuxus*	Définir la taille minimale des plants avant transfert au champ	1 plant de 25 cm / m² pour 1 adulte *in fine* en milieu semi-ouvert et ouvert	- **Plantation de plants de plus de 25 cm pour avoir un pourcentage de survie optimum** - **Planter à faible densité**
"Code-Barre ADN" du genre *Tristaniopsis*	Identifier les espèces protégées du genre *Tristaniopsis*	- Identification des 2 espèces protégées - Identification des sous-espèces - Identification d'un nouveau taxon génétique regroupant des individus non encore identifiés d'un point de vue botanique - Identification de 2 sous-groupes génétiques pour *T .guillainii* correspondants à ses 2 variétés déjà identifiées	- **Faire appel à cet outil, « code-Barre ADN », dès que nécessaire.** - **Etendre cette méthode à d'autres espèces**

8. ANNEXES

8.1. POUR LA PARTIE « MATÉRIELS ET MÉTHODES GÉNÉRAUX



8.2. VOLET 2 : ARTICLES SCIENTIFIQUES PUBLIÉS CORRESPONDANTS À DES PARTIES TRAITÉES DANS CE VOLET.

8.3. VOLET 3 : DISTRIBUTION DES ÉLÉMENTS MÉTALLIQUES ; VARIATION DU POTENTIEL REDOX DU PH ET DE LA CONDUCTIVITÉ ÉLECTRIQUE AU COURS DU STOCKAGE DU TOPSOIL.

1- pH, conductivité électrique et potentiel d'oxydoréduction du topsoil de Goro stocké en andain et prélevé à 0, 50, 100 ou 150 cm sous la surface et stocké étalé (*)

Mois		***pH***	***CE(µS/cm)***	***E (mV)***
t=0	BS6 (0-20)	4,2	152,6	265
	BS6(20-40)	4,1	227,0	273
	tas	4,8	112,1	104
t=3	0	4,9	117,2	207
	50	5,1	74,9	189
	100	5,1	90,0	215
	150	5,1	94,3	197
	50*	5,2	77,3	207
t=6	0	5,1	74,2	103
	50	5,2	66,3	113
	100	5,0	114,6	139
	150	5,2	111,6	163
	50*	5,0	78,1	113
t=9	0	5,3	79,7	76
	50	5,2	74,0	74
	100	4,9	95,2	86
	150	5,2	81,9	88
	50*	5,1	61,2	74
t=12	0	4,9	70,7	76
	50	4,9	101,5	80
	100	4,8	237,0	87
	150	4,9	120,9	118
	50*	5,1	84,3	108
t=18	0	5,0	61,1	96
	50	5,1	53,6	153
	100	5,0	155,6	134
	150	5,0	76,5	108
	50*	4,8	68,7	90
t=24	0	5,2	105,9	101
	50	4,6	103,7	97
	100	4,7	85,9	99
	150	4,5	101,2	109
	50*	5,3	71,3	91
t=30	0	4,9	67,1	109
	50	4,4	113,5	170
	100	4,4	118,3	127
	150	4,3	212,0	134
	50*	4,6	52,9	162
t=36	0	4,8	53,5	129,3
	50	4,6	118,3	173,3
	100	4,4	79,0	128,1
	150	4,8	45,7	142,5
	50*	4,4	111,9	160,5

2- pH, conductivité électrique et potentiel d'oxydoréduction du topsoil de Tontouta stocké en andain et prélevé à 0, 50, 100 ou 150 cm sous la surface et stocké étalé (*)

Mois		***pH***	***CE(µS/cm)***	***E(mV)***
t=0	TS:0-20 cm	5,58	56,4	172
	TS :40-50cm	5,88	55,6	166
	t=0 (E1-0)	5,87	90,2	168
t=3	0	6,03	105,3	227
	50	5,57	104,7	180
	100	5,73	108,8	203
	150	5,97	106	219
	50*	6,1	152,4	219
t=6	0	6,397	97,6	177
	50	5,42	83,1	208
	100	5,82	78,8	204
	150	5,71	73,1	201
	50*	6,399	178,1	174
t=9	0	5,96	88	196
	50	6,41	116,2	228
	100	6,33	107	222
	150	5,85	105,8	210
	50*	6,19	91,8	214
t=12	0	5,6	97,8	220
	50	5,72	85,4	179
	100	5,7	94,7	226
	150	5,71	111,8	212
	50*	5,85	112,7	187
t=18	0	5,72	64,5	105
	50	5,71	56,5	74
	100	5,76	59,6	102
	150	5,67	85,8	105
	50*	6,1	57,7	101
t=24	0	5,49	37,7	126
	50	5,69	78,3	116
	100	6	59,4	76
	150	5,57	46,2	89
	50*	5,65	66,9	75

3- Concentrations en Cr(VI), Ni et Co soluble dans l'eau pour le topsoil de Goro stocké en andain et prélevé à 0, 50, 100 ou 150 cm sous la surface et stocké étalé (*).

Mois		Cr(VI) en ng/g	Ni en ng/g	Co en ng/g
t=0	BS6 (0-20cm)	3,8	23,8	nd
	BS6 (20-40cm)	11,2	26,6	nd
	tas	1,0	37,3	nd
t=3	0	14,0	36,2	8,7
	50	40,6	31,6	2,2
	100	6,7	30,5	3,4
	150	12,7	11,4	2,2
	50*	25,7	5,9	2,9
t=6	0	11,4	37,4	nd
	50	14,6	19,8	nd
	100	4,1	27,1	nd
	150	14,1	20,8	0,2
	50*	9,1	26,0	0,04
t=9	0	3,3	9,8	nd
	50	16,9	21,5	6,6
	100	18,7	23,8	1,8
	150	49,4	46,0	nd
	50*	23,6	12,8	nd
t=12	0	9,3	8,8	0,6
	50	9,5	8,1	0,1
	100	41,3	18,6	5,8
	150	51,5	12,3	0,3
	50*	18,2	9,9	nd
t=18	0	24,5	20,7	nd
	50	77,1	22,1	nd
	100	300,5	15,4	nd
	150	126,9	29,8	nd
	50*	102,5	26,1	nd
t=24	0	0,7	32,5	nd
	50	27,4	36,6	nd
	100	23,4	39,3	nd
	150	1,1	39,0	nd
	50*	10,5	24,0	0,2
t=30	0	102,0	18,2	nd
	50	100,9	9,2	n.d
	100	127,6	40,9	nd
	150	51,1	24,3	nd
	50*	0,0	17,1	n.d
t=36	0	63,7	32,0	nd
	50	79,6	37,0	nd
	100	74,7	49,9	nd
	150	0,0	12,4	nd
	50*	0,0	4,1	nd

n.d pour non détecté

4- Concentrations en Cr(VI), Ni et Co soluble dans l'eau pour le topsoil de Tontouta stocké en andain et prélevé à 0, 50, 100 ou 150 cm sous la surface et stocké étalé (*). n.d pour non détecté et n.a pour non analysé

Mois		Cr(VI) en ng/g	Ni en ng/g	Co en ng/g
t=0	tas	650,7	291,2	0,2
t=3	0	413,2	376,8	1,7
	50	534,1	196,2	26,4
	100	576,5	127,9	18,1
	150	489,8	133,6	4,2
	50*	1213,6	193,2	n.d
t=6	0	589,7	146,6	3,7
	50	463,8	77,4	1,2
	100	682,1	62,1	0,9
	150	641,1	97,9	1,5
	50*	502,4	311,3	3,1
t=9	0	558,6	283,0	1,7
	50	1274,3	129,1	8,3
	100	516,3	944,4	55,6
	150	416,2	258,5	30,9
	50*	520,6	195,7	11,0
t=12	0	666,8	233,0	14,2
	50	553,0	151,1	12,3
	100	313,0	312,4	6,0
	150	510,8	210,7	8,7
	50*	489,7	160,8	18,4
t=18	0	303,2	290,4	0,1
	50	439,3	356,3	0,6
	100	2155,5	207,1	1,3
	150	209,0	328,1	0,2
	50*	260,8	131,8	0,2
t=24	0	367,4	239,9	n.d
	50	332,7	221,3	n.d
	100	467,9	439,0	n.d
	150	453,2	520,5	n.d
	50*	426,6	433,9	n.d
t=30	0	n.a		
	50			
	100			
	150			
	50*			
t=36	0			
	50			
	100			
	150			
	50*			

5- Détermination des concentrations en éléments métalliques "biodisponibles" dans le sol des parcelles expérimentales - VOLET 3-Dynamique des métaux et de la matière organique in situ

Des échantillons de sol ont été prélevés sur le dispositif expérimental de GORO lors de 2 campagnes d'échantillonnage

Les mottes sont prélevées à la bêche, emballées et transportées au laboratoire. Les sacs sont ouverts et le sol rhizosphérique (adhérent aux racines et à proximité du système racinaire (moins de 1 cm)

1ère campagne le 27/05/2013, prélèvement sur les parcelles contenant les plants de Capolepis laurifolia (les plants de Tristaniopsis n'ont pas suffisamment poussé pour être prélevés) et prélèvement de sol non racinaire

n=4 pour chaque catégorie de sol rhizosphérique ("témoin" non inoculés/ plants endomycohrizés/"témoins avec boues/ endo+boues)

2ème campagne le 29/10/2013, prélèvement sur les parcelles contenant les plants de Carpolepis laurifolia, les plants de Tristaniopsis glauca et guillaini et prélèvement de sol non rhizosphérique

n=8 pour chaque catégorie de sol rhizosphérique ("témoin" non inoculés/ plants endomycohrizés/"témoins avec boues/endo+boues/ecto/ecto+boues)

La solution de lixiviation est préparée avec 1,967 g de DTPA+1,470g de CaCl2 pour un volume de 1L. pH ajusté à 7,3 par ajout de NaOH

20g de sol sont agités sur table ping-pong en présence de 40 mL de la solution de DTPA pendant 2h

Analyses des oncentrations en éléments métalliques dans les lixiviats de sol

Les concentrations sont déterminées par spectroscopie atomique flamme ou four (AA800 PerkinElmer) selon les gammes de concentrations

Les gammes d'étalonnage sont établies à partir de solution standards certifiées (PerkinElmer)

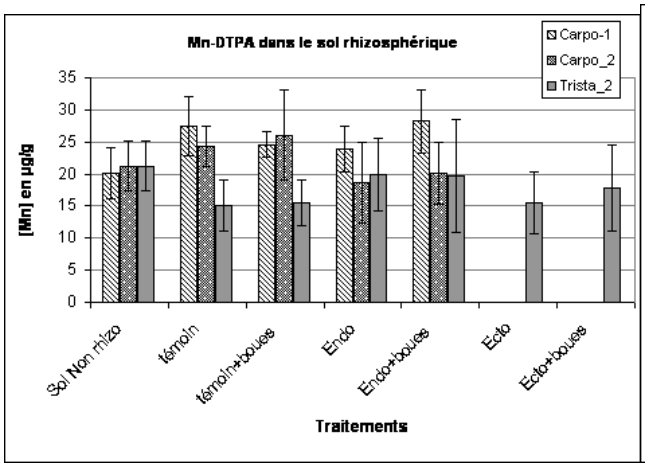
Les concentrations sont exprimées en µg/g (= mg/kg) de sol sec ou en ng/g (=µg/kg) de sol sec. IC sont les intervalles de confiance (alpha=0,05).

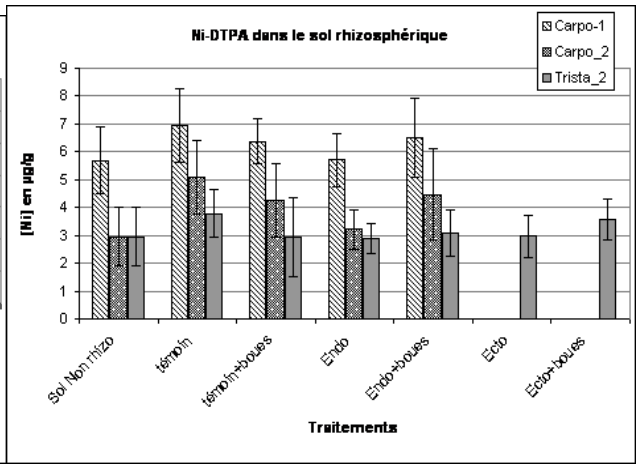
Carpo_1=résultats de la 1ère campagne pour le sol prélevé dans la rhizosphère de Carpolepis laurifolia

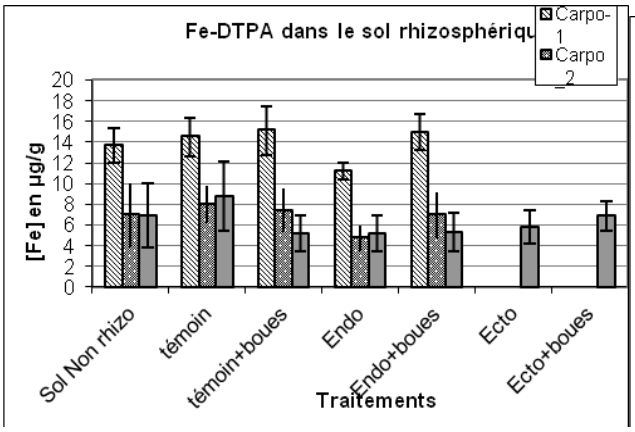
Carpo_2=résultats de la 2ème campagne pour le sol prélevé dans la rhizosphère de *Carpolepis laurifolia*

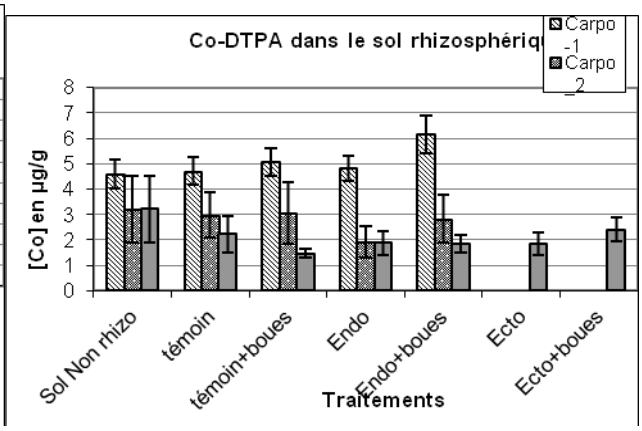
Trista_2=résultats de la 2ème campagne pour le sol prélevé dans le rhizosphère de *Tristaniopsis glauca* et *guillaini*

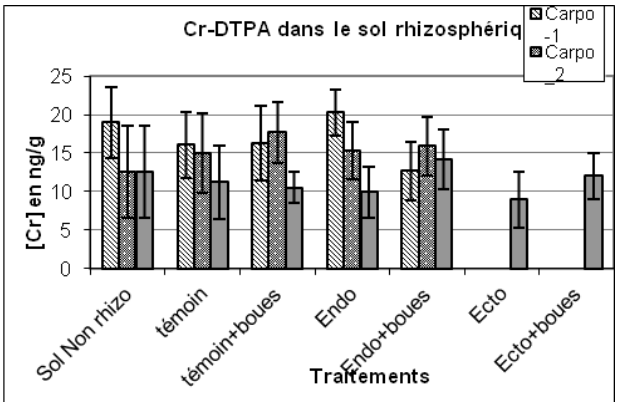
Mn µg/g	Carpo-1	IC	Carpo_2	IC	Trista_2	IC
Sol Non rhizo	**20,1**	4,0	**21,2**	3,9	**21,2**	3,9
témoin	**27,5**	4,6	**24,2**	3,2	**15,1**	3,9
témoin+boues	**24,6**	2,0	**26,1**	7,0	**15,5**	3,5
Endo	**23,9**	3,5	**18,6**	6,3	**19,9**	5,7
Endo+boues	**28,2**	5,0	**20,2**	4,8	**19,7**	8,7
Ecto					**15,6**	4,8
Ecto+boues					**17,8**	6,7
Fe µg/g	**Carpo_1**	IC	**Carpo_2**	IC	**Trista_2**	IC
Sol Non rhizo	**13,7**	1,7	**7,0**	3,1	**7,0**	3,1
témoin	**14,5**	1,8	**8,0**	1,8	**8,8**	3,3
témoin+boues	**15,1**	2,3	**7,4**	2,1	**5,2**	1,7
Endo	**11,2**	0,8	**4,7**	1,2	**5,2**	1,7
Endo+boues	**15,0**	1,7	**6,9**	2,2	**5,4**	1,9
Ecto					**5,8**	1,6
Ecto+boues					**6,9**	1,4
Cr ng/g	**Carpo_1**	IC	**Carpo_2**	IC	**Trista_2**	IC
Sol Non rhizo	**19,0**	4,6	**12,6**	6,0	**12,6**	6,0
témoin	**16,1**	4,3	**15,0**	5,2	**11,2**	4,8
témoin+boues	**16,3**	4,8	**17,7**	3,9	**10,5**	2,0
Endo	**20,3**	3,0	**15,3**	3,8	**9,9**	3,2
Endo+boues	**12,7**	3,8	**15,9**	3,8	**14,2**	3,9
Ecto					**8,9**	3,7
Ecto+boues					**12,1**	3,0
Ni µg/g	**Carpo_1**	IC	**Carpo_2**	IC	**Trista_2**	IC
Sol Non rhizo	**5,7**	1,2	**3,0**	1,0	**3,0**	1,0
témoin	**6,9**	1,3	**5,1**	1,3	**3,8**	0,9
témoin+boues	**6,4**	0,8	**4,3**	1,3	**2,9**	1,4
Endo	**5,7**	1,0	**3,2**	0,7	**2,9**	0,5
Endo+boues	**6,5**	1,4	**4,5**	1,7	**3,1**	0,8
Ecto					**3,0**	0,7
Ecto+boues					**3,6**	0,7
Co µg/g	**Carpo_1**	IC	**Carpo_2**	IC	**Trista_2**	IC
Sol Non rhizo	**4,6**	0,6	**3,2**	1,3	**3,2**	1,3
témoin	**4,7**	0,5	**3,0**	0,9	**2,2**	0,7
témoin+boues	**5,1**	0,5	**3,1**	1,2	**1,5**	0,2
Endo	**4,8**	0,5	**1,9**	0,6	**1,9**	0,5
Endo+boues	**6,1**	0,7	**2,8**	0,9	**1,8**	0,3
Ecto					**1,8**	0,4
Ecto+boues					**2,4**	0,5
Mg µg/g	**Carpo_1**	IC	**Carpo_2**	IC	**Trista_2**	IC
Sol Non rhizo	**1,3**	0,1	**2,0**	0,5	**2,0**	0,5
témoin	**1,2**	0,1	**2,9**	0,7	**2,4**	0,9
témoin+boues	**1,2**	0,1	**2,3**	0,6	**3,3**	0,7
Endo	**1,1**	0,1	**2,5**	0,8	**3,2**	0,6
Endo+boues	**1,3**	0,1	**2,1**	0,3	**2,2**	0,6
Ecto					**2,4**	0,7
Ecto+boues					**2,5**	1,0

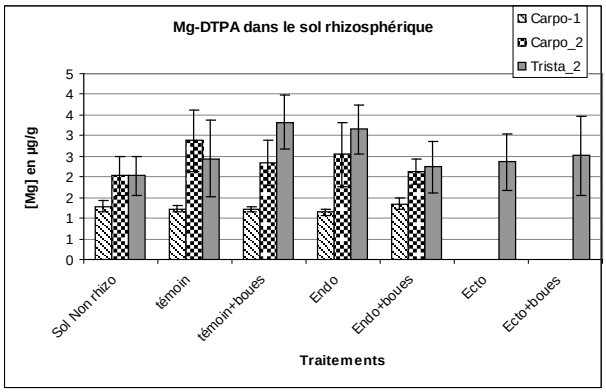

Mn-DTPA dans le sol rhizosphérique
Carpo-1
Carpo_2
Trista_2
[Mn] en µg/g
0
5
10
15
20
25
30
35
Sol Non rhizo
témoin
témoin+boues
Endo
Endo+boues
Ecto
Ecto+boues
Traitements


Ni-DTPA dans le sol rhizosphérique
Carpo-1
Carpo_2
Trista_2
[Ni] en µg/g
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Sol Non rhizo
témoin
témoin+boues
Endo
Endo+boues
Ecto
Ecto+boues
Traitements


Fe-DTPA dans le sol rhizosphériqu
Carpo-1
Carpo_2
[Fe] en µg/g
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Sol Non rhizo
témoin
témoin+boues
Endo
Endo+boues
Ecto
Ecto+boues
Traitements


Co-DTPA dans le sol rhizosphériqu
Carpo-1
Carpo_2
[Co] en µg/g
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Sol Non rhizo
témoin
témoin+boues
Endo
Endo+boues
Ecto
Ecto+boues
Traitements


Cr-DTPA dans le sol rhizosphériq
Carpo-1
Carpo_2
[Cr] en ng/g
0
5
10
15
20
25
Sol Non rhizo
témoin
témoin+boues
Endo
Endo+boues
Ecto
Ecto+boues
Traitements


Mg-DTPA dans le sol rhizosphérique
Carpo-1
Carpo_2
Trista_2
[Mg] en µg/g
0
1
2
3
4
5
Sol Non rhizo
témoin
témoin+boues
Endo
Endo+boues
Ecto
Ecto+boues
Traitements

Fonctionnement géochimique des topsoils

Eléments majeurs en wt% d'oxydes dans les échantillons.

< L.D. : teneur inférieure à la limite de détection. P.F. : perte au feu. SBH : sols bruns hypermagnésiens de Tontouta ; les autres sont des sols latéritiques de Goro.

Echantillon	SiO2	Al2O3	Fe2O3	MnO	MgO	CaO	Na2O	K2O	P2O5	PF	Total
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
TOP A	0,43	2,06	23,01	0,05	0,51	0,20	0,02	0,04	0,05	70,69	97,19
TOP B	0,62	5,77	60,83	0,11	0,54	< L.D.	< L.D.	0,03	0,08	25,73	94,15
SFFC 1	1,09	6,94	71,41	0,79	0,25	< L.D.	< L.D.	0,01	0,06	15,32	96,06
SFFC 2	1,36	6,58	70,89	0,58	0,38	< L.D.	< L.D.	0,02	0,05	15,21	95,18
SFFC 3	1,83	5,86	68,74	1,84	0,47	< L.D.	< L.D.	0,01	0,04	16,54	95,54
SFFP 1	3,42	8,15	65,44	0,44	0,82	0,04	< L.D.	0,02	0,06	17,28	95,82
SFFP 2	2,18	9,95	66,30	0,28	0,75	< L.D.	< L.D.	0,01	0,06	15,88	95,57
SFFP 3	10,81	5,54	55,85	1,08	3,64	< L.D.	0,02	0,01	0,03	18,18	95,21
GORO B	1,84	5,18	70,66	0,57	0,70	< L.D.	< L.D.	0,01	0,06	15,21	94,41
TOP T01	0,53	5,81	48,59	0,15	0,61	0,17	0,01	0,03	0,07	38,06	94,38
TOP T02	0,41	4,68	60,12	0,11	0,51	0,09	< L.D.	0,03	0,07	27,77	94,11
TOP T03	0,60	4,65	55,61	0,12	0,68	0,15	0,01	0,04	0,06	32,53	94,76
TOP T04	0,68	4,73	61,02	0,18	0,71	0,11	< L.D.	0,02	0,06	25,04	92,87
TOP T05	0,48	4,57	59,94	0,14	0,61	0,10	< L.D.	0,02	0,06	27,17	93,41
SBH 1	41,30	2,87	28,40	0,85	7,64	0,53	0,06	0,03	0,03	15,33	97,14
SBH 2	47,34	2,57	23,06	0,69	9,72	0,47	0,05	0,01	< L.D.	12,36	96,35
SBH 3	49,02	0,76	13,42	0,20	15,27	0,44	0,02	0,02	< L.D.	19,50	98,66

Eléments en traces (ET) les plus importants en ppm (µg/g) dans les échantillons et total de tous les ET analysés (non représentés) + MnO en wt%.

Echantillon	Co	Cr	Ni	MnO	Total des ET
	mg kg^{-1}			%	%
TOP A	47,04	13410	452,3	0,05	1,42
TOP B	130,7	40790	1126	0,11	4,28
SFFC 1	540	25412,5	4216	0,79	3,09
SFFC 2	672,4	22265	5551	0,58	2,92
SFFC 3	3184	22220	8038	1,84	3,43
SFFP 1	606,1	25495	5597	0,44	3,24
SFFP 2	615,5	22662,5	5922	0,28	2,99
SFFP 3	3405	24550	11780	1,08	4,05
GORO B	539,5	35310	5076	0,57	4,17
TOP T0 1	197,9	40780	1681	0,15	4,34
TOP T0 2	153	38830	1309	0,11	4,11
TOP T0 3	161,8	39510	1388	0,12	4,18
TOP T0 4	232,4	52860	1943	0,18	5,59
TOP T0 5	176,7	45540	1462	0,14	4,80
SBH 1	698,7	16625	4882	0,85	2,29
SBH 2	742,4	19177,5	3826	0,69	2,42
SBH 3	200,5	4559	5813	0,20	1,07

Mesures de CEC en mEq/100g de sol = cmol.kg-1 de sol.

Echantillon	Masse (g)	Volume (ml)	Normalité de l'échantillon (N)	CEC en mEq/100g	Moyenne CEC mEq/100g sur poids humide
TOPA	7,010	30,000	6,0570	19,528	20,078
TOPA'	7,010	30,000	2,5640	20,628	
TOPB	7,038	30,000	0,0360	5,953	5,964
TOPB'	7,037	30,000	0,0360	5,974	
SFFC1	7,001	30,000	0,0481	0,825	0,773
SFFC1'	7,006	30,000	0,0483	0,721	
SFFC2	7,001	30,000	0,0499	0,063	0,067
SFFC2'	7,001	30,000	0,0498	0,072	
SFFC3	7,000	30,000	0,0476	1,043	1,028
SFFC3'	7,000	30,000	0,0476	1,014	
SFFP1	7,001	30,000	0,0411	3,828	3,909
SFFP1'	7,004	30,000	0,0407	3,990	
SFFP2	7,002	30,000	0,0478	0,922	0,925
SFFP2'	7,001	30,000	0,0478	0,927	
SFFP3	7,010	30,000	0,0459	1,770	1,748
SFFP3'	7,006	30,000	0,0460	1,726	
GORO B	7,003	30,000	0,0464	1,528	1,545
GORO B'	7,001	30,000	0,0464	1,563	
TOPT01	7,003	30,000	0,0189	13,323	13,232
TOPT01'	7,003	30,000	0,0193	13,142	
TOPT02	7,015	30,000	0,0308	8,230	8,377
TOPT02'	7,016	30,000	0,0301	8,524	
TOPT03	7,012	30,000	0,0248	10,781	10,979
TOPT03'	7,013	30,000	0,0239	11,177	
TOPT04	7,001	30,000	0,0308	8,214	8,413
TOPT04'	7,001	30,000	0,0299	8,613	
TOPT05	7,000	30,000	0,0291	8,944	8,990
TOPT05'	7,001	30,000	0,0289	9,036	
SBH1	5,026	30,000	0,0098	24,009	24,120
SBH1'	5,026	30,000	0,0094	24,231	
SBH2	5,009	30,000	0,0126	22,411	22,447
SBH2'	5,010	30,000	0,0125	22,482	
SBH3	5,154	30,000	0,0002	28,979	28,987
SBH3'	5,153	30,000	0,0002	28,994	

Matrices des corrélation pour la paramètres des solutions d'extraction :

- NaNO3 (0,01 M)

	pH incubé	Al	Ca	Co	Cr	Fe	K	Mg	Mn	Ni	S	Si	Zn	TOC (mg l-1)	TIC (mg l-1)
pH incubé	1	-0,21	-0,41	-0,17	0,21	0,29	-0,03	**-0,51**	**-0,48**	-0,45	**0,55**	-0,06	**-0,57**	-0,11	0,42
Al	-0,21	1	-0,34	-0,33	**0,49**	0,32	0,27	**0,64**	-0,21	**0,77**	-0,29	0,27	0,04	**0,87**	0,14
Ca	-0,41	-0,34	1	**0,65**	-0,15	-0,30	-0,14	0,45	**0,92**	-0,21	0,04	0,27	**0,55**	-0,26	-0,37
Co	-0,17	-0,33	**0,65**	1	-0,29	-0,40	-0,15	0,23	0,43	-0,09	0,10	-0,04	0,33	-0,29	-0,18
Cr	0,21	**0,49**	-0,15	-0,29	1	**0,93**	0,38	0,28	-0,16	0,10	0,09	0,44	-0,08	**0,70**	**0,53**
Fe	0,29	0,32	-0,30	-0,40	**0,93**	1	0,18	0,00	-0,31	-0,05	0,03	0,29	-0,20	**0,48**	**0,53**
K	-0,03	0,27	-0,14	-0,15	0,38	0,18	1	0,11	-0,18	0,25	0,14	0,14	0,13	**0,53**	**0,48**
Mg	**-0,51**	**0,64**	0,45	0,23	0,28	0,00	0,11	1	**0,47**	**0,59**	-0,23	0,43	**0,53**	**0,56**	-0,24
Mn	**-0,48**	-0,21	**0,92**	0,43	-0,16	-0,31	-0,18	**0,47**	1	-0,07	-0,09	0,32	0,45	-0,17	-0,45
Ni	-0,45	**0,77**	-0,21	-0,09	0,10	-0,05	0,25	**0,59**	-0,07	1	**-0,53**	-0,03	0,20	**0,65**	-0,04
S	**0,55**	-0,29	0,04	0,10	0,09	0,03	0,14	-0,23	-0,09	**-0,53**	1	0,44	-0,13	-0,10	0,10
Si	-0,06	0,27	0,27	-0,04	0,44	0,29	0,14	0,43	0,32	-0,03	0,44	1	0,32	0,35	-0,26
Zn	**-0,57**	0,04	**0,55**	0,33	-0,08	-0,20	0,13	**0,53**	0,45	0,20	-0,13	0,32	1	-0,02	-0,35
TOC (mg l-1)	-0,11	**0,87**	-0,26	-0,29	**0,70**	**0,48**	**0,53**	**0,56**	-0,17	**0,65**	-0,10	0,35	-0,02	1	0,36
TIC (mg l-1)	0,42	0,14	-0,37	-0,18	**0,53**	**0,53**	**0,48**	-0,24	-0,45	-0,04	0,10	-0,26	-0,35	0,36	1

En gras, valeurs significatives (hors diagonale) au seuil alpha=0,05 (test bilatéral)

- Citrate (0,01 M)

	pH incubé	Al	Ca	Co	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Ni	P	S	Zn	TOC (mg l-1)	TIC (mg l-1)
pH incubé	1	0,06	0,04	-0,05	0,20	0,34	0,25	0,01	0,06	0,10	0,32	-0,41	0,09	-0,07	**0,51**	0,28
Al	0,06	1	**-0,80**	-0,40	0,45	**0,66**	0,40	**-0,56**	-0,07	-0,23	**0,84**	0,42	**0,50**	0,00	-0,21	0,04
Ca	0,04	**-0,80**	1	0,46	**-0,51**	**-0,62**	-0,33	**0,67**	0,21	0,44	**-0,64**	-0,36	**-0,53**	0,28	0,21	0,18
Co	-0,05	-0,40	0,46	1	-0,25	-0,45	-0,08	0,02	-0,17	0,02	-0,41	-0,26	-0,20	0,12	-0,07	-0,06
Cr	0,20	0,45	**-0,51**	-0,25	1	0,21	**0,85**	**-0,55**	**-0,60**	0,29	**0,47**	-0,25	**0,98**	0,15	**-0,51**	-0,07
Cu	0,34	**0,66**	**-0,62**	-0,45	0,21	1	0,20	-0,29	0,20	-0,29	**0,72**	0,31	0,20	-0,19	0,24	-0,19
Fe	0,25	0,40	-0,33	-0,08	**0,85**	0,20	1	-0,40	**-0,49**	0,08	**0,54**	-0,18	**0,78**	0,29	-0,39	-0,09
K	0,01	**-0,56**	**0,67**	0,02	**-0,55**	-0,29	-0,40	1	**0,64**	0,16	-0,39	0,05	**-0,61**	0,02	**0,60**	0,05
Mg	0,06	-0,07	0,21	-0,17	**-0,60**	0,20	**-0,49**	**0,64**	1	-0,14	0,20	0,43	**-0,60**	-0,02	**0,72**	-0,09
Mn	0,10	-0,23	0,44	0,02	0,29	-0,29	0,08	0,16	-0,14	1	-0,19	-0,46	0,35	0,12	-0,18	0,00
Ni	0,32	**0,84**	**-0,64**	-0,41	**0,47**	**0,72**	**0,54**	-0,39	0,20	-0,19	1	0,31	0,46	0,15	0,03	-0,06
P	-0,41	0,42	-0,36	-0,26	-0,25	0,31	-0,18	0,05	0,43	-0,46	0,31	1	-0,21	-0,05	0,17	-0,10
S	0,09	**0,50**	**-0,53**	-0,20	**0,98**	0,20	**0,78**	**-0,61**	**-0,60**	0,35	0,46	-0,21	1	0,16	**-0,59**	-0,10
Zn	-0,07	0,00	0,28	0,12	0,15	-0,19	0,29	0,02	-0,02	0,12	0,15	-0,05	0,16	1	-0,39	**0,49**
TOC (mg l-1)	**0,51**	-0,21	0,21	-0,07	**-0,51**	0,24	-0,39	**0,60**	**0,72**	-0,18	0,03	0,17	**-0,59**	-0,39	1	-0,01
TIC (mg l-1)	0,28	0,04	0,18	-0,06	-0,07	-0,19	-0,09	0,05	-0,09	0,00	-0,06	-0,10	-0,10	**0,49**	-0,01	1

En gras, valeurs significatives (hors diagonale) au seuil alpha=0,05 (test bilatéral)

- EDTA (0,01 M)

	pH incubé	Al	Ca	Co	Cr	Cu	K	Mg	Mn	Na	Ni	S	Si	Zn	TOC (mg l-1)	TIC (mg l-1)
pH incubé	1	-0,32	-0,34	0,13	**0,58**	**0,52**	0,32	**-0,64**	-0,30	-0,32	-0,19	0,21	0,22	0,43	0,41	0,31
Al	-0,32	1	-0,35	-0,39	-0,14	0,15	-0,15	0,08	-0,23	**0,98**	0,37	-0,08	-0,16	-0,17	-0,02	-0,04
Ca	-0,34	-0,35	1	**0,52**	-0,32	-0,32	0,07	**0,55**	**0,79**	-0,24	-0,26	-0,30	-0,10	-0,10	-0,30	-0,25
Co	0,13	-0,39	**0,52**	1	-0,36	-0,14	0,02	0,16	0,16	-0,28	-0,35	-0,14	-0,22	-0,07	-0,21	-0,28
Cr	**0,58**	-0,14	-0,32	-0,36	1	0,37	0,41	-0,31	-0,24	-0,16	0,05	-0,13	0,03	**0,48**	**0,65**	**0,63**
Cu	**0,52**	0,15	-0,32	-0,14	0,37	1	0,34	-0,09	-0,28	0,10	0,39	0,01	0,26	0,33	**0,64**	-0,08
K	0,32	-0,15	0,07	0,02	0,41	0,34	1	0,21	-0,02	-0,15	0,17	-0,21	0,17	**0,70**	0,41	-0,17
Mg	**-0,64**	0,08	**0,55**	0,16	-0,31	-0,09	0,21	1	0,34	0,07	**0,48**	**-0,54**	-0,36	0,09	0,07	-0,39
Mn	-0,30	-0,23	**0,79**	0,16	-0,24	-0,28	-0,02	0,34	1	-0,17	-0,30	-0,14	0,16	-0,23	-0,42	-0,17
Na	-0,32	**0,98**	-0,24	-0,28	-0,16	0,10	-0,15	0,07	-0,17	1	0,21	-0,07	-0,18	-0,25	-0,09	-0,02
Ni	-0,19	0,37	-0,26	-0,35	0,05	0,39	0,17	**0,48**	-0,30	0,21	1	-0,36	-0,21	0,46	**0,57**	-0,23
S	0,21	-0,08	-0,30	-0,14	-0,13	0,01	-0,21	**-0,54**	-0,14	-0,07	-0,36	1	**0,79**	-0,31	-0,44	0,29
Si	0,22	-0,16	-0,10	-0,22	0,03	0,26	0,17	-0,36	0,16	-0,18	-0,21	**0,79**	1	-0,05	-0,25	0,08
Zn	0,43	-0,17	-0,10	-0,07	**0,48**	0,33	**0,70**	0,09	-0,23	-0,25	0,46	-0,31	-0,05	1	**0,65**	-0,02
TOC (mg l-1)	0,41	-0,02	-0,30	-0,21	**0,65**	**0,64**	0,41	0,07	-0,42	-0,09	**0,57**	-0,44	-0,25	**0,65**	1	0,08
TIC (mg l-1)	0,31	-0,04	-0,25	-0,28	**0,63**	-0,08	-0,17	-0,39	-0,17	-0,02	-0,23	0,29	0,08	-0,02	0,08	1

En gras, valeurs significatives (hors diagonale) au seuil alpha=0,05 (test bilatéral)


UNIVERSITÉ
de la
NOUVELLE-CALÉDONIE

CNRT "Nickel et son environnement"

Tome Nickel et Environnement

