



HAL
open science

Contribution de la symbiose fixatrice d'azote dans l'adaptation d'une légumineuse à des sols contrastés : le modèle *Acacia spirorbis* et les contraintes édaphiques extrêmes rencontrées en Nouvelle-Calédonie

Bryan Vincent

► **To cite this version:**

Bryan Vincent. Contribution de la symbiose fixatrice d'azote dans l'adaptation d'une légumineuse à des sols contrastés : le modèle *Acacia spirorbis* et les contraintes édaphiques extrêmes rencontrées en Nouvelle-Calédonie. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONTG050 . tel-01993142

HAL Id: tel-01993142

<https://theses.hal.science/tel-01993142v1>

Submitted on 24 Jan 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR
DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER**

En Biologie des interactions

Ecole Doctorale GAÏA

Unité Mixte de recherche : Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes

Contribution de la symbiose fixatrice d'azote dans l'adaptation d'une légumineuse à des sols contrastés : le modèle *Acacia spirorbis* et les contraintes édaphiques extrêmes rencontrées en Nouvelle-Calédonie.

Présentée par Bryan VINCENT

Le 24 Octobre 2018

Sous la direction de Dr Philippe JOURAND (IRD, UMR LSTM)

et Dr Farid JUILLOT (IRD, UMR IMPMC)

Devant le jury composé de

Corinne LEYVAL, Dr, Université de Lorraine-CNRS

Rapporteur

Daniel WIPF, Pr, Université de Bourgogne-INRA

Rapporteur

Hamid AMIR, Pr, Université de Nouvelle-Calédonie

Examineur

Maria FERNANDEZ, Pr, Université Claude Bernard Lyon 1

Examineur

Brigitte BRUNEL, Pr, Université de Montpellier

Référente ED GAÏA et Présidente du jury

Philippe JOURAND, Dr, IRD-LSTM

Représentant direction de thèse



**UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER**

« L'excellence est un art que l'on n'atteint que par l'exercice constant. Nous sommes ce que nous faisons de manière répétée. L'excellence n'est donc pas une action mais une habitude. »

Aristote

« Ce serait si merveilleux de vivre tous ensemble, dans ce monde libéré de poisons et de miasmes... Mais si les hommes de maintenant connaissaient son existence... Ils commenceraient encore à croire qu'ils en sont les maîtres... Ils dévoreraient cette terre naissante et fragile et répéteraient sans cesse les mêmes folies. »

Nausicaä de la vallée du vent, Tome 6 de Hayao Miyazaki

Résumé :

Acacia spirorbis est une légumineuse endémique de Nouvelle-Calédonie se développant sur des sols calcaires, métallifères et volcano-sédimentaires, établissant des symbioses avec des bactéries fixatrices d'azote. Pour comprendre la contribution de la symbiose dans l'adaptation de la plante à des milieux contrastés et parfois extrêmes, nous avons évalué la fixation d'azote en conditions naturelles, caractérisé les rhizobia associés à cette plante et analysé la réponse adaptative de la plante aux éléments traces métalliques dans ses tissus racinaires, notamment au niveau des nodules.

Nous avons mis en évidence que la symbiose rhizobienne fournissait plus de 80% de l'azote total chez des populations naturelles d'*A. spirorbis* se développant sur des sites d'études présentant des sols calcaires, métallifères et volcano-sédimentaires. Cette valeur est remarquable puisque chez *A. mangium*, *A. melanoxylon* et *A. mucronata*, les valeurs moyennes sont respectivement de 50%, 43% et 58%. Les rhizobia symbiotiques associés à *A. spirorbis* appartiennent aux α - et β -protéobactéries, genres *Bradyrhizobium* et *Paraburkholderia*, révélant ainsi une très large gamme de symbiontes et une faible sélectivité de partenaire. De manière remarquable, la taxonomie et la phénotypie de ces souches sont structurées et adaptées aux conditions édaphiques. Enfin, les signatures chimiques des tissus internes des nodules reflètent les propriétés chimiques des sols dans lesquels ils se sont développés, indiquant une potentielle gestion des éléments traces métalliques dans ces tissus.

Tous ces éléments suggèrent que la symbiose fixatrice d'azote contribue de manière significative dans l'adaptation d'*Acacia spirorbis* à des sols contrastés et pouvant présenter une toxicité polymétallique extrême.

Mots-clés : *Acacia spirorbis* - fixation d'azote - *Bradyrhizobium* - *Paraburkholderia* - éléments traces métalliques - contraintes édaphiques - Nouvelle-Calédonie

Abstract:

Acacia spirorbis is a leguminous tree from New Caledonia naturally found on a wide range of soils (calcareous, ultramafic and volcano-sedimentary) and able to establish symbioses with soil microorganisms, including nitrogen-fixing bacteria. The contribution of this symbiosis in the plant adaptation to contrasted edaphic environments, sometimes extremes, has been investigated according to i) the nitrogen-fixing potential of *A. spirorbis* in its natural ecosystems, ii) the characterization of its rhizobia and iii) the plant adaptive response to heavy metals inside its roots tissues, especially in nodules.

Therefore, we revealed that the nitrogen-fixing symbiosis provided more than 80% of the plant total nitrogen in natural population naturally occurring on calcareous, ultramafic and volcano-sedimentary soils. This value is top notch among other *Acacia* species, where *A. mangium*, *A. melanoxylon* and *A. mucronata* presented mean values of 50%, 43% and 58%, respectively. *Acacia spirorbis* established nitrogen-fixing symbioses with α - and β -proteobacteria, genus *Bradyrhizobium* and *Paraburkholderia*, respectively, thus revealing a wide range of symbiotic partner and a low selectivity. Noteworthy, the taxonomy and phenotypes of these symbionts are structured and adapted to edaphic parameters. Finally, chemical signatures of internal nodules tissues presented similarities with soils chemical properties, thus indicating a potential management of heavy metals inside these tissues.

Altogether, these data suggest that the nitrogen-fixing symbiosis might significantly contributes to *Acacia spirorbis* adaptation towards contrasted soils with strong edaphic conditions as an extreme polymetallic toxicity.

Key-words: *Acacia spirorbis* - nitrogen fixation - *Bradyrhizobium* - *Paraburkholderia* - heavy metals - edaphic constraints - New Caledonia

Remerciements :

Je tiens d'abord à remercier très respectueusement les membres du jury d'avoir accepté l'évaluation de ce travail de thèse : Dr Corinne LEYVAL et Pr Daniel WIPF, je vous remercie très sincèrement d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et d'avoir examiné dans les détails ce manuscrit de thèse. Je remercie également très chaleureusement le Pr Hamid AMIR, pour sa contribution durant mes comités de suivi thèse en partageant son expérience concernant les symbioses.

Je remercie beaucoup le Pr Brigitte BRUNEL, d'avoir accepté d'endosser à la fois le rôle de référente de l'école doctorale GAÏA, mais également de la représentation du laboratoire du LSTM. Je me souviens encore du jour où Brigitte a évalué mon stage de Master 1, puis de l'année suivante où elle m'a préparé au concours de l'école doctorale GAÏA. Tu as toujours été bienveillante à mon égard, merci Brigitte.

J'adresse ensuite mes remerciements à ceux qui m'ont dirigé et encadré durant ce travail de thèse.

Philippe JOURAND, mon directeur de thèse qui est une personne très attachante avec qui il est facile de travailler. Très rigoureux dans ses démarches et soucieux de mon bien être, il a su diriger ma thèse avec efficacité, tout en me laissant une certaine marge de liberté. Je me souviens du weekend que l'on a passé sur Lifou et à mon avis, une fameuse citation des Valseuses aurait bien sa place ici ! Merci Philippe.

Farid JUILLOT, mon co-directeur de thèse spécialiste de la minéralogie, a toujours été présent pour corriger mon travail lors des rapports de comité de thèse. C'est un passionné de géologie et je me souviens encore de son récit sur l'histoire de la formation géologique de l'archipel néo-calédonien. Tu as fait l'effort de ne pas utiliser de termes trop spécialisés pour moi et je t'en remercie ! Merci Farid.

Antoine GALIANA, encadrant de ma thèse qui m'a vu débarquer lors de mon stage de Master 2. Moults fois, je suis entré dans son bureau plein de questions sur la fixation d'azote ; j'en suis ressorti avec plein de réponses. Spécialiste de la fixation d'azote et féru de Comté jurassien, c'est avec lui que j'ai publié mon tout premier article sur *Acacia spirorbis*, chose que l'on n'oublie pas. Merci Antoine.

Marc DUCOUSSO, qui m'a ouvert les portes du LSTM durant mon stage de Master 1. Pour ne pas réinventer la roue, j'écrivais déjà dans mon rapport de stage que son encadrement fiable, ses poignées de mains, sa bonne humeur de tous les jours et sa facilité d'échange m'ont permis de découvrir un peu plus ce qu'est le métier de chercheur. Il n'en a jamais été plus vrai. Merci Marc.

J'aimerais également remercier Alain GIVAUDAN, qui a gardé un œil bienveillant sur moi depuis la première année de Master, la préparation pour le concours de l'école doctorale, jusqu'aux comités de suivi de thèse. Fait surprenant, nous sommes passés par le même lycée jurassien du Pré Saint Sauveur à Saint-Claude, capitale de la pipe et du diamant.

Mes remerciements s'adressent ensuite à Claude PLASSARD, qui a également suivi mon parcours sur Montpellier. Rencontre lors de ma soutenance en stage de Master 2, puis invitée dans mes comités de

suivi de thèse, elle a toujours été bienveillante envers mon travail et ma personne et je la remercie.
Merci Claude.

J'aimerais remercier ensuite trois personnes qui n'ont pas participé à ce travail de thèse mais sans qui je ne se serais peut-être pas là aujourd'hui. Elisa TASCHEN, Franck RICHARD et Marc-André SELOSSE qui m'ont donné goût à la recherche lors de mon stage de Master 1 au CEFÉ-CNRS. Où que vous soyez aujourd'hui comme dans le futur, j'aurai toujours une pensée agréable en me remémorant les moments passés ensemble, merci à vous.

Mon séjour en Nouvelle-Calédonie n'a pas été de tout repos et je tiens à remercier tous ceux qui ont été d'un soutien inestimable. Ma mémoire n'étant pas parfaite, je m'excuse par avance si j'oublie certain(e)s d'entre vous mais sachez que le fait de vous avoir côtoyé a fait de moi la personne que je suis aujourd'hui, merci.

Anne HOULES, collègue ayant travaillé sur l'*Acacia spirorbis* et très bonne amie, tu as toujours été là pour moi, aussi bien dans les bons que dans les mauvais moments. Je ne sais pas quoi dire de plus si ce n'est que notre amitié perdurera, peu importe le temps et la distance.

Julia SOEWARTO, collègue très attachante et toujours présente pour me donner des conseils du côté obscur. Un jour, nous irons manger des sushis au Japon ! On est peut être sur deux hémisphères différents mais j'aurai toujours une pensée pour toi.

Magali DAVID, collègue de bureau à l'IRD. Tu as toujours été très souriante et une source de bonne humeur. Pour moi, tu as réussi l'exploit d'apporter toujours plus de soleil ! Merci beaucoup.

Kelly LETELLIER, bonne amie de l'IAC, partenaire de tarot, chasseuse invétérée de Pokémons, on s'amusait tout le temps quand tu étais dans les parages ! Au plaisir de te revoir un jour.

David GIGANTE, frère spirituel. C'était un plaisir de pouvoir partager notre vision de ce monde et de ce qui est alternatif. Grâce à toi je me sens un peu moins seul dans ma façon de voir les choses. Merci à toi !

Géraldine BIDAU et Sarah GIGANTE, pour leur bonne humeur. Toujours le sourire aux lèvres, c'était très agréable de vous côtoyer pendant ce séjour !

Robin CIROU, fêru de tarot, Brassens et de randonnées. Tu connais tous les bons coins nature pour les sorties, c'était génial ! Je me rappellerai de nos parties de tarot et de « Marius, tu me fends le cœur ! ».

François JOUSSEMET, compagnon de chasse Pokémons et partenaire de randonnées. On en a marché des kilomètres ensemble avec nos téléphones ! Bonne continuation à toi.

Clarisse MAJOREL, pour m'avoir enseigné et partagé son savoir-faire concernant les extractions d'ARN à l'ancienne.

J'aimerais également remercier les personnes du Laboratoire des Moyens Analytiques (unité IMAGO, IRD), à savoir Léocadie JAMET et Laurent MILLET pour leur bienveillance et dépannage lors des expériences et analyses de nos échantillons. Merci à vous deux.

De retour en France, mon aventure continue au LSTM à Montpellier durant 2 années, où j'ai également pu côtoyer de nombreuses personnes.

Johan QUILBE, doctorant du LSTM, avec qui je me sens à l'aise. Que ce soit dans une game d'Overwatch, en soirée ou lors d'un combat souple, j'apprécie beaucoup les moments passés avec toi.

Albin TEULET, doctorant arachnophile du LSTM. Que cela te plaise ou non, je garderai comme image de toi tes cheveux roux virevoltants au gré du vent sur le terrain de Volleyball et le fond d'écran de ton chat trop mignon.

Doriane DIJON, doctorante Martiniquaise du LSTM et initiée aux mots fléchés. C'est un plaisir de partager le même bureau pendant cette période de rédaction et de rigoler à l'extérieur du laboratoire !

Romy AZAR, doctorante Libanaise du LSTM. Je me demande encore où tu puises toute cette énergie. Tu pourrais m'en passer un peu ? J'adore écouter tes histoires sur le Liban. Merci à toi d'être là !

Noémie GERBERT, étudiante en Master 2 IMHE. Tu as été ma première stagiaire au laboratoire et je garderai un très bon souvenir de toi. Tu m'as donné un coup de main pour mes expériences. C'était un vrai plaisir de t'encadrer et je suis confiant quant à ton avenir professionnel. Bonne continuation et merci à toi.

Clara ZAREMSKI, doctorante à AGAP. Ta bonne humeur me remonte le moral quand j'en ai besoin. Toujours partante pour une pause-café, tu peux compter sur moi.

J'ai côtoyé et apprécié tant de thésard/stagiaires/permanents que je n'ose pas les compter mais certains d'entre eux/elles m'auront marqué. Pour n'en citer que certains, je pense à Alexandre BOURLES, Camille CRETEL, Benoit DUONG, Coline SCIALLANO, Mamadou MBAYE, Audrey GUICHEMERRE, Manon HERVE, Flavie CUSSONNEAU, Thomas BENICHO, Zohra REGAGUI et j'en passe... Un grand Merci à Maïwenn L'HOIR d'avoir pris le temps de relire ce manuscrit et de corriger tout ce texte. J'aimerais également remercier Nicolas et Estelle BUSSET-TOURNIER pour tous les bons moments passés ensemble. Robin DUPONNOIS et Yves PRIN pour m'avoir accueilli au sein du LSTM durant ces 3 années. Une attention particulière pour Naïma REZKALLAH, toujours à l'écoute et bienveillante envers les stagiaires et moi. Clémence CHAINTREUIL, ma reine qui m'aura couronnée deux années de suite.

Pour terminer ces remerciements (enfin !), je les dédie à ma famille et à mes amis proches, sans qui la vie serait trop fade. Jérémy BOURGEOIS et David DESTERBECQ, toujours là depuis plus d'une dizaine d'années. En attendant le retour d'Antoine DANIEL, longue vie au MIC ! Frédéric AUBRIET pour sa bienveillance depuis toutes ces années. A mes parents Alain et Yasmina VINCENT, à qui j'ai tenté maintes fois d'expliquer mon sujet de thèse, qui ont toujours été fiers de mon travail et là pour moi.

1. Introduction générale	17
1.1 Contexte	18
1.2 Objectifs des travaux de thèse et organisation du manuscrit.....	22
2. Synthèse bibliographique	26
2.1 Les symbioses chez les légumineuses	28
2.1.1 L'azote.....	28
2.1.2 Les grands types de symbioses.....	30
2.1.3 Les légumineuses : généralités et taxonomie	32
2.1.4 Le genre <i>Acacia</i> au sens large	34
2.1.5 Le genre <i>Acacia</i> Mill. <i>sensus stricto</i>	36
2.2 Les rhizobia.....	38
2.2.1 Découverte et taxonomie.....	38
2.2.2 Méthodes d'isolement des rhizobia	40
2.2.3 Mécanismes symbiotiques classiques	42
2.2.3.1 Mise en place du nodule via un dialogue moléculaire	42
2.2.3.2 La différenciation en bactéroïdes et le maintien de la symbiose.....	42
2.2.3.3 La symbiose fixatrice d'azote.....	44
2.2.4 Autres stratégies établissant des symbioses rhizobium-légumineuse	44
2.2.5 Méthodes d'estimation de la fixation d'azote	44
2.3 Influence des paramètres environnementaux sur les plantes et microorganismes	48
2.3.1 Le développement des plantes en fonction de l'environnement.....	48
2.3.2 La phytotoxicité métallique.....	50
2.3.3 Les effets des paramètres environnementaux sur les microorganismes du sol	52
2.3.3 Les effets des éléments traces métalliques sur les microorganismes du sol.....	54
2.3.3 La symbiose fixatrice d'azote en fonction des conditions environnementales.....	54
2.4 Les associations rhizobia- <i>Acacia</i>	56
2.5 La Nouvelle-Calédonie et <i>Acacia spirorbis</i>	58
2.5.1 Un <i>hotspot</i> de la biodiversité.....	58
2.5.2 Une population d' <i>Acacia spirorbis</i> subsp. <i>spirorbis</i> endémique de l'archipel	60
2.5.3 <i>Acacia spirorbis</i> : écologie, feux et utilisation.....	62
2.5.4 Les différents types de symbioses chez <i>Acacia spirorbis</i>	64
2.5.5.1 Le cortège ectomycorhizien d' <i>Acacia spirorbis</i>	64
2.5.5.2 Les rhizobia associés à <i>Acacia spirorbis</i>	66
3. Premier chapitre : Evaluation du potentiel fixateur d'azote d'<i>A. spirorbis</i> en conditions naturelles	68
3.1 Introduction.....	70
3.2 Méthodologie : évaluer le potentiel fixateur d'azote d' <i>A. spirorbis</i>	70

3.3 Les sites d'étude : description des profils de sol	72
3.3.1 Les sols de type argilo-siliceux	72
3.3.1 Les sols de type ferralitiques	74
3.3.1 Les sols de type alumino-calciques	76
3.4 Les cortèges de plantes compagne non-fixatrice d'azote	76
3.5 Principales données obtenues et leur analyse	78
3.6 L'article Vincent <i>et al.</i> , 2018, paru dans <i>European Journal of Soil Biology</i>	79
3.7 Figures et tableaux supplémentaires de l'article Vincent <i>et al.</i> (2018)	91
3.8 Résumé des résultats majeurs.....	96
3.8.1 Les teneurs en azote chez <i>A. spirorbis</i> et les espèces de référence	96
3.8.2 Les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ chez <i>A. spirorbis</i> et les espèces de référence	96
3.8.3 L'estimation du %Ndfa chez <i>A. spirorbis</i> en fonction des types de sol	96
3.9 Discussion	98
3.9.1 Les teneurs en azote foliaire chez <i>A. spirorbis</i> versus les plantes compagnes	98
3.9.2 Les abondances en ^{15}N : un élément marqueur d'un fort potentiel fixateur d'azote ...	98
3.9.3 Le potentiel fixateur d'azote d' <i>Acacia spirorbis</i> versus d'autres légumineuses	100
3.9.4 La symbiose fixatrice d'azote chez <i>A. spirorbis</i> est performante dans des sols contrastés	100
3.10 Conclusion sur le potentiel fixateur d'azote d' <i>A. spirorbis</i> en conditions naturelles	102
4. Deuxième chapitre : Caractérisation des rhizobia associés à <i>A. spirorbis</i>	104
4.1 Liste des figures et tableaux du chapitre	105
4.2 Introduction	106
4.3 Méthodologie.....	108
4.4 Manuscrit du projet de deuxième article	110
4.4.1 <i>Introduction</i>	112
4.4.2 <i>Material and methods</i>	114
4.4.2.1 <i>Study sites and soil sampling</i>	114
4.4.2.2 <i>Isolation of bacterial strains</i>	116
4.4.2.3 <i>Molecular methods</i>	116
4.4.2.4 <i>Phylogenetic analyses</i>	118
4.4.2.5 <i>Plant nodulation and symbiotic efficiency tests</i>	118
4.4.2.6 <i>Metal tolerance test</i>	120
4.4.2.7 <i>Statistical analyses</i>	120
4.4.2.8 <i>Nucleotide sequence accession numbers</i>	122
4.4.3 <i>Results</i>	122
4.4.3.1 <i>Soil properties of the study sites</i>	122
4.4.3.2 <i>Molecular characterization of the strains</i>	124

4.4.3.3	<i>Symbiotic efficiency of <u>Bradyrhizobium</u> and <u>Paraburkholderia</u> strains</i>	124
4.4.3.4	<i>Symbiotic efficiency of the strains in relationship with the soil type</i>	128
4.4.3.5	<i>Metal tolerance of <u>A. spirorbis</u> symbionts</i>	128
4.4.4	<i>Discussion</i>	132
4.4.4.1	<i>The broad symbiotic promiscuity of <u>Acacia spirorbis</u></i>	132
4.4.4.2	<i>Relying on symbiotic promiscuity for adaptation to contrasted soils</i>	134
4.4.5	<i>Conclusions</i>	138
4.4.6	<i>Acknowledgments</i>	138
4.5	Résultats majeurs du deuxième chapitre	140
4.5.1	Un large degré d'intimité symbiotique chez <i>A. spirorbis</i>	140
4.5.2	Les spécificités de la fixation d'azote entre <i>Bradyrhizobium</i> et <i>Paraburkholderia</i>	142
4.5.3	Relation entre l'origine du sol et le fonctionnement de la symbiose fixatrice de N ₂	144
4.5.4	Tolérance aux éléments traces métalliques	146
4.6	Discussion	148
4.6.1	Le large degré « d'intimité » symbiotique chez <i>Acacia spirorbis</i>	148
4.6.2	L'utilité de posséder un large degré « d'intimité » symbiotique chez <i>A. spirorbis</i> pour pouvoir s'adapter à des sols métallifères et volcano-sédimentaires	152
4.7	Conclusion	156
4.7	Figures supplémentaires du projet d'article	156
5. Troisième chapitre : Gestion potentielle des éléments traces métalliques dans les organes fixateurs d'azote chez <i>A. spirorbis</i>		
5.1	Introduction	166
5.1.1	Contexte de l'étude	166
5.1.2	Méthodologie	168
5.1.3	Approches effectuées pour décrire une gestion potentielle des ETM	168
5.2	Première approche : dosage des ETM dans les nodules et comparaison au type de sol	170
5.2.1	Problématique et méthodologie	170
5.2.2	Résultats	172
5.2.1	Discussion	174
5.3	Deuxième approche : histolocalisation des ETM dans les nodules et racines	176
5.3.1	Problématique et méthodologie	176
5.3.2	Résultats	178
5.3.2.1	Histolocalisation des ETM dans les racines et nodules	178
5.3.2.2	Détection de structures minérales dans les tissus végétaux chez <i>A. spirorbis</i>	180
5.3.3	Discussion	180
5.4	Troisième approche : quantification des ETM dans les tissus internes et les parois des nodules	182
5.4.1	Problématique et méthodologie	182

5.4.2 Résultats	186
5.4.2.1 Comparaison des dosages effectués par ICP-OES avec les dosages effectués par ICP-AL	186
5.4.2.2 Caractérisation de la signature en éléments chimique des nodules chez <i>Acacia spirorbis</i> par ICP-AL.....	
5.4.3 Discussion	188
5.5 Quatrième approche : le flux d'ETM entre le sol, les racines, les tissus internes et les parois de nodules chez <i>A. spirorbis</i>	190
5.4.1 Problématique et méthodologie.....	190
5.4.2 Résultats	192
5.4.3 Discussion	194
5.5 Discussion et conclusion des données du troisième chapitre	196
6. Synthèse des résultats obtenus et discussion générale	197
6.1 Rappel de l'hypothèse générale du travail de thèse.....	198
6.2 Synthèse des résultats obtenus	198
6.2.1 Le potentiel fixateur d'azote chez <i>A. spirorbis</i> en conditions naturelles.....	198
6.2.2 Caractérisation des rhizobia associés à <i>A. spirorbis</i> en conditions naturelles.....	199
6.2.3 Gestion potentielle des éléments traces métalliques dans les organes fixateurs d'azote chez <i>A. spirorbis</i>	201
6.3 Discussion générale.....	202
6.3.1 Le potentiel fixateur d'azote chez <i>A. spirorbis</i>	202
6.3.2 Les caractéristiques des rhizobia associés à <i>A. spirorbis</i>	204
6.3.3 Les éléments traces métalliques dans les nodules d' <i>A. spirorbis</i>	206
6.3.4 <i>Acacia spirorbis</i> : une légumineuse originaire d'Australie pouvant servir de plante modèle dans l'étude des symbioses en milieux variés et parfois extrêmes	208
7. Conclusion et perspectives des travaux de thèse	211
8. Bibliographie.....	214
9. Annexe 1 : Article de Houlès <i>et al.</i>, 2018	237

Liste des figures du manuscrit de thèse

Figure 1 : Photographie d'une exploitation de nickel à ciel ouvert en Nouvelle-Calédonie	19
Figure 2 : Photographie d'un essai de revégétalisation en Nouvelle-Calédonie	19
Figure 3 : Photographie d'un essai de revégétalisation avec le gaïac et bois de fer 12 ans plus tard.....	21
Figure 4 : Photographie des racines d' <i>A. spirorbis</i> avec des nodules fixateurs d'azote et des mycorhizes	23
Figure 5 : Schéma du cycle de l'azote dans un contexte agricole.....	27
Figure 6 : Exemples de symbioses mutualistes	29
Figure 7 : Classification des sous-familles de légumineuses	31
Figure 8 : Photographies illustrant la diversité des sous-familles de légumineuses.....	31
Figure 9 : Photographies illustrant la diversité des genres d' <i>Acacia s.l.</i> reconnus.....	33
Figure 10 : Arbres phylogénétiques résumant la proximité génétique des <i>Acacia s.l.</i>	35
Figure 11 : Carte présentant les quatre grandes régions où l'on retrouve des <i>Acacia s.s.</i> en dehors de l'Australie.....	35
Figure 12 : Photographies des racines de plantes portant des nodules.....	37
Figure 13 : Arbre phylogénétique non-enraciné de séquences d'ADN 16S d' α - et β - protéobactéries	37
Figure 14 : Photographies comparant une souche non-fixatrice d'azote et une fixatrice d'azote	39
Figure 15 : Critères morphologiques et vocabulaire utilisé pour décrire des colonies bactériennes.....	39
Figure 16 : Schéma de l'invasion des poils racinaires par <i>Rhizobium</i> sp.....	41
Figure 17 : Photographies de bactéroïdes prises au microscope confocal	41
Figure 18 : Schéma des différentes stratégies aboutissant à la formation d'une symbiose fixatrice d'azote	43
Figure 19 : Schéma illustrant la méthode de l'abondance naturelle du ^{15}N	45
Figure 20 : Schéma du fonctionnement de la nitrogénase.....	45
Figure 21 : Photographies de plants d'une variété de sorgho sensible à la salinité.....	47
Figure 22 : Photographies illustrant la toxicité des métaux sur le développement des plantes.....	49
Figure 23 : Photographies des symptômes de toxicité dus au cadmium chez le ricin commun.....	49
Figure 24 : Croissance d'une souche de rhizobia sauvage et mutante avec un stress salin.....	51
Figure 25 : Photographies prises au MEB de nodules de <i>Pisum sativum</i> lors d'un stress salin.....	51
Figure 26 : Photographies de 3 légumineuses inoculées avec des rhizobia et exposées à différents métaux	53
Figure 27 : Photographies des racines d' <i>Acacia koa</i> portant des nodules fixateurs d'azote	55
Figure 28 : Carte des activités industrielles et des services de la Nouvelle-Calédonie.....	57
Figure 29 : Photographies des différents paysages et écosystème en Nouvelle-Calédonie	57
Figure 30 : Carte de la répartition des différentes sous-espèces d' <i>Acacia spirorbis</i>	59
Figure 31 : Phylogénie des <i>Acacia</i> retrouvés dans la zone océanienne et Sud-Ouest pacifique	59
Figure 32 : Photographies des caractéristiques de l' <i>Acacia spirorbis</i> en Nouvelle-Calédonie.....	61
Figure 33 : Photographies illustrant l'utilisation de l' <i>Acacia spirorbis</i> en Nouvelle-Calédonie.....	61

Figure 34 : Photographies de vue aériennes de différentes populations naturelles d' <i>A. spirorbis</i>	63
Figure 35 : Analyse NMDS des lignées de champignons ectomycorhiziens chez <i>A. spirorbis</i>	65
Figure 36 : Carte de la Nouvelle-Calédonie selon les sols calcaires, métallifères et volcano-sédimentaires	69
Figure 37 : Photographies de quatre sites d'étude présentant des sols de type volcano-sédimentaire ...	71
Figure 38 : Photographies de trois sites d'étude présentant des sols de type métallifère	73
Figure 39 : Photographies de deux sites d'étude présentant des sols de type calcaire	75
Figure 40 : Photographies de quatre espèces de plantes compagnes non-fixatrices de N ₂	75
Figure 41 : Cartographie de l'échantillonnage d' <i>A. spirorbis</i> et des plantes compagnes.....	77

Liste des figures de l'article Vincent *et al.*, 2018

<i>Figure 1: Map of New Caledonia according to the three main soil categories</i>	81
<i>Figure 2: Complete PCA of leaves plant nitrogen of <u>A. spirorbis</u> and reference species, with soil parameters</i>	85
<i>Figure S1: PCA representing the distribution of the study sites according to their soil properties</i>	92
<i>Figure S2: Means of $\delta^{15}N$ for leaves of <u>A. spirorbis</u> and each reference species</i>	99
<i>Figure S3: Partial PCA of leaves plant nitrogen of <u>A. spirorbis</u> and reference species, with soil parameters</i>	93
<i>Figure S4: Correlation between the leaves ¹⁵N abundance and N contents of the reference species</i>	94

Liste des figures principales et secondaires du deuxième article issu des travaux de thèse

<i>Figure 1: Map of New Caledonia according to the soil type</i>	107
<i>Figure 2: Phylogenetic tree of <u>Bradyrhizobium</u> symbionts of <u>A. spirorbis</u> based on concatemers</i>	113
<i>Figure 3: Phylogenetic tree of <u>Paraburkholderia</u> symbionts of <u>A. spirorbis</u> based on concatemers</i> ..	115
<i>Figure 4: PCA of the nitrogen fixation efficiency of <u>A. spirorbis</u> rhizobial symbionts</i>	117
<i>Figure 5: Phylogenetic tree of alpha-rhizobial <u>A. spirorbis</u> symbionts based on nodA gene</i>	119
<i>Figure 6: Phylogenetic tree of alpha-rhizobial <u>A. spirorbis</u> symbionts based on nifH gene</i>	121
<i>Figure 7: Principal components analyses of the metal tolerance of <u>A. spirorbis</u> symbionts</i>	123
<i>Supplementary Figure 1: PCA of the study sites soil properties</i>	151
<i>Supplementary Figure 2: Phylogenetic tree of <u>Bradyrhizobium</u> symbionts based on the 16S rRNA</i> ...	153
<i>Supplementary Figure 3: Phylogenetic tree of <u>Bradyrhizobium</u> symbionts based on dnaK gene</i>	155
<i>Supplementary Figure 4: Phylogenetic tree of <u>Bradyrhizobium</u> symbionts based on atpD gene</i>	157
<i>Supplementary Figure 5: Phylogenetic tree of <u>Bradyrhizobium</u> symbionts based on recA gene</i>	158
<i>Supplementary Figure 6: Phylogenetic tree of <u>Paraburkholderia</u> sp. based on the 16S rRNA gene</i> ...	159
<i>Supplementary Figure 7: Phylogenetic tree of <u>Paraburkholderia</u> symbionts based on gyrB gene</i>	160
<i>Supplementary Figure 8: Phylogenetic tree of <u>Paraburkholderia</u> symbionts based on atpD gene</i>	161
<i>Supplementary Figure 9: Phylogenetic tree of <u>Paraburkholderia</u> symbionts based on recA gene</i>	162

Liste des figures du manuscrit de thèse (suite)

Figure 42 : Analyse en composantes principales des propriétés des sols des sites d'étude	167
Figure 43 : Analyse en composantes principales des teneurs en éléments totaux dans les nodules d' <i>A. spirorbis</i>	171
Figure 44 : Images obtenues par MEB de coupes de nodules et de racines d' <i>A. spirorbis</i> développés sur sols calcaires	177
Figure 45 : Images obtenues par MEB de coupes de nodules et de racines d' <i>A. spirorbis</i> développés sur sols métallifères	179
Figure 46 : Images obtenues par MEB de coupes de nodules et de racines d' <i>A. spirorbis</i> développés sur sols volcano-sédimentaires	181
Figure 47 : Images obtenues par MEB de coupes de racines d' <i>A. spirorbis</i> présentant des cristaux de calcium	183
Figure 48 : Analyse en composantes principales des données obtenues par ICP-AL en fonction des types de tissus racinaires chez <i>A. spirorbis</i>	187
Figure 49 : Analyse en composantes principales des données obtenues par ICP-AL de la signature chimique des tissus internes des nodules d' <i>A. spirorbis</i> en fonction des types de sols	187
Figure 50 : Analyse en composantes principales des éléments chimiques du sol, des racines et des tissus internes et de paroi de nodules chez <i>A. spirorbis</i>	193

Liste des tableaux du manuscrit de thèse

Tableau 1 : Les grands types d'interactions entre deux partenaires	29
Tableau 2 : Evolution et état actuel des noms génériques donnés aux acacias	33
Tableau 3 : Distribution et nombre des espèces de référence non-fixatrices échantillonnées	75
Tableau 4 : Teneurs en azote des espèces de références et d' <i>A. spirorbis</i>	97
Tableau 5 : Synthèse des estimations du %Ndfa chez <i>A. spirorbis</i> en fonction des sites d'études	101

Liste des tableaux de l'article Vincent *et al.*, 2018

Table 1: Characteristics of the nine study sites	81
Table 2: Soil properties of the nine study sites	82
Table 3: Total nitrogen content and ¹⁵ N abundance of <i>A. spirorbis</i> and reference species	83
Table 4: Estimations of <i>A. spirorbis</i> %Ndfa	84
Table S1: Soil total nitrogen content and ¹⁵ N natural abundance in each of the nine study sites	94
Table S2: Correlations between nitrogen parameters of <i>A. spirorbis</i> , the reference species and the soil	95
Table S3: Correlations between nitrogen parameters and the soil properties of the study sites	95

Liste des tableaux principaux et supplémentaires du deuxième article issu des travaux de thèse

<i>Table 1: Sampling sites description and information</i>	109
<i>Table 2: Soil properties of the study sites</i>	111
<i>Table 3: Occurrence of metal resistance genes in the strains according to soil type and genus</i>	125
<i>Supplementary Table 1: List of the primers used for PCR amplification and sequencing</i>	127
<i>Supplementary Table 2: Accession numbers of <u>Bradyrhizobium</u> strains deposited in DDJB</i>	129
<i>Supplementary Table 3: Accession numbers of <u>Burkholderia</u> strains deposited in DDJB</i>	131
<i>Supplementary Table 4: Accession numbers of <u>Bradyrhizobium</u> references strains</i>	133
<i>Supplementary Table 5: Accession numbers of <u>Burkholderia</u> references strains</i>	135
<i>Supplementary Table 6: Nitrogen fixation efficiency of each alpha-rhizobial strain</i>	137
<i>Supplementary Table 7: Nitrogen fixation efficiency of each beta-rhizobial strain</i>	139
<i>Supplementary Table 8: Data collected from the nodulation test on <u>A. spirorbis</u> seedlings</i>	141
<i>Supplementary Table 9: Correlation matrix of the nitrogen fixation efficiency parameters</i>	141
<i>Supplementary Table 10: Accession numbers of bacterial <u>nodA</u> references sequences</i>	143
<i>Supplementary Table 11: Nucleotidic BLAST results of <u>nodA</u> sequences from <u>A. spirorbis</u> beta-rhizobial symbionts</i>	145
<i>Supplementary Table 12: Accession numbers of bacterial <u>nifH</u> references sequences</i>	147
<i>Supplementary Table 13: Summary of the strains metal tolerance according to soil type and rhizobial genus</i>	149
<i>Supplementary Table 14: Correlation matrix of the metal tolerance parameters</i>	149

Liste des tableaux du manuscrit de thèse (suite)

Tableau 6 : Propriétés géochimiques des sols des sites d'étude où se développe naturellement <u>A. spirorbis</u>	169
Tableau 7 : Résultats des analyses ICP-OES des teneurs en éléments chimiques des nodules d' <u>A. spirorbis</u>	173
Tableau 8 : Résultats des tests de corrélations non-paramétriques de Spearman entre les teneurs en éléments des nodules dosés par ICP-OES et les éléments du sol dosés par ICP-MS.....	173
Tableau 9 : Synthèse de l'histolocalisation des éléments chimiques retrouvés au niveau de la paroi et des tissus internes dans les racines et nodules d' <u>A. spirorbis</u>	175
Tableau 10 : Dosages par ICP-AL des éléments majeurs et traces métalliques contenus dans les tissus internes des nodules d' <u>A. spirorbis</u>	185
Tableau 11 : Dosages par ICP-AL des éléments majeurs et traces métalliques contenus dans les parois des nodules d' <u>A. spirorbis</u>	185

Tableau 12 : Résultats des tests de corrélations non-paramétriques de Spearman entre les teneurs en éléments des nodules dosés par ICP-OES et les éléments des tissus internes des nodules évalués par ICP-AL.....	185
Tableau 13 : Résultats des tests de corrélations non-paramétriques de Spearman entre les teneurs en éléments des nodules dosés par ICP-OES et les éléments des parois des nodules évalués par ICP-AL	185
Tableau 14 : Signatures des éléments chimiques dans les tissus internes du nodule en fonction des types de sol.....	189
Tableau 15 : Dosages des éléments chimiques dans les racines d' <i>A. spirorbis</i>	191
Tableau 16 : Résultats des tests non-paramétriques de corrélation de Spearman sur les éléments chimiques en fonction de quatre compartiments : le sol, les parois et tissus internes des nodules et les racines d' <i>A. spirorbis</i>	191

Introduction générale

1. Introduction générale

1.1. Contexte des travaux de thèse

Les légumineuses (Fabacées) se déclinent en six sous-familles (The Angiosperm Phylogeny Group, 2009; Azani *et al.*, 2017). Elles sont importantes pour les secteurs de l'agriculture, l'agronomie, l'agroforesterie et la restauration de sols dégradés, notamment grâce à leur capacité symbiotique de fixer de l'azote atmosphérique (N_2) en s'associant avec des bactéries spécialisées du sol : les rhizobia (Graham & Vance, 2003). La plupart des rhizobia décrits appartiennent au groupe des α -protéobactéries, genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* et *Ensifer* mais également au groupe des β -protéobactéries, genres *Burkholderia* et *Cupriavidus* (Masson-Boivin *et al.*, 2009). Une liste de plus de 160 espèces rhizobiennes ainsi que leurs hôtes ont été recensées dans la revue de Peix *et al.* (2015).

Les symbioses rhizobium-légumineuses permettent de fixer le N_2 et de le transformer en ions ammonium (NH_4^+), une forme azotée assimilable par la plante. Néanmoins, la fixation d'azote est sujette aux conditions environnementales telles que la température, la salinité, le pH, l'humidité, le manque de nutriments ou encore la toxicité métallique, pouvant affecter l'état physiologique de la plante hôte ou impacter la communauté rhizobienne, influençant de manière (in)directe le taux de fixation d'azote (Zahran, 1999 ; Emamverdian *et al.*, 2015). De plus, certains environnements limitent le développement de la flore, tels que des milieux arides, alpins, infertiles ou riches en éléments traces métalliques (ETM). Dans ces milieux, les plantes capables d'établir ces symbioses peuvent présenter un avantage compétitif et certaines d'entre elles sont utilisées en tant que plante hôte (plus connues sous le terme de plantes *nurse* en anglais) pour restaurer des sols dégradés, afin de faciliter la réintroduction d'espèces locales (Padilla & Pugnaire, 2006).

Les activités minières sont essentielles pour l'économie de nombreux pays, mais elles engendrent une dégradation de l'environnement. Pour exploiter un gisement à ciel ouvert, les industriels miniers commencent par décaper et/ou détruire la végétation, puis ils retirent les couches arables supérieures du sol appelées « topsoil » (Festin *et al.*, 2018). L'exploitation du minerai génère ainsi de grandes superficies de sols dégradés, notamment du point de vue de la fertilité biologique. Par ailleurs, ces sols dégradés sont souvent caractérisés par une faible rétention d'eau, une faible teneur en matière organique, une faible teneur en nutriments, une faible activité microbiologique et de fortes teneurs en ETM (Krzaklewski & Pietrzykowski, 2002).

Afin de minimiser leur impact sur l'environnement, les industriels miniers se tournent vers l'ingénierie écologique pour restaurer ces écosystèmes dégradés en utilisant le concept de « plantes hôte ». C'est notamment le cas en Nouvelle-Calédonie, où les industriels miniers exploitant des gisements nickélifères développent des programmes visant à restaurer les écosystèmes dégradés (Figure 1 et 2 ; Sarrailh, 2002 ; Houlès, 2017).



Figure 1 : Photographie d'une exploitation de Nickel à ciel ouvert en Nouvelle-Calédonie.
Source : <https://www.mining-technology.com/projects/goro-nickel/attachment/goro-nickel1/>



Figure 2 : Photographie d'un essai de revégétalisation en Nouvelle-Calédonie.
Crédit-Source : Guillaume Chirron - <https://umr-lstm.cirad.fr/principaux-projets/cnrt-bioindic>

La Nouvelle-Calédonie est un archipel situé à 1800 km des côtes Est de l'Australie et présente une large gamme de sols, incluant i) des sols alumino-calciques plus ou moins riches en matière organique développés sur substrat calcaire, ii) des sols ferrallitiques riches en ETM mais pauvres en nutriments développés sur substrat ultrabasique et iii) des sols argilo-siliceux développés sur substrat volcano-sédimentaires (Bonvallot *et al.*, 2012). Cette diversité de sols fait que l'archipel néo-calédonien abrite une biodiversité et un taux d'espèces endémiques remarquables (Morat *et al.*, 2012). Cependant, l'urbanisation, la déforestation au profit des élevages extensifs, les feux de forêt et l'extraction minière à ciel ouvert de nickel (Figure 1) représentent autant de menaces pour ses écosystèmes (Jaffré *et al.*, 2010). C'est la raison pour laquelle, la Nouvelle-Calédonie a été classée parmi les 25 hotspots de la biodiversité (Myers *et al.*, 2000 ; Marchese, 2015).

Les sols issus des exploitations nickélifères présentent des pH relativement acides et de fortes teneurs en ETM, les rendant ainsi extrêmes pour le développement d'espèces végétales. La biodiversité terrestre néocalédonienne est menacée par les industries minières et une réhabilitation des écosystèmes perturbés est nécessaire (Figure 2). Sur le terrain, des essais de restauration ont été effectués en utilisant plusieurs espèces arbustives (Sarrailh, 2002) et deux d'entre elles présentent des résultats satisfaisants : *Casuarina collina* Poiss. ex Pancher & Sebert 1893 (le bois de fer) et *Acacia spirorbis* subsp. *spirorbis* Labill. (le faux gaïac). Ces deux espèces possèdent un potentiel symbiotique pouvant servir à la restauration des écosystèmes dégradés. Entre ces deux espèces, *Acacia spirorbis* se présente comme un modèle d'étude particulièrement intéressant, du fait de sa capacité à établir une triple symbiose, avec des champignons mycorhiziens à arbuscule, des champignons ectomycorhiziens et des rhizobia fixateurs d'azote (Grangeteau *et al.*, 2012 ; Ducouso *et al.*, 2014).

Acacia spirorbis fait partie du clade Australasien des *Acacias*. Cette espèce présente un comportement envahissant dans des écosystèmes dégradés et sur les terres déboisées, au même titre que de nombreuses autres espèces d'*Acacia* Australiens (Miller *et al.*, 2011 ; Richardson *et al.*, 2015). Cependant, deux sous-espèces d'*A. spirorbis* se distinguent en fonction de leur origine : d'un côté la sous-espèce *A. spirorbis* subsp. *solandri* (synonyme d'*A. spirorbis* subsp. *kajewski* Pedley) en Australie et au Vanuatu, et d'un autre côté la sous-espèce *A. spirorbis* subsp. *spirorbis* Labill. en Nouvelle-Calédonie (Brown *et al.*, 2012). D'un point de vue phylogénétique, la population d'acacias néo-calédoniens est assez éloignée des autres sous-espèces pour la considérer en tant qu'une sous-espèce à part entière et c'est pourquoi, on considère que la population d'*A. spirorbis* en Nouvelle-Calédonie est endémique de l'archipel (Brown *et al.*, 2012). Dans les maquis miniers de Nouvelle-Calédonie, *A. spirorbis* se développe naturellement sur des sols riches en ETM, mais également sur des sols riches en calcium ou en silicium présentant une gamme de pH allant de 4 à 8 et jusqu'à 400 m d'altitude (Ducouso *et al.*, 2014). Naturellement, *A. spirorbis* se propage dans les milieux ouverts suite à des feux de forêts (Jaffré *et al.*, 1997). En conditions naturelles, les racines d'*A. spirorbis* présentent des champignons mycorhiziens à arbuscule, des champignons ectomycorhiziens, ainsi que des rhizobia (Figure 4 ; Ducouso *et al.*, 2014).



Figure 3 : Photographie d'un essai de revégétalisation d'un terrain minier 12 ans après la plantation de bois de fer et faux gaïac. Localisation : mine de Rouvray, commune du Montdore en Nouvelle-Calédonie.
Crédit – Source : Denis Prévôt -https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Terrains_miniers_acacia_spiriorbis.jpg

Pisolithus albus (Cooke & Masee) est un champignon ectomycorhizien associé à *A. spirorbis*. De manière remarquable, cette espèce de champignon présente la particularité de posséder une pompe à efflux de nickel jouant un rôle actif de détoxification lorsqu'il est associé aux racines d'*A. spirorbis* (Majorel *et al.*, 2014). De plus, ce champignon présente des écotypes distincts selon le type de sol (Jourand *et al.*, 2010). Des travaux menés pour caractériser la diversité des champignons ectomycorhiziens associés à *A. spirorbis* montrent que son cortège ectomycorhizien est structuré selon le type de sol (Houlès *et al.*, 2018). Des travaux préliminaires montrent que sur des sols argilo-siliceux développés sur substrat volcano-sédimentaires, les bactéries fixatrices d'azote associées à *A. spirorbis* appartiennent majoritairement au genre *Bradyrhizobium* (Grangeteau *et al.*, 2012).

Connaissant le caractère hautement bénéfique des symbioses pour la nutrition des plantes, cette diversité des symbioses que peut développer *A. spirorbis*, et plus particulièrement la symbiose fixatrice d'azote, soulève la question du lien éventuel avec sa capacité d'adaptation à des sols contrastés. Pour répondre à cette question, des travaux de recherche scientifique ont été entrepris par le Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM) à travers un projet financé par l'Agence Nationale pour la Recherche et baptisé ADASPIR (<https://umr-lstm.cirad.fr/principaux-projets/adaspir>). Ce projet est centré sur les mécanismes symbiotiques d'adaptation d'*Acacia spirorbis* aux stress abiotiques et aux perturbations environnementales en Nouvelle-Calédonie.

Ce projet a notamment permis de (i) caractériser les contraintes édaphiques dans lesquelles évolue naturellement *A. spirorbis*, (ii) identifier ses cortèges de champignons endo- et ectomycorhiziens, (iii) recommander son utilisation en tant que plante *nurse* dans la restauration de sols miniers et (iv) caractériser une partie des rhizobia associés à la plante. Le résumé du projet est disponible sur le lien suivant : <http://www.agence-nationale-recherche.fr/Projet-ANR-12-ADAP-0017>

1.2. Objectif des travaux de thèse et organisation du manuscrit

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit sont complémentaires des études réalisées dans le cadre du projet ADASPIR. Leur objectif principal est de mieux évaluer la contribution de la symbiose rhizobienne fixatrices d'azote à l'adaptation d'*A. spirorbis* à une large gamme de sols qui présentent des conditions édaphiques contrastées.

L'ensemble des résultats accumulés durant les 3 années de ces travaux de thèse se répartissent selon trois chapitres portant sur (i) l'évaluation du potentiel fixateur d'azote de la symbiose rhizobienne chez *A. spirorbis* dans ses écosystèmes naturels et contrastés, (ii) la caractérisation des rhizobia associés à *A. spirorbis* : taxonomie, capacité à fixer l'azote, tolérance aux principaux marqueurs des contraintes édaphiques (dont les ETM) et (iii) la réponse adaptative de la plante vis-à-vis de ces contraintes édaphiques, notamment au niveau des tissus racinaires et des nodules fixateurs d'azote.

Le chapitre 1 aborde la contribution directe de la fixation biologique chez *A. spirorbis* en conditions naturelles. *Acacia spirorbis* se développe naturellement sur des sols calcaires, métallifères et volcano-



Figure 4 : Photographie des racines d'un *Acacia spirorbis*. Les racines d'*Acacia spirorbis* portent des nodules fixateurs d'azotes (entourés en rouge) et des ectomycorhizes jaunes de *Pisolithus albus* (entourées en jaune). Photographie prise sur le massif minier de Koniambo en Nouvelle-Calédonie.

Crédit : Marc Ducousso

Source : <https://umr-lstm.cirad.fr/principaux-projets/adaspir>

sédimentaires. Trois sites d'études ont été définis par type de sol, soit un total de neuf sites d'étude présentant des populations naturelles d'*A. spirorbis*. Dans un premier temps, les analyses des concentrations totales de 14 éléments chimiques du sol, incluant des nutriments (C, N, P, K, Ca et Mg) et des ETM (Al, Cr, Co, Fe, Mn, Ni, Zn), ont permis de mettre en évidence la gamme de conditions édaphiques dans lesquelles *A. spirorbis* peut se développer. Dans un deuxième temps, les concentrations en azote total dans les tissus d'*A. spirorbis* et des espèce non-fixatrices ont été évaluées et le pourcentage d'azote issu de la fixation biologique a été estimé par la méthode de l'abondance naturelle du ^{15}N . Dans un troisième temps, le lien entre les teneurs en azote des plantes et le fonctionnement de la symbiose fixatrice d'azote chez *A. spirorbis* en fonction des différents types de sols a été établi. Ces résultats ont récemment fait l'objet d'une publication dans la revue *European Journal of Soil Biology* (Vincent *et al.*, 2018).

Le chapitre 2 porte sur la caractérisation des bactéries fixatrices d'azotes associées aux nodules racinaires d'*A. spirorbis* à travers (i) la caractérisation du degré d'intimité symbiotique chez *A. spirorbis* et (ii) les caractéristiques des rhizobia en fonction du type de sol. Des souches de rhizobia associées à *A. spirorbis* ont été isolées à partir de nodules prélevés sur le terrain. Ces souches ont d'abord été caractérisées d'un point de vue phylogénétique en fonction de leur taxonomie, en utilisant une approche multilocus basée sur l'étude des marqueurs de la diversité *i.e.* les gènes codant pour l'ADNr 16S, *atpD*, *dnaK*, *gyrB* et *recA*. Ensuite, des gènes marqueurs de la fonctionnalité de la symbiose (*nodA* et *nifH*) et de l'adaptation à la contrainte édaphique, notamment les gènes marqueurs de la tolérance aux ETM (*nreB* et *cnrA*) ont été analysés. L'efficacité de la fixation d'azote de chacune des souches isolées a été vérifiée en conditions contrôlées sur de jeunes plants d'*A. spirorbis* en utilisant le test de réduction de l'acétylène (test ARA). La tolérance aux ETM a été calculée pour chacune des souches isolées, en déterminant la concentration inhibant 50% de la croissance bactérienne (CI_{50}). Les résultats phylogénétiques et phénotypiques des bactéries isolées ont ensuite été analysés en lien avec le type de sol d'où sont issus les prélèvements. Ces résultats sont destinés à être valorisés sous la forme d'un article dans une revue internationale du type *FEMS microbiology*.

Le dernier chapitre est centré sur la réponse adaptative de la plante vis-à-vis de la contrainte édaphique que représentent les ETM. Cette étude a été menée sur les tissus racinaires de la plante et au sein des nodules. Des analyses par ICP-OES ont été réalisées pour quantifier les teneurs totales de plusieurs éléments (nutriments et ETM) dans ces tissus, puis des observations et analyses par microscopie électronique à balayage (MEB) ont été utilisées pour tenter de localiser ces éléments au sein des tissus de la plante. Une quantification des éléments, plus particulièrement les ETM, a ensuite été menée dans les tissus internes des nodules racinaires en utilisant de l'ICP couplée à une ablation laser (ICP-AL). Ces données ont finalement été analysées par rapport aux concentrations en éléments dans les sols dans le but de décrire des flux potentiels en ETM entre le sol, les racines et les nodules chez *A. spirorbis*.

En combinant les résultats obtenus sur i) le fonctionnement de la symbiose sur le terrain, ii) les caractéristiques des rhizobia associés à *Acacia spirorbis* et iii) la réponse adaptative de cette espèce face à des teneurs élevées en ETM, ce travail de thèse apporte de nouveaux éléments permettant de mieux évaluer le rôle de la symbiose fixatrice d'azote dans l'adaptation d'*A. spirorbis* à des sols contrastés, et parfois extrêmes.

Synthèse Bibliographique

Cycle de l'azote en agriculture

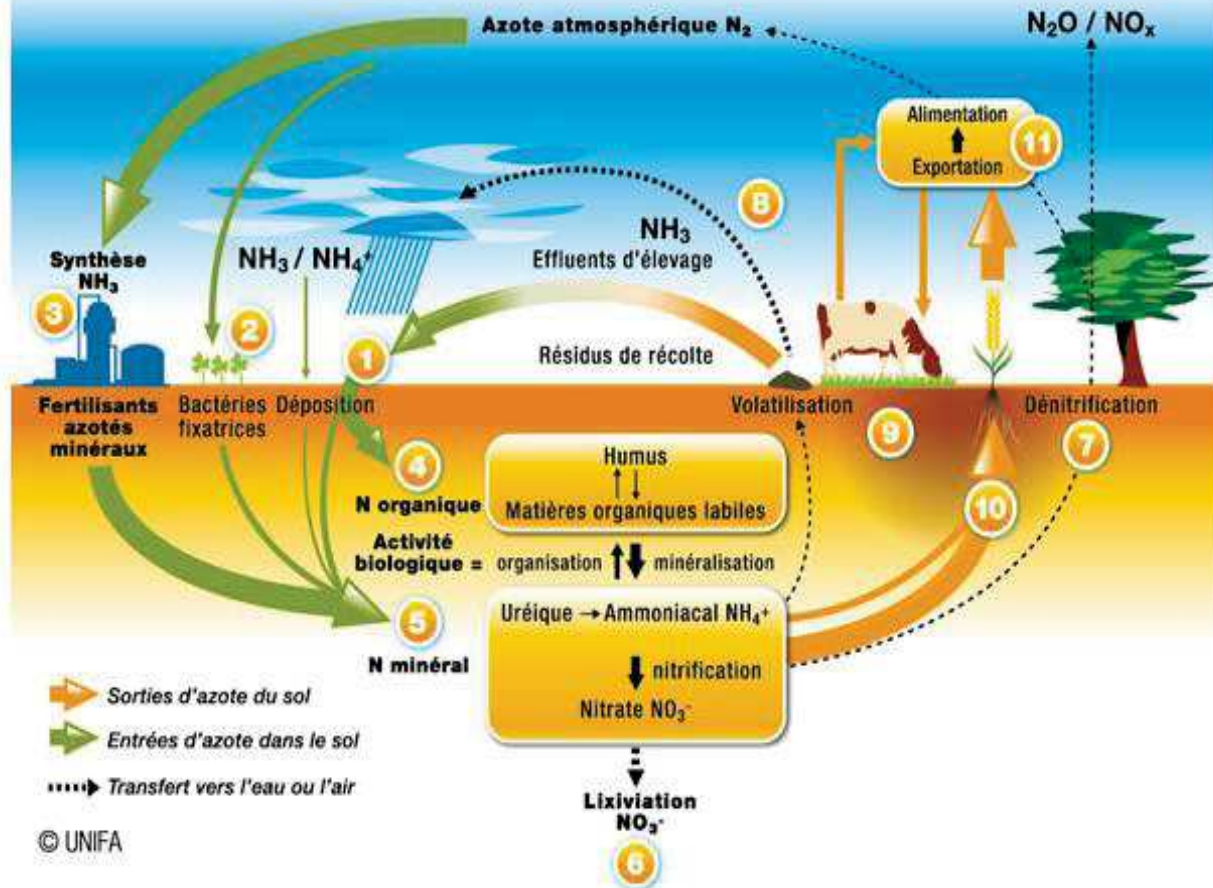


Figure 5 : Schéma du cycle de l'azote dans un contexte agricole. En prenant le sol comme élément central, les entrées d'azotes sont symbolisées en vert et les sorties en jaune.

Légende des processus numérotés :

- 1) recyclage des éléments nutritifs contenus dans la matière organique,
- 2) fixation biologique de l'azote par les symbioses rhizobium-légumineuse,
- 3) synthèse de fertilisants azotés via le procédé Haber-Bosch
- 4) minéralisation microbienne de l'azote organique en azote minéral
- 5) nitrification de l'ammonium en nitrate par les bactéries du sol
- 6) lixiviation des nitrates en profondeur par l'eau
- 7) dénitrification des nitrates et nitrites en diazote gazeux par les bactéries
- 8) hydrolyse de l'urée par les enzymes du sol en ammoniac avec un rejet de gaz carbonique
- 9) assimilation d'ammonium par les racines
- 10) assimilation de nitrates par les racines
- 11) sortie d'azote liée aux exports de végétaux lors de la récolte.

2.1 Les symbioses chez les légumineuses

2.1.1 L'azote

L'azote (N) est un élément clé pour le vivant puisqu'il est fondamental dans la composition de l'ADN, des protéines et des enzymes. Sa forme la plus abondante, le diazote atmosphérique (N_2), constitue 79% du volume de l'air, mais n'est pas directement assimilable par la majorité des êtres vivants. L'azote est ainsi considéré comme l'un des premiers facteurs limitant du développement de la vie (Vitousek & Howarth, 1991; Kaye & Hart, 1997 ; Galloway *et al.*, 2003). La conversion de N_2 en espèces réactives de l'azote (Nr) est nécessaire à la croissance de la plupart des organismes et correspond à des formes biodisponibles de l'azote pour les organismes. Les molécules assimilables de l'azote se présentent sous différentes formes, oxydées ou réduites et sont solubilisables dans la solution du sol, tels que le nitrate (NO_3^-) et l'ammonium (NH_4^+). Les différents processus, flux et équilibres liés à l'azote dans l'environnement constituent le cycle de l'azote (Figure 5). En prenant le sol comme élément central dans un écosystème terrestre, il est possible de distinguer deux types de flux d'azote : les entrées (processus 1 à 5 sur la Figure 5) et les sorties d'azote (processus 6 à 11 sur la Figure 5).

Les processus naturels majeurs capables de former de l'azote biodisponible sont la foudre (environ 5 Tg de N par an) et la fixation biologique dans les écosystèmes terrestres et aquatiques, à hauteur de 198 Tg de N par an (Fowler *et al.*, 2013). Cependant, la majorité des écosystèmes ont une demande d'azote biodisponible dépassant largement ce que peuvent apporter les processus naturels, et de ce fait la plupart des écosystèmes sont limités par leurs ressources azotées (Aber *et al.*, 1989). L'invention du procédé Haber-Bosch a toutefois réussi à combler ce manque, en convertissant artificiellement à l'échelle industrielle, du N_2 en NH_3/NH_4^+ (Erisman *et al.*, 2008). En nourrissant aujourd'hui 50 % de la population, ce procédé révolutionnaire a permis de booster la production agricole globale et de subvenir aux besoins alimentaires d'une population mondiale en constante augmentation (Erisman *et al.*, 2008). Le procédé Haber-Bosch n'est cependant pas parfait. En effet, en le combinant à une utilisation régulière et massive d'engrais azotés, il a des conséquences sur les environnements terrestres, aquatiques, la santé humaine et le climat, favorisant notamment des phénomènes d'eutrophisation (blooms d'algues entraînant une désoxygénation), d'acidification des milieux, de création de particules fines (inférieures à 2,5 μm), de réduction de la couche d'ozone, de formation de pluies acides, etc. (Galloway *et al.*, 2003; Fowler *et al.*, 2013).

Un des objectifs majeurs des sciences agronomiques est ainsi de trouver une alternative à ce procédé, notamment en utilisant le potentiel des microorganismes naturellement présents dans les sols. En effet, certaines bactéries et champignons sont capables d'interagir avec les plantes et de former des associations bénéfiques qualifiées de symbioses. Dans certains cas, ces symbioses peuvent influencer le cycle de l'azote, comme par exemple en utilisant la fixation biologique de l'azote (Figure 5 ; processus n°2).

Tableau 1 : Les grands types d'interactions possibles entre deux partenaires : A et B, extrait de Selosse (2012). Pour un partenaire donné, les effets de l'interaction sont soit favorables (+), défavorables (-) ou neutres (0).

Partenaire A	Partenaire B	Type d'interaction
+	+	Mutualisme (si interspécifique) ou coopération (plus général)
+	-	Parasitisme (ou prédation, si mort immédiate)
+	0	Commensalisme
0	-	Amensalisme
0	0	Neutralisme
-	-	Compétition (ou antagonisme)

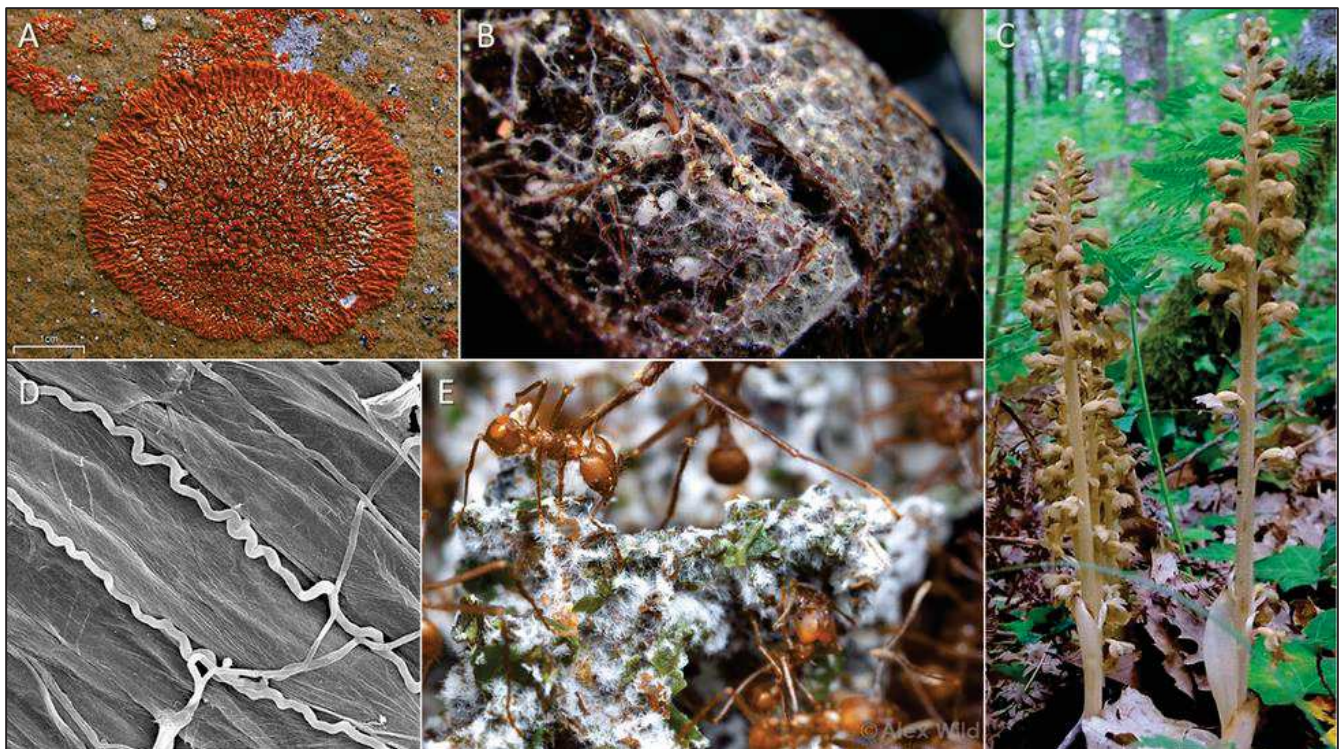


Figure 6 : Exemples de symbioses mutualistes impliquant des champignons.

Extrait de http://www.encyclopedie-environnement.org/vivant/systemes-symbiotiques-parasites/#_ftn2, consulté le 09/10/17

A) Symbiose entre une algue verte et un champignon ascomycète chez le lichen *Xanthoria elegans*.

Source : © Jason Hollinger @Mushroom Observer (CC BY-SA 3.0) via Creative Commons.

B) Mycélium (blanc) de champignon ectomycorhizen associé aux racines (brunes) de *Picea glauca*.

Source : © André-Ph. D. Picard (CC BY-SA 3.0) via Wikimedia Commons.

C) *Neottia nidus-avis*, une plante non-chlorophyllienne qui exploite le carbone des champignons mycorhiziens et donc des autres végétaux. Source : © Marc-André Selosse.

D) *Neotyphodium coenophialum*, champignon endosymbiotique vivant au sein de la fêtuque élevée (*Festuca arundinacea*) qu'il protège des herbivores en sécrétant un alcaloïde toxique pour les herbivores.

Source : <http://betterknowamicrobe.tumblr.com/post/75909408589/neotyphodium-coenophialum>

E) Culture de champignons d'une colonie d'*Atta cephalotes*, les champignons microscopiques forment une moisissure blanche qui se développe sur des morceaux de feuilles apportés par les fourmis.

Source : © Alex Wild/alexanderwild.com

2.1.2 Les grands types de symbioses : focus sur les légumineuses

En biologie, plusieurs définitions du terme « symbiose » existent. Au sens large, le terme « symbiose » définit une interaction entre deux espèces intimement liées sur le long terme, peu importe sa nature (de Bary, 1879). Le sens premier de la symbiose se base donc simplement sur la coexistence de deux organismes et les effets de l'un sur l'autre peuvent être favorables (+), neutres (0) ou défavorables (-) (Tableau 1). Pourtant, le terme de symbiose évoque plutôt un échange à bénéfices réciproques entre deux espèces. Il s'agit là de la deuxième utilisation de ce mot, mais elle est plus stricte, puisqu'elle inclut comme dans la première définition, des organismes intimement liés mais s'impliquant uniquement dans des échanges à bénéfices réciproques, excluant ainsi pathogènes, commensaux, etc. (Lefèvre *et al.*, 2010). La symbiose mutualiste peut se présenter sous différentes formes et un partenaire a la possibilité de s'associer à différentes espèces pour former des symbioses mutualistes présentant des morphologies et fonctions diverses (Figure 6). Les bénéfices de ces symbioses sont souvent liés à l'exploitation, la mise à disposition et le partage de ressources entre deux partenaires (Lefèvre *et al.*, 2010). Par exemple, ce genre d'association est retrouvé chez les lichens (algue-champignon, Figure 6A), chez les champignons mycorhiziens (plante-champignon Figure 6B), chez les fourmis champignonnistes (fourmi-champignon ; Figure 6E) ou encore chez les légumineuses (plante-bactérie).

Ce travail de thèse est centré sur un type de plante en particulier : les légumineuses. Ces plantes ont la particularité de pouvoir subvenir à leurs besoins en azote de deux manières différentes. La première et la plus commune est l'assimilation de l'azote sous forme ionique, du type nitrate ou ammonium, à partir de la solution du sol *via* les poils absorbants des racines. Cette assimilation peut notamment être améliorée lorsque les légumineuses s'associent symbiotiquement à des champignons mycorhiziens (George *et al.*, 1995; Govindarajulu *et al.*, 2005). La seconde manière de se procurer de l'azote pour une légumineuse est de s'associer à certaines bactéries du sol (les rhizobia) et de mettre en place un organe spécialisé sur les racines qualifié de nodule. C'est à l'intérieur de cet organe que les rhizobia sont capables de transformer l'azote atmosphérique en une forme assimilable par la plante (Graham & Vance, 2003). Il a été montré que la capacité à former des nodules varie selon le groupe de légumineuses : considérée comme rare chez les *Caesalpinioideae*, elle est commune dans le clade des *Mimosoideae* et très fréquente au sein des *Papilionoideae* (Allen & Allen, 1981 ; de Faria *et al.*, 1989). Des plantes actinorhiziennes (non-légumineuses) appartenant aux genres *Alnus*, *Myrica* ou *Casuarina* sont également capables de former des nodules fixateurs en s'associant avec des bactéries actinomycètes du genre *Frankia* (Schwintzer, 1979). Ce travail de thèse s'intéresse à une légumineuse de la sous-famille des *Caesalpinioideae* et appartenant au genre *Acacia*.

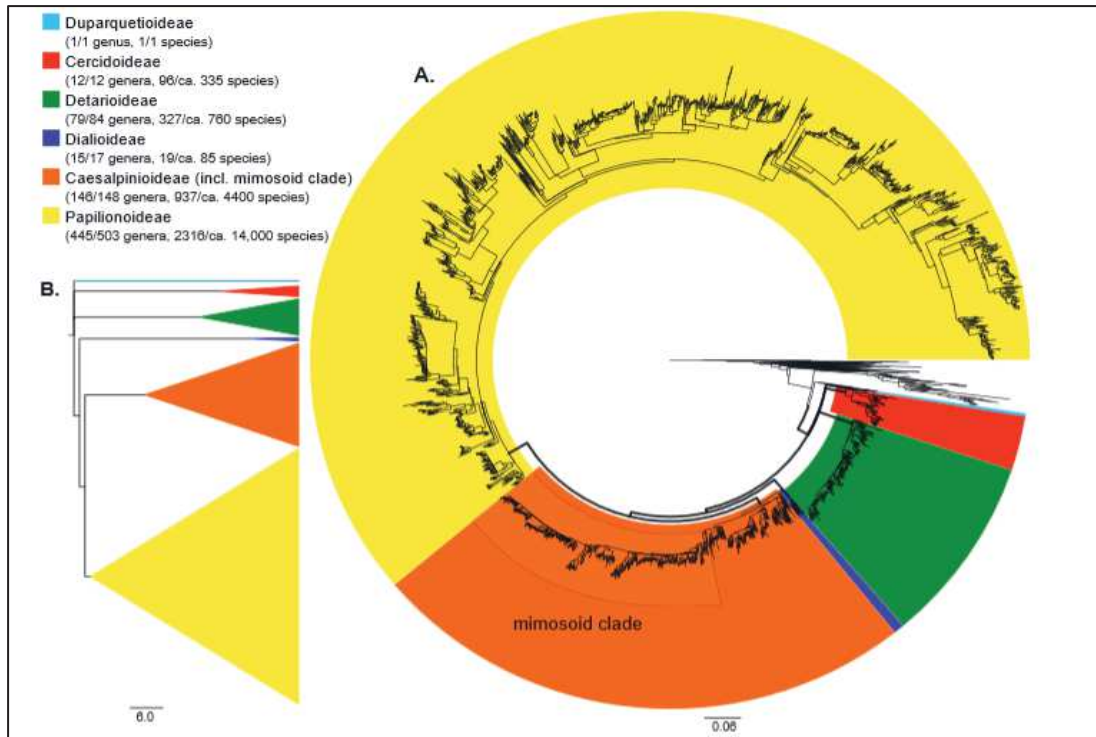


Figure 7 : Classification des sous-familles de légumineuses en se basant sur un arbre phylogénétique créé à partir de 3842 séquences du gène *matK*. Au total, 3696 espèces de légumineuses sont représentées en couleurs et 100 espèces non-légumineuses de référence en non-coloré (Azani *et al.*, 2017). L'arbre phylogénétique est présenté sous sa forme linéaire (Fig. 7A) et circulaire (Fig. 7B).

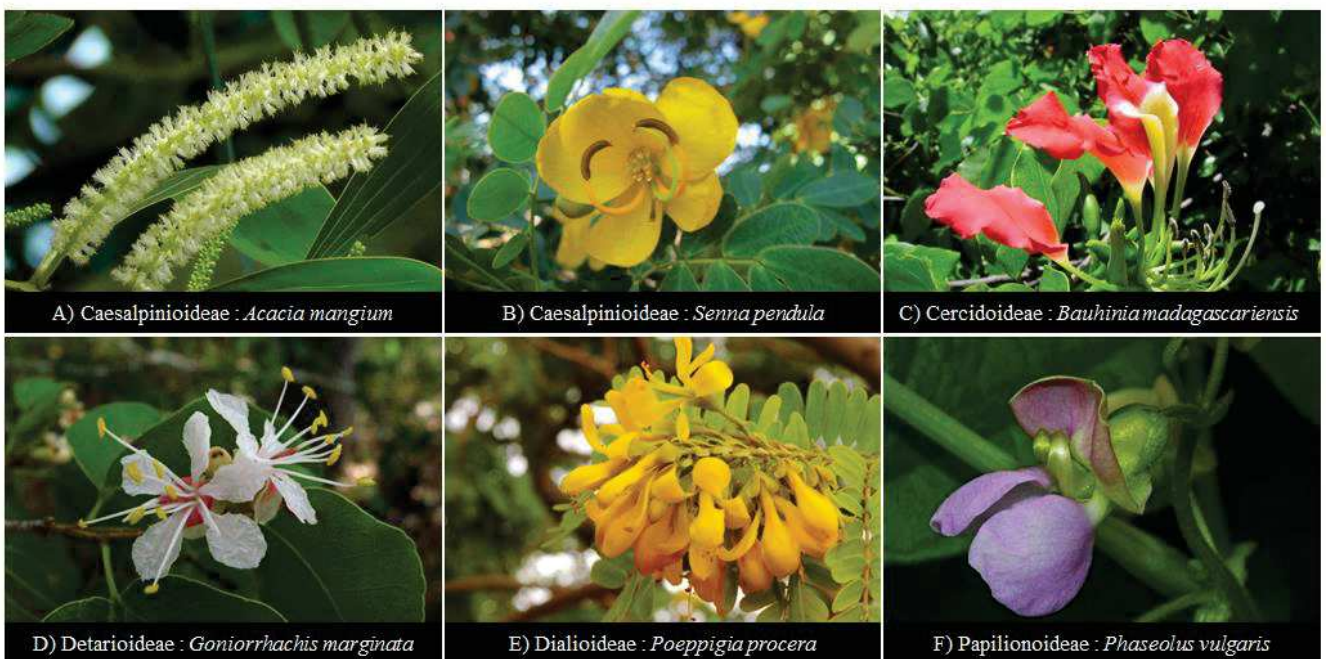


Figure 8 : Photographies illustrant la diversité des sous familles de légumineuses.

Crédits - Source des photographies :

- A) Shubhada Nikharge - <http://picssr.com/tags/hickorywattle>
- B) Rubens Queiroz - <http://rubens-plantasdobrasil.blogspot.fr/2011/11/leguminosae-caesalpinioideae-cassieae.html>
- C) George E. Schatz - <http://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Bauhinia+madagascariensis>
- D) Domingoscardoso - <http://picssr.com/photos/domingoscardoso/interesting?nsid=65877528@N08>
- E) Rubens Queiroz - <http://rubens-plantasdobrasil.blogspot.fr/2015/07/fabaceae-poeppigia-procera-c-presl.html>
- F) Thierry Pernot - <http://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-82599-synthese>

2.1.3 Les légumineuses : généralités et taxonomie

Les légumineuses sont des végétaux regroupés dans la famille des Fabacées (*Fabaceae*). Ces espèces sont notamment utilisées dans les secteurs de l'agronomie car riches en protéines (haricot, pois, lentille, soja, trèfle, luzerne...), en agroforesterie (production de bois, huiles, résines...) et également dans la restauration des sols dégradés (concept de « plante hôte ») (Yahara *et al.*, 2013). Avec près de 770 genres et plus de 19 500 espèces, les légumineuses sont, après les orchidées et les astéracées, la troisième plus grande famille d'angiospermes en terme de richesse spécifique (Lewis *et al.*, 2005, 2013; The Legume Phylogeny Working Group, 2013). D'un point de vue biogéographique, les légumineuses ont une distribution cosmopolite et jouent des rôles écologiques importants dans quasiment tous les biomes terrestres, même les plus extrêmes (Schrire *et al.*, 2005). Une des caractéristiques les plus visibles pour reconnaître une légumineuse (à quelques exceptions près), est de posséder un seul carpelle supérieur à une loge, une placentation marginale, avec deux à plusieurs ovules disposés en deux lignes alternatives sur un placenta unique (Lewis *et al.*, 2005).

D'un point de vue évolutif, les légumineuses seraient apparues il y a 59 Ma et se seraient rapidement (entre -56 et -50 Ma) différenciées en 3 sous-familles (Sprent & James, 2007). Jusqu'en 2017, ces trois sous-familles chez les *Fabaceae* étaient : *Mimosoideae*, *Papilionoideae* et *Caesalpinioideae* (The Angiosperm Phylogeny Group, 2009). Cependant, les systématiciens ont repéré que des analyses phylogénétiques de plus en plus nombreuses indiquaient un problème de classification dans ces sous-familles, notamment au niveau de celle des *Caesalpinioideae* considérée comme une sous-famille paraphylétique (Käss & Wink, 1996). Des tribus et sous-tribus de légumineuses ne présentant pas de monophylies sont retrouvées et de ce fait, un travail de reclassification a été entrepris par (The Legume Phylogeny Working Group, 2013). C'est en accord avec ce groupe de travail sur la phylogénie des légumineuses, reconnu en tant qu'autorité compétente pour définir/affiner les connaissances phylogéniques et la classification concernant les Fabacées, que des preuves phylogénétiques ont été apportées et compilées pour redéfinir les sous-familles des légumineuses (Azani *et al.*, 2017). Les auteurs ont ainsi pu redéfinir les sous-familles des *Leguminosae* en se basant sur le gène *matK* (Figure 7 ; Azani *et al.*, 2017). Un des changements majeurs proposé par les auteurs est la création de six sous-familles distinctes au sein des légumineuses : *Caesalpinioideae* Figure 8A et 8B (incluant le clade des *Mimosoideae*, Figure 8A), *Cercidoideae* (Figure 8C), *Detarioideae* (Figure 8D), *Dialioideae* (Figure 8E), *Duparquetioideae*, et *Papilionoideae* (Figure 8F). La plante étudiée dans ces travaux de thèse est une *Caesalpinioideae*, plus précisément au groupe *Acacia*.

Tableau 2 : Evolution et état actuel des noms génériques donnés aux grandes unités monophylétiques admises des *Acacia s.l.* (Miller & Seigler, 2012). Les auteurs précisent qu'aucune espèce n'est naturellement présente à la fois en Amérique et en Afrique.

(Pedley, 1978)	(Pedley, 1986)	Distribution	Genre admis après la retyfication (McNeill <i>et al.</i> , 2005)
<i>Acacia</i> subg. <i>Phyllodineae</i>	<i>Racosperma</i>	Australie, région Pacifique	<i>Acacia s.s.</i> (type <i>A. penninervis</i>)
<i>Acacia</i> subg. <i>Acacia</i> (type <i>A. nilotica</i>)	<i>Acacia</i>	Amérique, Afrique, Asie	<i>Vachellia</i>
<i>Acacia</i> subg. <i>Aculeiferum</i>	<i>Senegalia</i> sect. <i>Senegalia</i>	Amérique, Afrique, Asie	<i>Senegalia</i>
<i>Acacia</i> subg. <i>Aculeiferum</i> , sect. <i>Filicineae</i>	<i>Senegalia</i> sect. <i>Filicineae</i>	Amérique	<i>Acaciella</i>
<i>Acacia</i> subg. <i>Aculeiferum</i> , groupe 'coulteri'	<i>Senegalia</i> sect. <i>Senegalia</i>	Amérique	<i>Mariosousa</i>
<i>Acacia</i> subg. <i>Aculeiferum</i> , groupe 'skleroxyla'	<i>Senegalia</i> sect. <i>Senegalia</i>	Amérique	Non reconnu



Figure 9 : Photographies illustrant la diversité des différents genres d'*Acacia s.l.* reconnus. Les photographies A et B distinguent respectivement les *Acacias* épineux des *Acacias* à phyllodes. Les photographies B, C, D, E et F illustrent respectivement un représentant de chaque genre d'*Acacia* reconnus : *Acacia* type *Acacia s.s.*, *Vachellia*, *Senegalia*, *Acaciella* et *Mariosousa*.

Crédits- Source des photographies :

A) Stan Shebs - https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Acacia_greggii_thorns.jpg

B) Ethel Aardvark - https://fr.wikipedia.org/wiki/Acacia_holosericea

C) Michelle Greve - <http://powo.science.keew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:77089275-1>

D) JMK - https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Acacia_mellifera,_Phalandingwe,_a.jpg

E) Russ Kleinman et Bill Norris - https://wnmu.edu/academic/nspages/gilafiora/acacia_angustissima.html

F) PAPA Z - <http://swbiodiversity.org/seinet/collections/individual/index.php?occid=7252391>

2.1.4 Le genre *Acacia* au sens large : taxonomie et utilité

Le groupe des *Acacia* Mill. au sens large (*Acacia s.l.* ; Figure 9) est cosmopolite et diversifié, regroupant 1450 espèces (Lewis *et al.*, 2005). C'est d'ailleurs le deuxième plus grand groupe de la famille des *Leguminosae* et le plus diversifié de la sous-famille *Caesalpinioideae* (Maslin *et al.*, 2003). La taxonomie concernant les *Acacias* est en perpétuelle évolution (Miller & Seigler, 2012 ; Tab. 2). Historiquement, trois sous-genres ont d'abord été définis au sein du genre *Acacia* en fonction de leur biogéographie : i) *Acacia* subg. *Acacia* (161 espèces retrouvées en Afrique), ii) *Acacia* subg. *Aculeiferum* Vassal (235 espèces originaires du continent Américain) et iii) *Acacia* subg. *Phyllodineae* (DC.) Seringe (960 espèces issues d'Australie) (Vassal, 1972; Chappill & Maslin, 1995).

A partir des années 2000, des études moléculaires basées sur de l'ADN nucléaire et chloroplastique issu d'un échantillonnage large au sein des *Acacia s.l.* ont établi que (i) *Acacia s.l.* est un groupe polyphylétique, (ii) deux des trois groupes majeurs au sein des *Acacia s.l.* sont monophylétiques et le troisième non-monophylétique, (iii) quelques espèces d'*Acacia s.l.* sont plus proches de la tribu des *Mimoseae* que d'autres lignées d'*Acacia s.l.* et iv) le clade australien prédominant est plus proche d'espèces appartenant à la tribu des *Ingeae* que d'autres *Acacia s.l.* (Miller & Bayer, 2001; Luckow *et al.*, 2003; Bouchenak-Khelladi *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2011). Les observations morphologiques et les données moléculaires ont alors permis de subdiviser et classer les *Acacia s.l.* en cinq genres différents tels que *Acacia* (type *Acacia s.s.* : Fig 9B), *Vachellia* (Figure 9C), *Senegalia* (Figure 9D), *Acaciella* (Figure 9E) et *Mariosousa* (Figure 9F ; Miller & Seigler, 2012).

Les espèces d'*Acacia* sont appréciées dans des secteurs multiples, tels que l'agroforesterie, l'industrie, la conservation, le développement rural, ou l'usage domestique (Adjers & Hadi, 1993; Fagg & Stewart, 1994). Il est intéressant de savoir que concernant le développement rural, un cahier de la *Food Agricultural Organization* (FAO) rapporte que dans les régions sèches d'Afrique et du Proche-Orient, chaque partie de l'arbre peut être exploitée : le bois en tant que combustible et bois d'œuvre, le fourrage pour nourrir le bétail, la gomme des arbres dans la fabrication d'encre, adhésif, produits cosmétiques, confiserie et alimentation, les écorces et les gousses pour produire des tanins utilisées en tannerie, le fût et les racines pour produire des fibres, les fruits à des fins médicinales (exemple : activité muscicide utile contre la schistosomiase), l'arbre en lui-même peut également servir de support pour accueillir des abeilles et produire ainsi du miel d'acacia (Wickens, 1996). En termes de services écosystémiques, les *Acacia* sont utiles notamment pour la stabilisation des sols et pour la rétention d'eau, mais également pour améliorer la fertilité des sols *via* la fixation biologique de l'azote et la production de litière (Hingston *et al.*, 1982; Wickens, 1996). Ces travaux de thèse étudient un *Acacia* à phyllodes retrouvé dans la région Pacifique faisant partie des *Acacia s.s.*

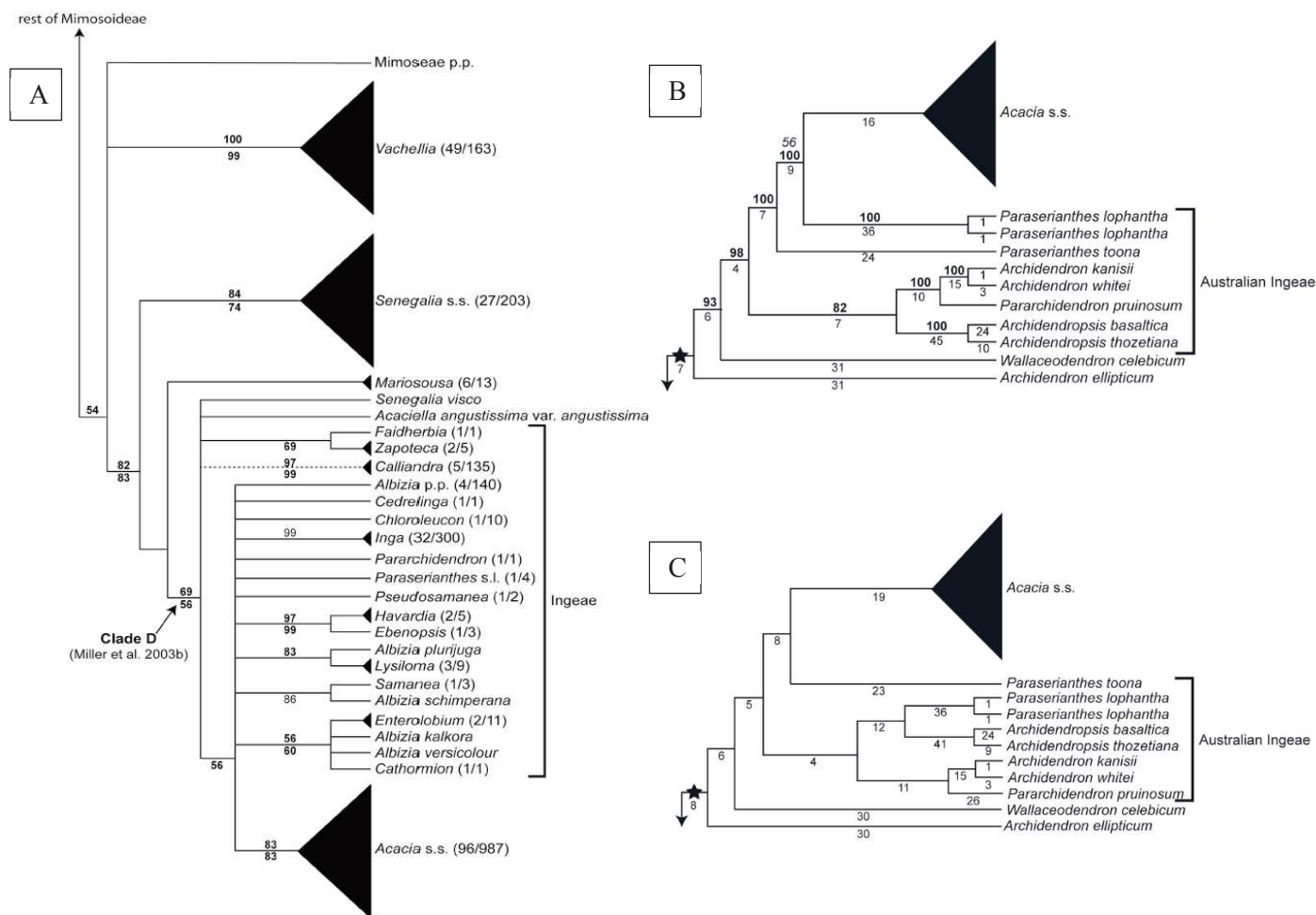


Figure 10 : Arbres phylogénétiques résumant la proximité génétique des *Acacia s.l.* en se basant sur des données ITS et ETS extrait de Brown et al. (2008). La figure 10A positionne le genre *Acacia s.s.* par rapport aux genres *Vachellia*, *Senegalia*, *Mariosousa*, *Acaciella* ainsi que d'autres espèces appartenant à la tribu des Ingeae. Sur la Fig. 10A, la notation (l) correspond au rapport entre le nombre maximum d'espèces où les données moléculaires sont déjà publiées et le nombre total d'espèces recensées au sein du genre. Les figures 10B et 10C présentent deux topologies différentes d'arbres pour identifier les espèces sœurs les plus proches phylogénétiquement des *Acacia s.s.*

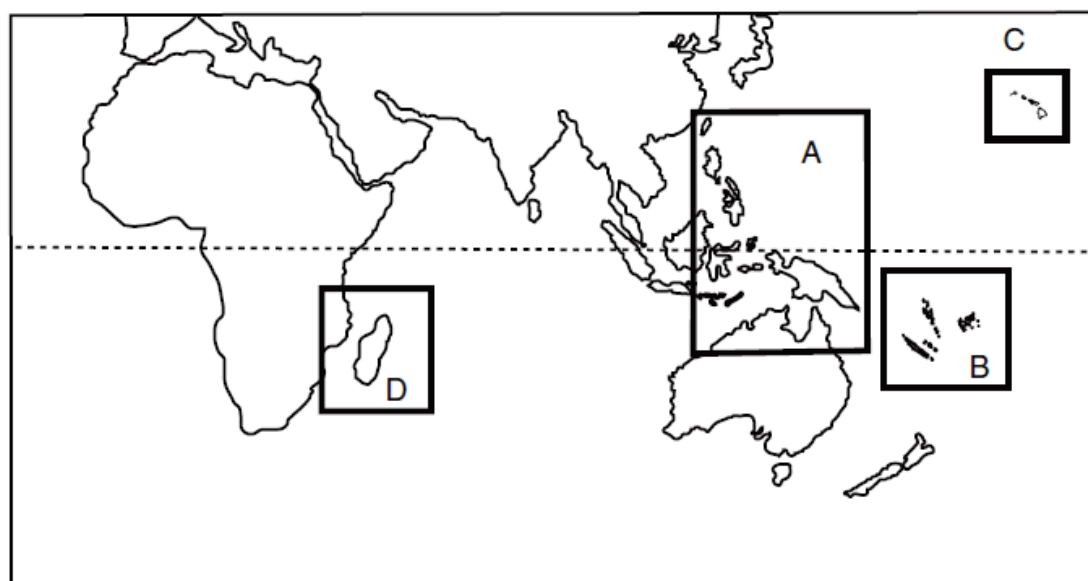


Figure 11 : Carte présentant les 4 grandes régions où l'on retrouve des *Acacias s.s.* à phyllodes en dehors de l'Australie. Légende : A) Asie du Sud-Est, Indonésie et Nouvelle-Guinée, B) Nouvelle-Calédonie, Vanuatu, Fiji et Samoa, C) Hawaï et D) Madagascar (introduits) et les Mascareignes (endémique). Extrait de Brown *et al.*, 2012).

2.1.5 Le genre *Acacia* Mill. *sensu stricto*

Les *Acacia* subg. *Phyllodineae* DC (Maslin, 2008) sont aujourd'hui reconnus en tant que *Acacia* Mill. *sensu stricto* (*Acacia s.s.*) et comprennent plus de 1000 espèces (Lewis, 2005) formant un groupe monophylétique (Murphy, 2008). Par rapport aux autres légumineuses tropicales, les *Acacia s.s.* sont plus proches des espèces de la tribu des *Ingaea* que des autres acacias appartenant aux genres *Vachellia*, *Senegalia*, *Mariosousa* (Brown *et al.*, 2008) ; Figure 10A). Le genre le plus proche des *Acacia s.s.* serait celui de *Paraserianthes*, et l'espèce représentant le groupe sœur des *Acacias s.s.* serait *P. lophanta* (Willd.) I.C.Nielsen (Figure 10B et 10C ; Brown *et al.*, 2011).

Une très grande majorité de ces *Acacia s.s.* se situe en Australie (Maslin, 2004) et au moins un tiers de cette diversité aurait été exportée en dehors de son aire de répartition naturelle par l'Homme (Griffin *et al.*, 2011). Le genre *Acacia s.s.* est dominant dans les végétations arides et semi-arides, bien que la plupart de la diversité se situe dans le Sud-Ouest de l'Australie occidentale ainsi que le long de la Cordillère australienne (Maslin, 2001). A partir de l'Australie, 17 espèces du genre *Acacia* auraient émergé suite à des dispersions géologiques et anthropiques. Des analyses phylogénétiques ont permis de classer cette dispersion en 4 grandes régions : i) Asie du Sud-Est, Indonésie et Nouvelle Guinée, ii) Nouvelle-Calédonie, Vanuatu, Fiji et Samoa, iii) Hawaï et iv) Madagascar et les Mascareignes (Figure 11 ; Brown *et al.*, 2012). Neuf de ces espèces dispersées se retrouvent également au Nord de l'Australie (*A. auriculiformis*, *A. crassicarpa*, *A. leptocarpa*, *A. mangium*, *A. oraria*, *A. pubirhachis*, *A. sericoflora*, *A. simsii* et *A. spirorbis* subsp. *solandri* ; Brown *et al.*, 2012). Quelques espèces d'*Acacia s.s.* en dehors de l'Australie présentent un intérêt en agroforesterie tropicale, que ce soit pour la production de bois, combustible, réhabilitation des sols ou encore la production de papier (McDonald *et al.*, 2001).

Cependant, certaines espèces d'*Acacia* australiens peuvent causer des problèmes d'invasions suite à leur introduction. A ce jour, 23 de ces espèces sont reconnues comme possédant un potentiel invasif extrêmement élevé en dehors de leur habitat d'origine (Richardson & Rejmánek, 2011). Cette caractéristique serait en partie conférée par les graines pouvant s'accumuler dans les sols et rester viables sur le terrain pendant une cinquantaine d'années (Farrell & Ashton, 1978). Les invasions d'*Acacias* peuvent donc réapparaître après de longues périodes et c'est la raison pour laquelle différents moyens de gestion sont mis en place pour tenter de diminuer ces réservoirs de graines. Parmi ces moyens, on compte i) le traitement par le feu ou la perturbation du sol de surface pour stimuler la germination des graines enfouies, ii) le retrait des graines de la litière en les aspirant au pied des adultes, iii) la couverture des graines avec 20 cm de sol pour limiter leur germination ou bien exporter le sol (Wilson *et al.*, 2011). Une utilisation d'hybrides stériles est également recommandée pour limiter ces invasions (Wilson *et al.*, 2011). Un facteur renforçant le caractère invasif des *Acacia* est leur capacité à s'associer à des rhizobia. Ces bactéries sont communément retrouvées dans les sols

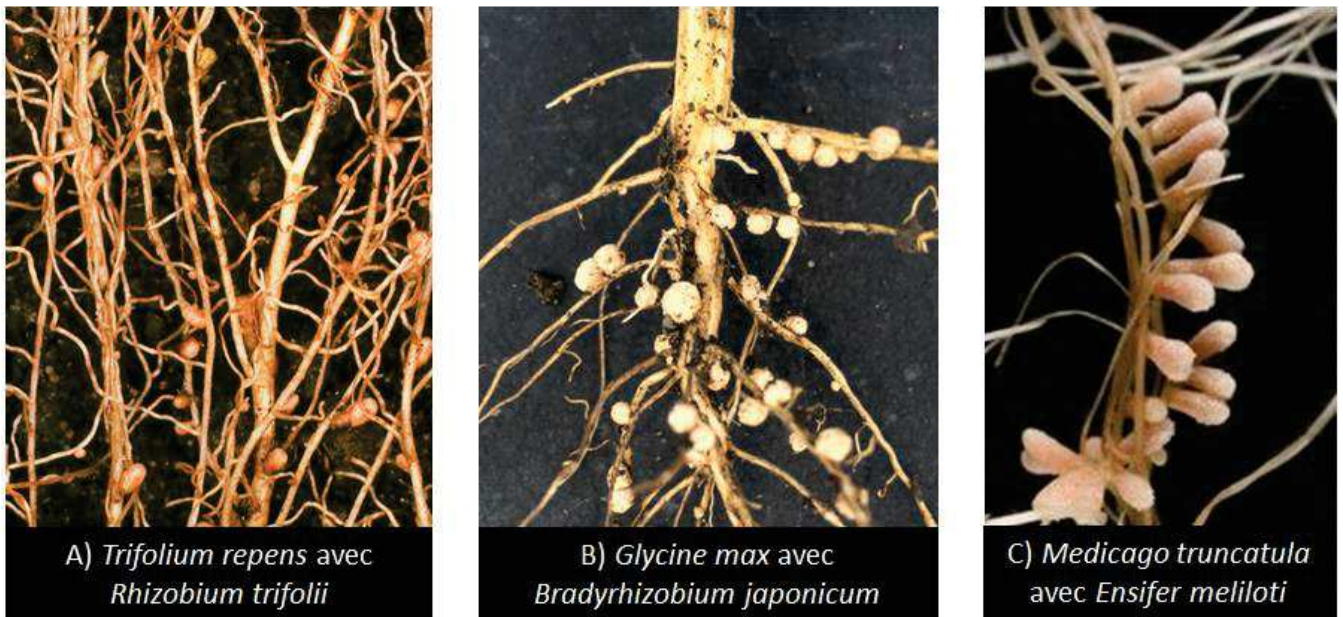


Figure 12 : Photographies des racines de plantes portant des nodules. Légende : A) Racines du trèfle blanc infectées par une souche de *Rhizobium trifolii*. B) Nodules situés sur les racines de la luzerne, hébergeant *Bradyrhizobium japonicum*. C) La plante modèle *Medicago truncatula* portant des nodules infectés par *Ensifer meliloti*.

Crédits – sources :

A) Jeremy Burgess - <https://fineartamerica.com/featured/root-nodules-of-white-clover-dr-jeremy-burgess.html>

B) Hans Kandel - <https://www.ag.ndsu.edu/cpr/plant-science/soybean-nodulation-07-02-15>

C) Gabriele Bucci - <http://ibbr.cnr.it/ibbr/resources/medicago-truncatula-mutant-collections>

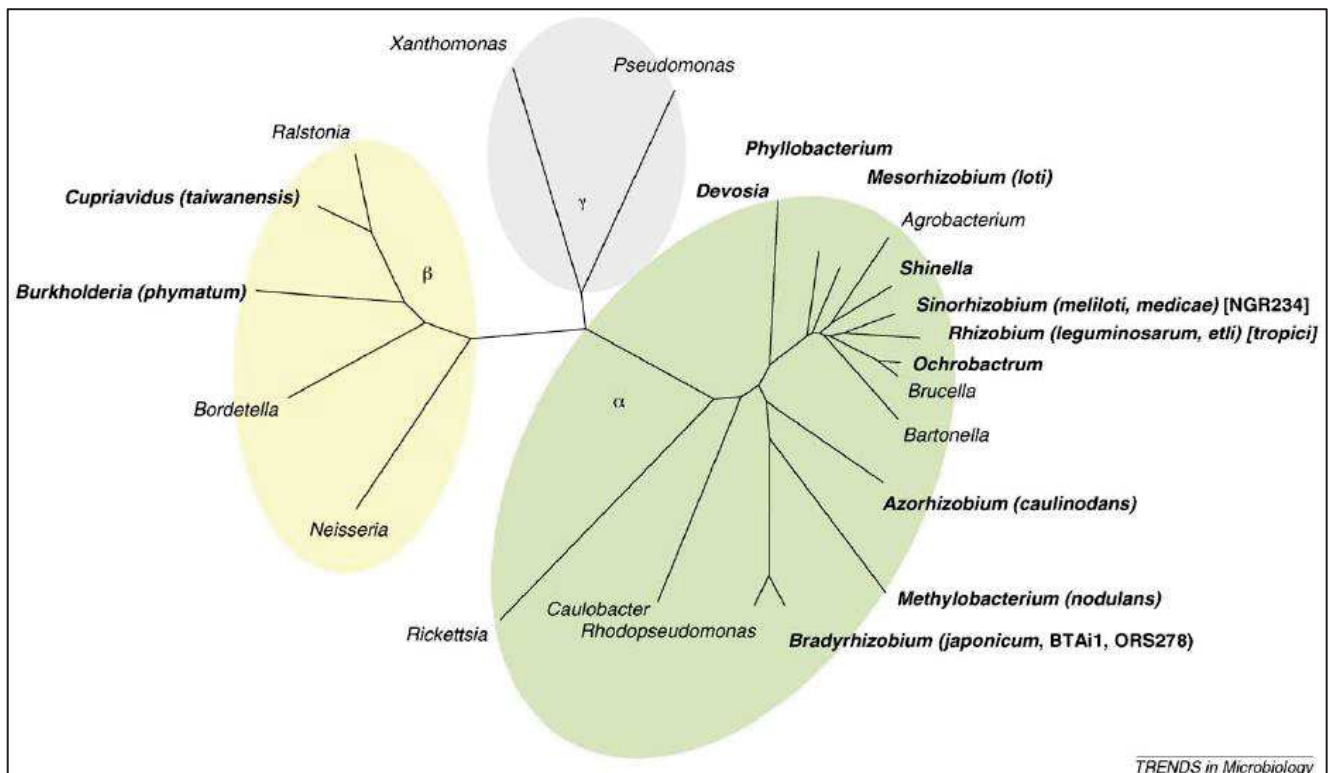


Figure 13 : Arbre phylogénétique non-enraciné de séquences d'ADNr 16S sélectionnées de α -, β - et γ -protéobactéries. Les genres en caractères gras contiennent des rhizobia. Les souches ou espèces rhizobiennes dont les génomes ont été complètement séquencés sont indiquées entre parenthèses. Les séquences de génomes publiés sont celles de *C. taiwanensis*, *M. loti*, *S. meliloti*, *R. leguminosarum*, *R. etli*, *A. caulinodans*, *Sinorhizobium* sp. strain NGR234, *B. japonicum* et *Bradyrhizobium* sp. BTAi1 et ORS278. Figure extraite de Masson-Boivin *et al.* (2009).

et permettent de fixer l'azote atmosphérique lors d'association symbiotiques avec une légumineuse (VanInsberghe *et al.*, 2015).

2.2 Les rhizobia

2.2.1 Découverte et taxonomie

Le premier isolement et la première culture pure de bactéries fixatrices d'azote à partir d'un nodule de légumineuse remonte à la fin du XIX^{ème} siècle (Beijerinck, 1888). L'année suivante, cette bactérie est appelée *Rhizobium leguminosarum* (Frank, 1889). Ces bactéries induisent la formation de nodules chez des légumineuses. Elles présentent une vitesse de croissance rapide ou lente, sont alors qualifiées de « rhizobia » et classées dans un seul et même genre : *Rhizobium* (Frank, 1889). Les différentes espèces de *Rhizobium* découvertes ont été nommées en fonction de leur légumineuse partenaire. Par exemple, les bactéries à croissance rapide issues de *Phaseoli* (haricot) sont nommées *R. phaseoli* et celles extraites de nodules de *Trifolium* sp. (trèfle) sont appelées *R. trifolii* (Figure 12A ; Dangeard, 1926). Concernant les bactéries à croissance lente, *R. japonicum* est extrait de la glycine (Figure 12B ; Buchanan, 1926) et *R. lupinii* est associé au genre *Lupinus* (Eckhardt *et al.*, 1931). Une cinquantaine d'années plus tard, un nouveau genre est créé pour rassembler les bactéries à croissance lente : le genre *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982). La découverte de *R. fredii*, une bactérie à croissance rapide capable d'induire des nodules chez le soja, a montré qu'une légumineuse pouvait s'associer à des espèces de rhizobia très différentes, remettant alors en question le critère de nomination des rhizobia en fonction de leur hôte (Scholla & Elkan, 1984). L'espèce *Rhizobium fredii* a par la suite été incluse dans un deuxième genre de bactéries à croissance rapide : le genre *Sinorhizobium* (Chen *et al.*, 1988).

En 1984, l'utilisation du gène *rrs* (codant pour l'ARN 16S) est une avancée majeure permettant de classer les rhizobia parmi les α -protéobactéries (Woese *et al.*, 1984). Suite à ce changement, les genres *Allorhizobium* et *Agrobacterium* ont été redéfinis en tant que *Rhizobium* (Young *et al.*, 2001). Les analyses du gène *rrs* ont montré que les espèces du genre *Sinorhizobium* étaient très proches d'une espèce décrite antérieurement : *Ensifer adhaerens* (Casida, 1982). C'est pourquoi il est considéré aujourd'hui que le nom de genre *Sinorhizobium* doit être remplacé par celui des *Ensifer* (Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes, 2008). Le gène *rrs* est très conservé chez les bactéries, et donc son utilisation seule n'est souvent pas suffisante pour distinguer des espèces proches au sein d'un même genre. Pour différencier des souches appartenant au même genre tel que *Bradyrhizobium*, il est possible d'utiliser des analyses de séquences multilocus, en incluant d'autres gènes de ménage comme les gènes *atpD*, *recA*, *gyrB*, *dnaK*, etc. (Menna *et al.*, 2009). L'identification des espèces rhizobiennes ne cesse d'augmenter, et en 2003 Sawada *et al.* (2003) recensaient déjà plus de 70 espèces de rhizobia réparties dans 12 genres différents : des α -protéobactéries appartenant aux genres *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium* et *Shinella*,

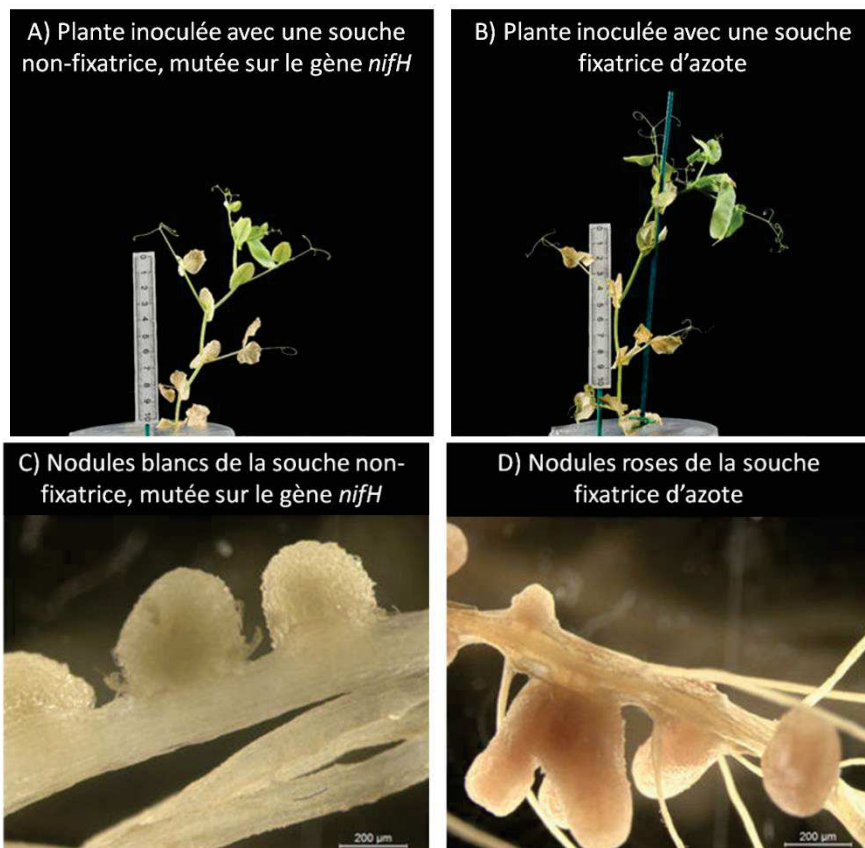


Figure 14 : Photographies comparant la souche non-fixatrice RU3940 (A et C) et la souche fixatrice Rlv3841 (B et D), extrait de Westohék *et al.*, 2017. Après cinq semaines, les plantes inoculées avec la souche non-fixatrice (A) présentent une biomasse aérienne de $0,32 \pm 0,04$ mg tandis que les plants inoculés avec la souche fixatrice en présentent le double avec $0,68 \pm 0,04$ mg (B). La souche non-fixatrice produit des nodules blancs (C) tandis que la souche fixatrice en produit des roses (D). La barre d'échelle représente 200 µm.
















Forme :	Contour :	Hauteur :
ronde, circulaire 	régulier 	plate 
irrégulière 	crénelé 	arrondie 
filandreuse 	ondulé 	haute au centre 
allongée 	feuillet 	haute 
	filandreux 	convexe 
	bouclé 	
Pigment : couleur et diffusion dans le milieu	Taille : très petite – presque invisible	
Opacité : transparente, translucide, opaque	petite - inférieure à 2 mm de diamètre	
Surface : lisse et brillante (type S) ou rugueuse et pissée (type R)	moyenne - entre 2 et 5 mm de diamètre	
Texture : muqueuse (mielleuse), grasseuse, crémeuse, sèche	large – supérieure à 5 mm de diamètre	
Odeur : si présente, essayer de la décrire		

Figure 15 : Critères morphologiques et vocabulaire utilisés pour décrire une espèce bactérienne isolée sur un milieu solide, extrait et remanié de Herrmann *et al.* (2011).

ainsi que des β -protéobactéries appartenant aux genres *Burkholderia* et *Cupriavidus* (Figure 13 ; Masson-Boivin *et al.*, 2009).

Il est intéressant de noter que dans un même genre bactérien, il est possible de trouver à la fois des bactéries nodulantes et non-nodulantes (Masson-Boivin *et al.*, 2009). *Bradyrhizobium betae* a été la première espèce de rhizobia isolée en dehors d'un nodule (à partir des racines de *Beta vulgaris*) et incapable d'établir une symbiose fixatrice d'azote (Rivas *et al.*, 2004). Le genre *Methylobacterium* contient majoritairement des bactéries saprophytiques, mais également une espèce rhizobienne, *M. nodulans* (Jourand *et al.*, 2004). De la même façon, *Cupriavidus taiwanensis* peut être isolé à partir de nodules racinaires ou d'échantillons cliniques (Masson-Boivin *et al.*, 2009). Aujourd'hui, il est possible de créer des rhizobia non-nodulants grâce aux avancées génétiques, en mutant chez un rhizobia sauvage et fixateur d'azote, des gènes essentiels au fonctionnement de la fixation d'azote, tel que le gène *nifH* (Figure 14 ; Westhoek *et al.*, 2017).

2.2.2 Méthodes d'isolement des rhizobia

D'un point de vue technique, il faut prendre certains paramètres en compte pour isoler correctement des souches de rhizobia (Herrmann *et al.*, 2011). Par exemple, les nodules de légumineuses annuelles se récoltent plus facilement sur de jeunes plantules. Néanmoins, des études rapportent que les rhizobia s'associant aux légumineuses à des stades précoces peuvent être différentes des rhizobia isolés à partir de nodules de plants plus âgés (produisant des graines). Une hypothèse pour expliquer ces observations serait que les cortèges de rhizobia évoluent en fonction de la saisonnalité et des conditions du sol (Caldwell & Weber, 1970; Weber & Miller, 1972). A titre d'exemple, dans une étude portant sur *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, (Chee *et al.*, 1989) observent des nodules à 98 jours, mais aucun à 205 et 274 jours. En revanche, les nodules réapparaissent sur le système racinaire à 423 jours (Chee *et al.*, 1989). Concernant le nombre de prélèvements, les expériences passées recommandent de prélever 10 à 20 nodules par plante sur 2 à 5 individus par site, afin d'estimer correctement la variabilité des rhizobia associés à la plante (Herrmann *et al.*, 2011). Pour obtenir des nodules frais, il est possible de faire pousser une plante sur des échantillons de sol provenant du terrain. Par exemple, le haricot (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) a été utilisé en tant que « plante piège » pour caractériser la diversité génétique et symbiotique de sols amazoniens (Jaramillo *et al.*, 2013). Cependant, cette méthode ne produira pas nécessairement les mêmes nodules que ceux se formant naturellement sur le terrain (Herrmann *et al.*, 2011). La viabilité des bactéries symbiotiques dans le nodule est variable et il est recommandé de faire les isolements le jour même de la récolte ou le suivant (Herrmann *et al.*, 2011). Lorsque ce n'est pas possible, les nodules doivent être stockés correctement ; séchés ou congelés (Herrmann *et al.*, 2011). L'isolement de souches dépend de la qualité de l'échantillon et il faut éviter de travailler à partir de nodules endommagés. Les méthodes de stérilisation et d'isolement varient en fonction des microorganismes et différents protocoles ont été mis au point pour les organismes suivants : *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium* et

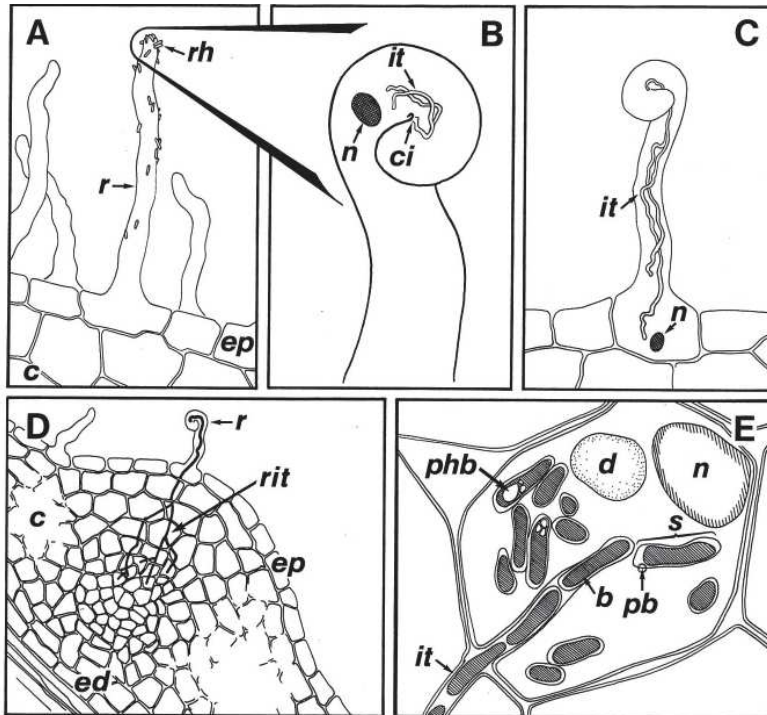


Figure 16 : Schéma de l'invasion des poils racinaires par *Rhizobium*, extrait de Perret *et al*, 2000.

Légende : A) Les rhizobia (*rh*) colonisent la rhizosphère et s'attachent aux poils racinaires (*r*). B) les facteurs Nod induisent le recourbement du poil racinaire et permettent aux bactéries de pénétrer au centre de l'infection (*ci*). Le noyau de la plante (*n*) précède le cordon d'infection (*it*). C) Toujours accompagné du noyau, l'allongement du cordon d'infection (*it*) arrive à la base de la cellule du poil racinaire. D) Le cordon d'infection se ramifie (*rit*) proche du primordia nodulaire formé par des cellules corticales en division. E) Les bactéroïdes (*b*) sont libérés du cordon d'infection (*it*) et forment des symbiosomes (*s*) dans les cellules nodulaires. Des granules de poly-β-hydroxybutyrate (*phb*) s'accumulent dans les bactéroïdes, entourés d'une membrane pér bactéroïdienne (*pb*). Autres abréviations : *c*, cortex ; *d*, vacuole digestive ; *ep*, épiderme ; *ed*, endoderme.

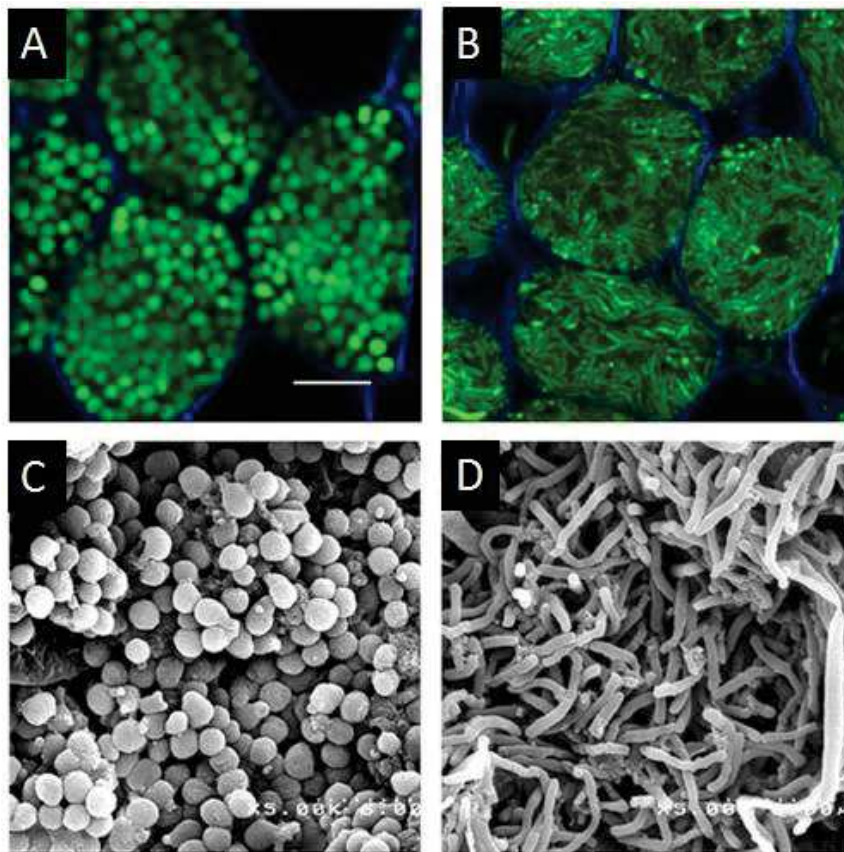


Figure 17 : Photographies de bactéroïdes prises au microscope confocal. La même bactérie (*Bradyrhizobium* sp. ORS285) présente une morphologie différente suivant la plante hôte (à gauche chez *Aeschynomene indica*, à droite chez *Aeschynomene afraspera*). Les photographies A) et B) ont été prises avec un microscope confocal, avec un marquage à la GFP (Green Fluorescent Protein) pour mettre en évidence les bactéroïdes (en vert) et un marquage bleu qui est spécifique aux parois intercellulaires. Les photographies C) et D) proviennent d'un microscope électronique à balayage (MEB).

Crédit – Source : Eric Giraud - <https://umr-lstm.cirad.fr/principaux-projets/bugsinacell>

Bradyrhizobium (Brockwell, 1980; Date & Halliday, 1987) ; *Burkholderia* (Bontemps *et al.*, 2010) ; *Frankia* (Diem *et al.*, 2011).

Une fois les bactéries isolées sur des milieux de culture solides, il est possible de les caractériser à partir de critères morphologiques simples tels que la forme, le contour, la hauteur, la pigmentation, l'opacité, la surface, la texture, l'odeur et la taille (Figure 15).

2.2.3 Mécanismes symbiotiques classiques

2.2.3.1 Mise en place du nodule *via* un dialogue moléculaire

Les rhizobia vivent sous une forme libre dans le sol mais ne peuvent fixer l'azote que lors d'associations symbiotiques avec une plante hôte compatible en formant des organes spécifiques à la fixation biologique de l'azote : les nodules. L'organogenèse des nodules comporte plusieurs étapes (Patriarca *et al.*, 2004) qui débutent par un dialogue moléculaire, nécessaire à la reconnaissance mutuelle entre la plante et ses symbiontes (Oldroyd, 2013). Les racines des légumineuses sécrètent des composés de type flavonoïdes, chimioattractifs et détectés par les bactéries (Gulash *et al.*, 1984; Kape *et al.*, 1991). Les rhizobia reconnaissent ces flavonoïdes et sont attirés vers la plante (Figure 16A). Plusieurs molécules telles que des lectines sont produites par la légumineuse et peuvent lier des carbohydrates, afin d'attacher les bactéries au niveau des racines (Arason, 1996; Van Damme *et al.*, 2004). La présence des flavonoïdes va induire chez les rhizobia la synthèse de lipochitooligosaccharides (facteurs Nod), qui après avoir été perçus par la plante au niveau de récepteurs racinaires vont déclencher chez la plante l'organogenèse des nodules au niveau du cortex racinaire (Dénarié *et al.*, 1996). En parallèle de cette organogenèse, les rhizobia colonisent l'intérieur des poils absorbants de la plante. Ces poils absorbants se replient (Wood & Newcomb, 1989) et un cordon d'infection se forme (Figure 16B ; (Rae *et al.*, 1992). Le cordon pénètre dans le cortex racinaire (Figure 16C) et se ramifie (Figure 16D). Les rhizobia utilisent la paroi du cordon d'infection pour être endocytés à l'intérieur des cellules et coloniser les tissus du nodule (Brewin, 2004).

2.2.3.2 La différenciation en bactéroïdes et le maintien de la symbiose

A l'intérieur du symbiosome, les rhizobia subissent des changements morphologiques et métaboliques, aboutissant à une différenciation en bactéroïdes (Figure 16E et Figure 17). Le maintien de ces bactéroïdes est influencé par des peptides du type NCRs (Nodules-specific Cystein-Rich). Ce sont des peptides de défense extrêmement abondants dans les nodules de certaines légumineuses pouvant avoir un rôle positif ou négatif sur la vie intracellulaire des bactéroïdes. Certains de ces NCRs contrôlent la différenciation intracellulaire des bactéries en bactéroïdes (Figure 17 ; (Van de Velde *et al.*, 2010; Czernic *et al.*, 2015). Fait intéressant, une même souche bactérienne peut développer des bactéroïdes sphériques ou allongés selon la plante hôte (Figure 17). Les bactéroïdes sont le siège du processus de la fixation biologique de l'azote pour la plante (Jones *et al.*, 2007).

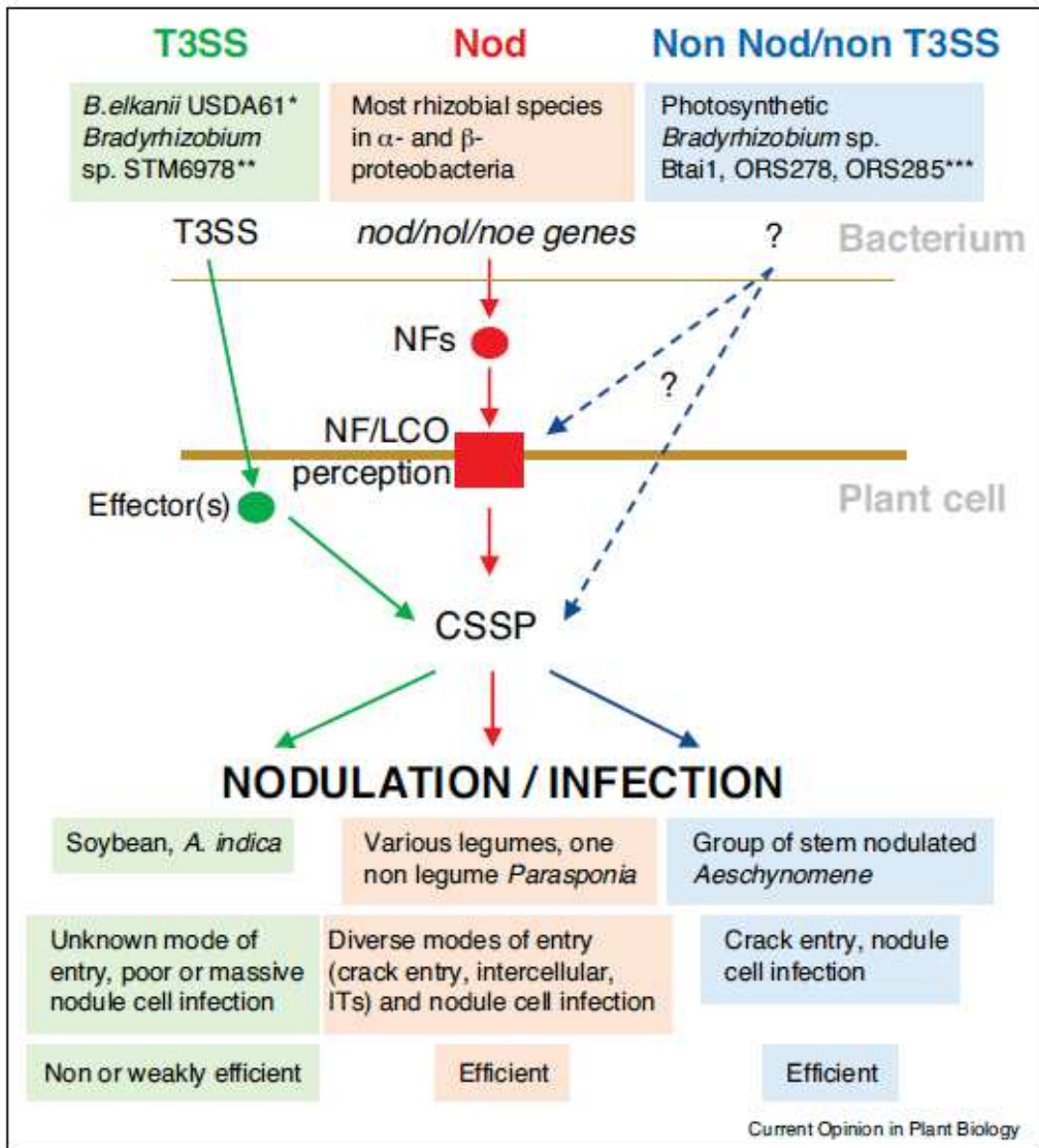


Figure 18 : Schéma des différentes stratégies aboutissant à la formation d'une symbiose fixatrice d'azote, extrait de Masson-Boivin & Sachs (2018). En vert, la stratégie faisant intervenir le T3SS et des effecteurs bactériens. En rouge, la stratégie commune utilisant les facteurs Nod. En bleu, la stratégie non-Nod/non-T3SS. CSSP : *Common Symbiotic Signalisation Pathway*.

2.2.3.3 La symbiose fixatrice d'azote

Le processus de fixation d'azote se fait *via* une enzyme appelée nitrogénase pouvant être inactivée de façon irréversible si elle entre en contact avec de l'oxygène. La léghémoglobine a donc pour fonction de réguler la concentration d'oxygène dans le nodule à une valeur très faible, de l'ordre de 10 nM (Ott *et al.*, 2005). Une fois que les nodules sont matures et que le processus de fixation d'azote est fonctionnel, les nodules sont généralement de couleur rosée du fait de la présence de cette léghémoglobine. En revanche, la présence de nodules blancs indique que la symbiose n'est pas fonctionnelle (Figure 14). C'est le cas par exemple lorsque la souche de rhizobia *Phyllobacterium trifolii* infecte la plante *Trifolium repens* (Valverde *et al.*, 2005).

2.2.4 Autres stratégies permettant d'établir des symbioses rhizobium-légumineuse

La plupart des espèces de rhizobia au sein des α - et β -protéobactéries utilisent les facteurs Nod pour établir une symbiose avec les plantes (Perret *et al.*, 2000). Cependant, il existe d'autres stratégies aboutissant à la nodulation (Figure 18 ; Masson-Boivin & Sachs, 2018). Un exemple de stratégie alternative fait intervenir le système de sécrétion de type 3 (aussi appelé T3SS) chez les rhizobia. Certaines souches de rhizobia, telles que *Bradyrhizobium elkanii* USDA61 et *Bradyrhizobium* sp. STM6978, sont capables de délivrer dans la plante des effecteurs bactériens *via* leur T3SS. En absence de facteur Nod, ces effecteurs sont capables d'activer la voie de signalisation symbiotique commune et d'établir une symbiose fixatrice d'azote (Okazaki *et al.*, 2013, 2016). Une autre stratégie permettant la mise en place de la symbiose fixatrice d'azote n'est pas encore élucidée mais elle ne fait intervenir ni facteurs Nod, ni les fonctions du T3SS. Fait remarquable, aucun mutant non-nodulant n'a pu être obtenu à ce jour et indique que les gènes nécessaires à l'infection et à la formation du nodules sont des gènes essentiels à la bactérie (Giraud *et al.*, 2007). Cette stratégie ferait intervenir les gènes de la voie de signalisation commune et un modèle privilégié pour l'étudier est *Aeschynomene evenia* (Chaintreuil *et al.*, 2016).

2.2.5 Méthodes d'estimation de la fixation d'azote

Le processus de fixation biologique de l'azote devient fonctionnel une fois que le nodule est établi et mature. Ce processus consomme 16 ATP selon la formule suivante : $N_2 + 8 H^+ + 8 e^- \rightarrow 2 NH_3 + H_2$.

Diverses méthodes sont disponibles pour évaluer la fixation d'azote d'une plante : la méthode de l'abondance naturelle du ^{15}N , l'enrichissement isotopique, le test de réduction d'acétylène (ARA) ou encore le dosage des uréides (Hardy *et al.*, 1968 ; Högberg, 1997 ; Boddey *et al.*, 2000 ; Unkovitch *et al.*, 2008). Ces méthodes possèdent leurs propres limites et il faut choisir la plus adaptée à la problématique de l'étude scientifique envisagée (Nygren *et al.*, 2012 ; Peoples *et al.*, 2015). Ce travail de thèse combine à la fois une approche sur le terrain et de la culture *in vitro*, c'est pourquoi deux méthodes différentes ont été choisies : l'abondance naturelle du ^{15}N et le test ARA.

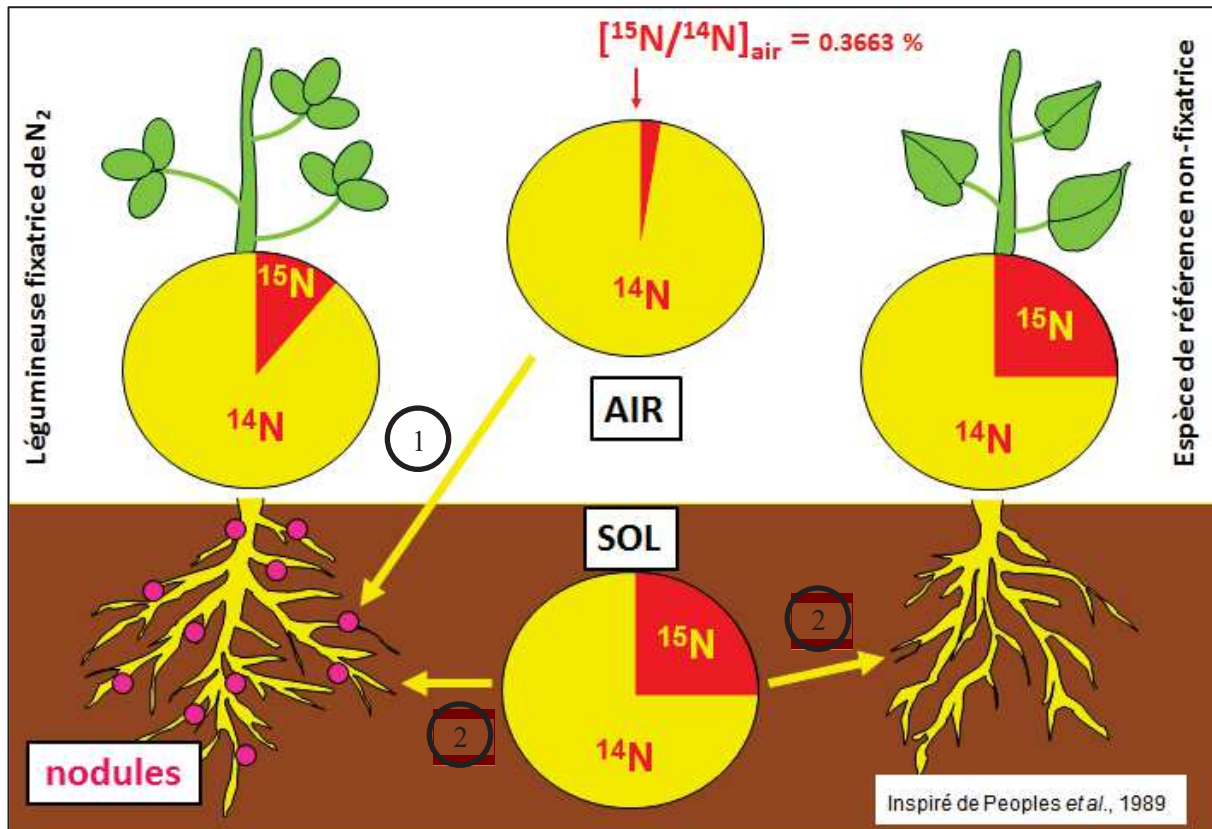


Figure 19 : Schéma illustrant la méthode de l'abondance naturelle du ^{15}N pour estimer la fixation biologique de l'azote en conditions naturelles. Les processus numérotés sont les suivants : 1) fixation biologique de l'azote *via* la symbiose rhizobium/légumineuse et 2) assimilation de l'azote *via* le système racinaire.

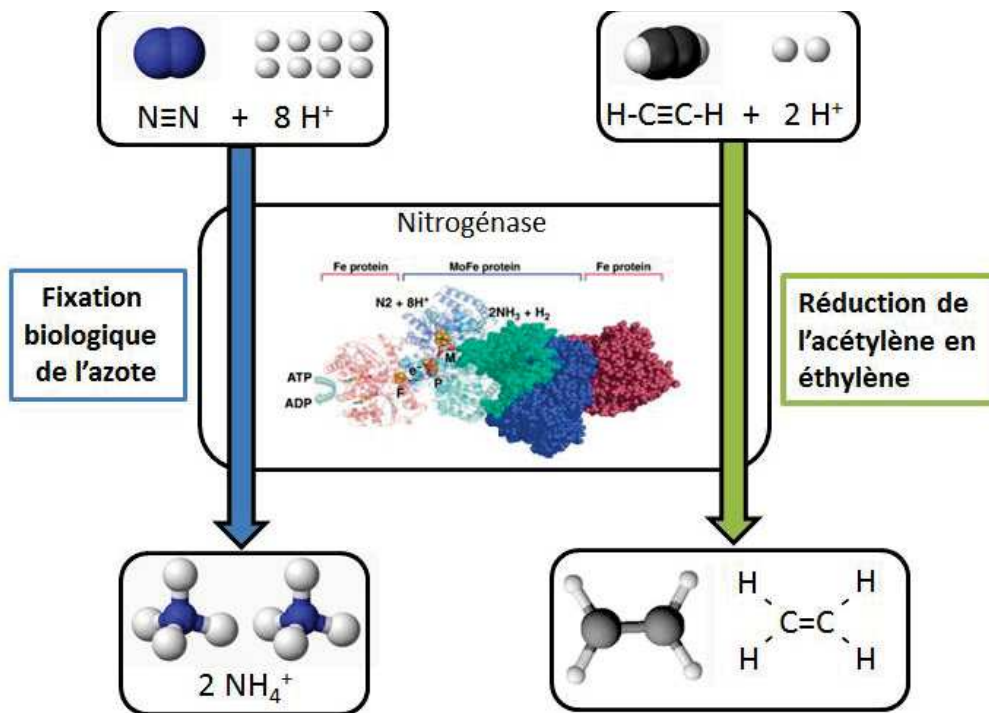


Figure 20 : Schéma du fonctionnement de la nitrogénase dans le cadre de la fixation biologique de l'azote (à gauche) et de la dégradation de l'acétylène en éthylène (à droite). L'illustration représentant la structure de la nitrogénase est extraite de Oldroyd & Dixon (2014). Les illustrations des molécules sont tirées du site de Wikipédia.

La méthode de l'abondance naturelle utilise la présence d'un isotope stable et lourd de l'azote, le ^{15}N . Le principe de la méthode repose sur la différence du rapport $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ mesuré pour une légumineuse et pour des espèces de référence non-fixatrices d'azote (Figure 19). La première étape consiste à calculer l'écart entre le rapport $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ de l'air considéré comme stable (0,3663 ‰ ; Mariotti, 1983) et celui des plantes. On obtient alors un delta ($\delta^{15}\text{N}$) s'exprimant en ‰. Les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ permettent ensuite de calculer le pourcentage d'azote provenant de la fixation biologique chez une légumineuse (%Ndfa) en utilisant la formule de Shearer & Kohl (1986) : $\%Ndfa = (\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}} - \delta^{15}\text{N}_f) / (\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}} - \beta) \times 100$. Le $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$ correspond au $\delta^{15}\text{N}$ de la plante non-fixatrice, le $\delta^{15}\text{N}_f$ correspond au $\delta^{15}\text{N}$ de la légumineuse et le paramètre β correspond au $\delta^{15}\text{N}$ de la légumineuse dans des conditions où elle fixe 100% de son azote. En théorie, plus le $\delta^{15}\text{N}$ d'une légumineuse est proche de 0 ‰ et différent des espèces de référence, plus le pourcentage d'azote fixé par la légumineuse est élevé.

La méthode de l'enrichissement isotopique utilise également le rapport $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. Le principe de cette technique repose sur un enrichissement artificielle du sol avec un fertilisant marqué en ^{15}N . La formule du %Ndfa est la suivante : $\%Ndfa = 1 - (E_{\text{legume}} / E_{\text{reference plant}})$, où E correspond à l'enrichissement en ^{15}N , exprimé en pourcentage d'atome ^{15}N en excès (McAuliffe *et al.*, 1958).

Le principe du test ARA repose sur la capacité de la nitrogénase à dégrader l'acétylène en éthylène (Hardy *et al.*, 1968 ; Figure 20). En effet, cette enzyme permet de briser à la fois la triple liaison ($\text{N}\equiv\text{N}$) du diazote contenu dans l'atmosphère avant de le transformer en ammonium mais également de briser la triple liaison de l'acétylène ($\text{H}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$) pour le réduire en éthylène (Figure 20). Techniquement, les légumineuses sont placées dans des flacons scellés, une partie de l'air est retirée puis remplacée par de l'acétylène avant de laisser incuber quelques heures. Ensuite, un échantillon de l'air du flacon est prélevé puis analysé par Chromatographie à Phase Gazeuse (CPG). Si la nitrogénase a bien fonctionné en réduisant de l'acétylène, l'appareil détecte la formation d'un pic d'éthylène et valide le fait que la symbiose fixatrice d'azote est fonctionnelle (Hardy *et al.*, 1968).

Mesurer la fixation d'azote permet d'estimer la contribution de la symbiose rhizobium/légumineuse dans la nutrition de la plante. Cependant, il ne faut pas oublier que le fonctionnement de cette symbiose est sujette aux conditions environnementales et certains paramètres du sol, notamment les éléments traces métalliques, peuvent affecter l'état physiologique de la plante hôte ou impacter la communauté rhizobienne, influençant de manière directe ou indirecte le processus de fixation d'azote (Zahran, 1999 ; Emamverdian *et al.*, 2015).

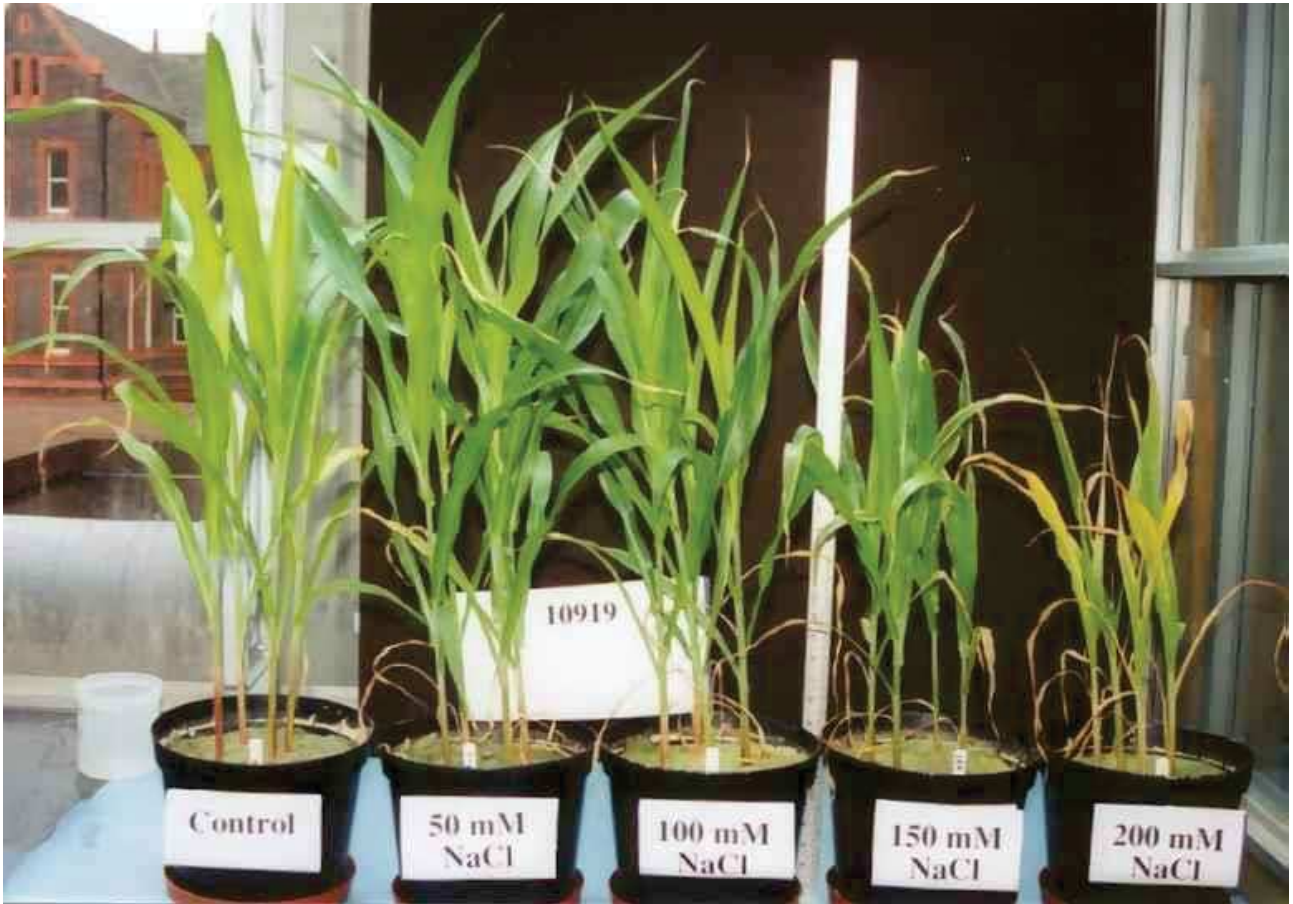


Figure 21 : Photographie de plants d'une variété de sorgho sensible à la salinité. Les plants ont été arrosés avec des solutions nutritives présentant des concentration en NaCl croissantes, de 50 à 200 mM.

Source : <https://www.liverpool.ac.uk/~sd21/stress/salt.htm>

2.3 Influence des paramètres environnementaux

2.3.1 L'environnement *versus* le développement des plantes

L'état physiologique de l'hôte (dans notre cas le végétal) va conditionner le fonctionnement de la symbiose fixatrice d'azote (Zahran, 1999 ; Emamverdian *et al.*, 2015). Le potentiel fixateur d'azote d'une souche compétente de rhizobia, capable d'établir une symbiose avec une légumineuse, ne pourra pas être optimal si sa plante hôte est soumise à des perturbations liées aux paramètres environnementaux (Zahran, 1999). Ces perturbations peuvent se présenter sous la forme d'un stress salin, un pH du sol défavorable, un excès ou un manque d'humidité, un dysfonctionnement de la photosynthèse, une infection par des phytopathogènes ou encore une exposition à des toxicités métalliques (Brockwell *et al.*, 1995). Ces observations sont liées à une théorie stipulant que « le niveau de production d'une culture ne peut pas être plus élevé que le maximum défini par le facteur limitant » (Brockwell *et al.*, 1995). Les paragraphes suivant détaillent les effets de deux facteurs limitant le développement des plantes : la salinité et les ETM. Des précisions sont apportées concernant les effets phytotoxiques des ETM selon les éléments chimiques.

La salinité menace l'agriculture de nombreuses régions arides ou semi-arides (Ashraf *et al.*, 2008). Le stress salin entraîne la diminution du potentiel osmotique de la solution du sol et des effets spécifiques d'ions (principalement Na et Cl) (Munns & Tester, 2008). Ce stress osmotique provoque un déséquilibre nutritionnel de la plante et une toxicité cellulaire, affectant le développement des plantes (Figure 21 ; Munns & Tester, 2008). La tolérance au sel varie selon les espèces de légumineuses. A titre d'exemple, l'espèce *Pisum sativum* est décrite comme sensible à la salinité, alors que les espèces de *Vicia faba*, *Phaseolus vulgaris* et *Glycine max* sont décrites comme tolérantes au stress salin (Abdel-Wahab & Zahran, 1981). D'autres espèces de légumineuses telles que *Prosopis*, *Acacia* et *Medicago sativa* sont également tolérantes à la salinité (Fagg & Stewart, 1994).

Les ETM affectent le développement des plantes (Emamverdian *et al.*, 2015). Selon leur propriétés physico-chimiques, leurs effets peuvent se classer en deux groupes : les ETM sensibles au redox (Cr, Cu, Mn et Fe) et les ETM non sensibles au redox (Cd, Ni, Hg, Zn). Les ETM sensibles au redox induisent la formation de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO, plus couramment appelés ROS en anglais pour *Reactive Oxygen Species*) (Schützendübel & Polle, 2002). Ces DRO provoquent un déséquilibre de l'homéostasie cellulaire, brisent les brins d'ADN, endommagent les protéines, la paroi cellulaire, les pigments photosynthétiques et entraînent la mort de la cellule (Schützendübel & Polle, 2002). Les ETM non sensibles au redox provoquent indirectement un stress oxydatif *via* plusieurs mécanismes tels que l'inhibition d'enzymes anti-oxydatives et la production d'enzymes NADPH synthétisant des DRO (Bielen *et al.*, 2013).

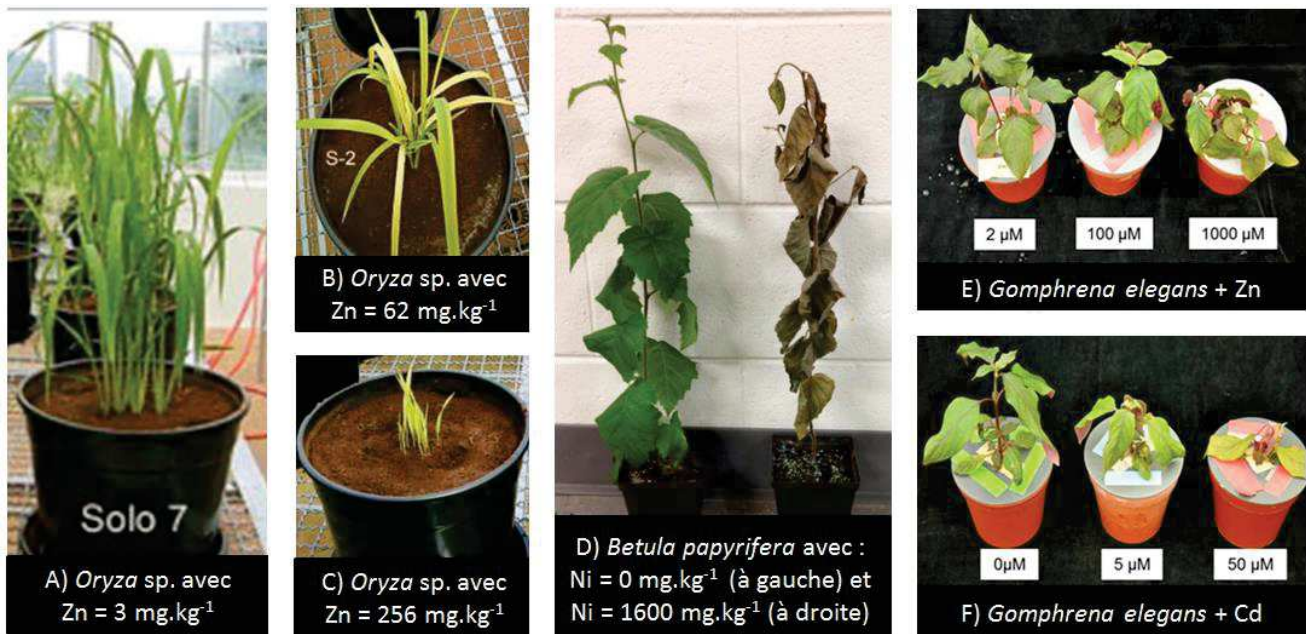


Figure 22 : Photographies illustrant la toxicité des métaux sur le développement des plantes. Légendes : les photographies A), B) et C) correspondent à des plantules de riz (*Oryza sp. L.*, 1753) poussant sur des sols contenant respectivement 3, 62 et 256 mg.kg⁻¹ de zinc. La photographie D) présente deux jeunes bouleaux (*Betula papyrifera* Marshall, 1785) en absence ou présence (1600 mg.kg⁻¹) de nickel. La photographie E) correspond à des *Gomphrena elegans* Mart. en présence de zinc à des concentrations de 2, 100 et 1000 μM et la photographie F) à des *Gomphrena elegans* Mart. en présence de cadmium à des concentrations de 0, 5 et 50 μM.

Sources des photographies : Carvalho *et al.*, 2013 ; Silva *et al.*, 2014 ; Theriault *et al.*, 2016.

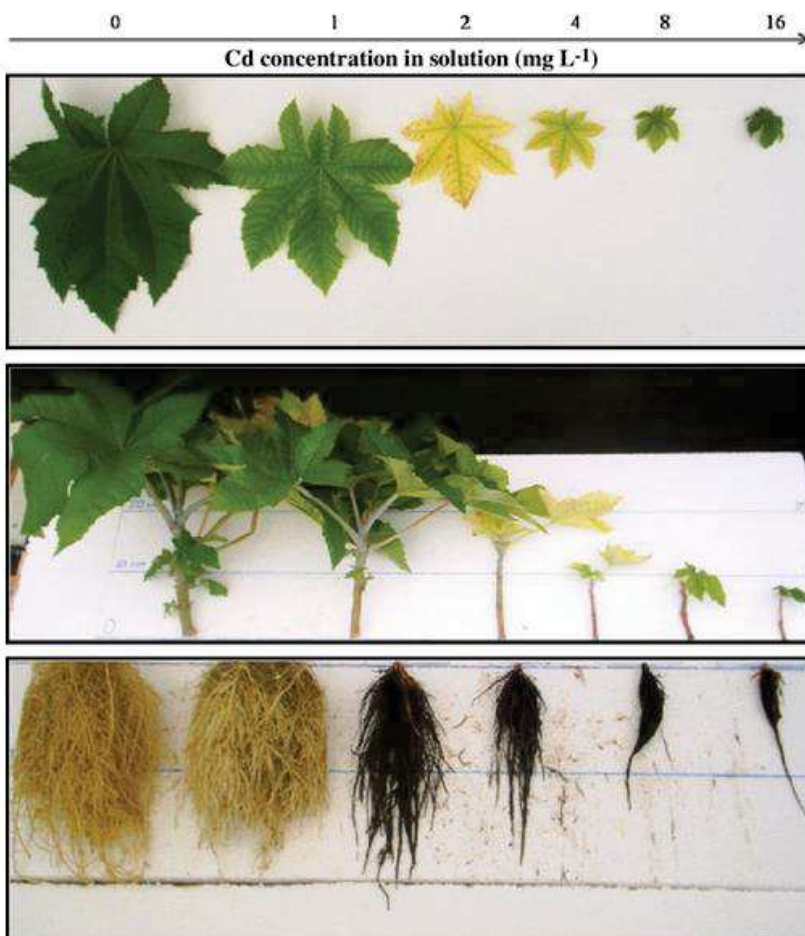


Figure 23 : Photographies des symptômes de toxicité dus au cadmium chez le ricin commun (*Ricinus communis* L. 1753) sur ses feuilles (en haut), parties aériennes (au milieu) et son système racinaire (en bas). De gauche à droite sur les photographies, les plants ont été arrosés avec une solution nutritive contenant du cadmium à hauteur de 0, 1, 2, 4, 8 et 16 mg.L⁻¹ de cadmium. Source : de Souza Costa *et al.* (2012).

2.3.2 La phytotoxicité métallique

Les effets des ETM sur les plantes varient en fonction de l'élément considéré. Par exemple, les premiers symptômes liés à une toxicité au manganèse se manifestent dans les parties aériennes des plantes, du fait de la mobilité de cet élément dans les tissus végétaux (Hue *et al.*, 1998). Un excès de manganèse entraîne un gondolement des feuilles (Reddy, 2006) et un noircissement des veines foliaires (Dragišić Maksimović *et al.*, 2012). Des études ont montré que le manganèse réduisait l'assimilation de CO₂ et diminuait la teneur en chlorophylle chez les plantes telles que *Pisum sativum* et *Glycine max* (Izaguirre-Mayoral & Sinclair, 2005 ; Rezai & Farboodnia, 2008). Sous sa forme ionique Al³⁺, l'aluminium inhibe le développement des plantes, surtout dans des sols acides (Liu *et al.*, 2014). Les effets toxiques de cet ETM se traduisent par une inhibition de l'élongation racinaire qui impacte le développement général de la plante (Ma *et al.*, 2001). Par ailleurs, des études récentes montrent que l'aluminium augmente la rigidité des parois cellulaires et de la double hélice de l'ADN, ce qui interfère avec la division cellulaire des apex racinaires et des racines latérales (Zhang *et al.*, 2014). Une toxicité liée à l'aluminium entraîne également un déséquilibre de la balance nutritionnelle des plantes (Bose *et al.*, 2011). Un excès de zinc peut produire des DRO et affecter la perméabilité des membranes cellulaires (Zahra & Latifeh, 2013). Une étude a rapporté que des concentrations élevées en ions Zn²⁺ affectaient négativement la photosynthèse (Tsonev & Lidon, 2012). Le zinc présente également des effets génotoxiques sur les chromosomes des plantes, en perturbant le fonctionnement des phases de division cellulaire (Oladele *et al.*, 2013 ; Truta *et al.*, 2013). La toxicité du chrome se traduit par une inhibition des divisions cellulaires et de l'élongation racinaire (Shanker *et al.*, 2005). Cet ETM interfère également avec l'absorption d'autres ETM et de nutriments tels que le calcium, le fer, le magnésium, le manganèse, le phosphore, le potassium (Samantaray *et al.*, 1998). Lorsqu'il est en excès, le nickel entre en compétition avec d'autres ETM tels que le fer et le zinc, entraînant des carences qui se traduisent par une chlorose de la plante (Khan & Khan, 2010). Le nickel induit également la production de DRO et une baisse des teneurs en chlorophylle de la plante (Sreekanth *et al.*, 2013). Une étude a montré que chez des espèces de *Vigna*, la présence de nickel à des concentrations de 150 mg.kg⁻¹ inhibait la germination des graines de 50 % (Ishtiaq & Mahmood, 2011). Dans cette même étude, le nickel circulait dans les vaisseaux du xylème et du phloème et pouvait donc être transloqué des racines vers les parties aériennes (Ishtiaq & Mahmood, 2011).

Des exemples de toxicités d'ETM (Cd, Ni et Zn) sur le développement de plusieurs espèces de plantes sont présentés en Figure 19 (Carvalho *et al.*, 2013 ; Silva *et al.*, 2014 ; Theriault *et al.*, 2016) et Figure 20 (de Souza Costa *et al.*, 2012).

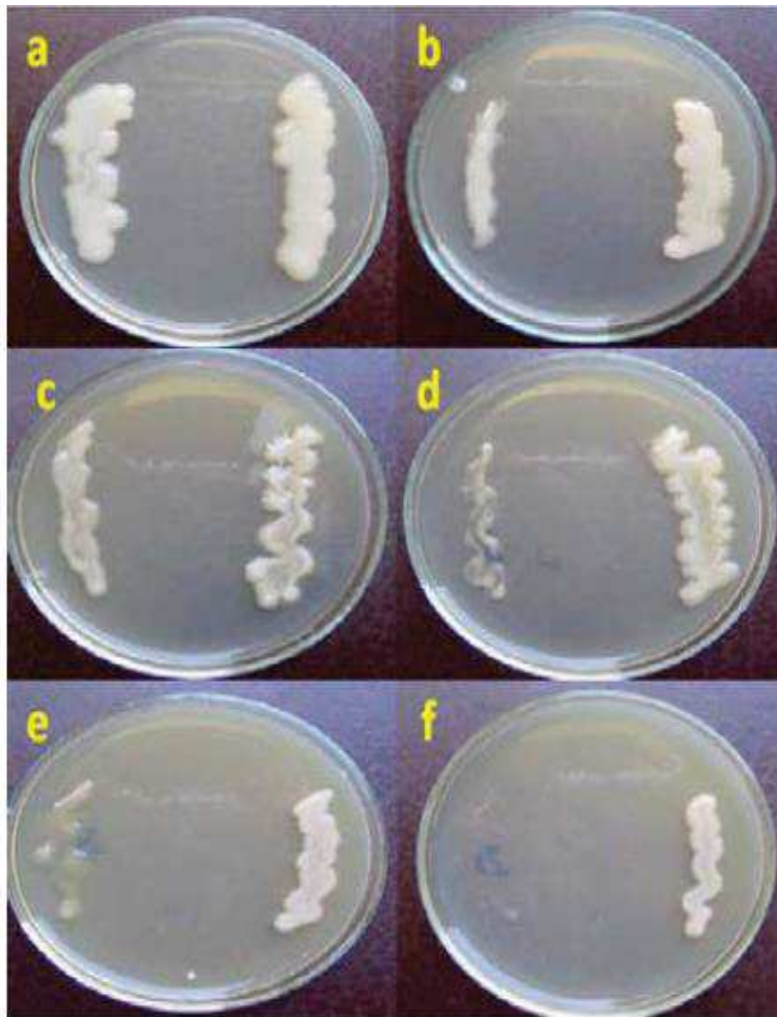


Figure 24 : Croissance d'une souche de rhizobia sauvage et de son mutant tolérant un stress salin, sur des boîtes de Pétri contenant un milieu YMA (Vincent, 1970). La souche sauvage est disposée à gauche dans les boîtes de Pétri et le mutant tolérant à la salinité à droite. Un gradient de salinité a été appliqué au milieu YMA, en ajoutant de l'eau de mer à des concentrations de : a = 0 %, b = 20 %, c = 25 %, d = 30 %, e = 40 % et f = 50 %.

Source : Hassan & Eissa, 2013

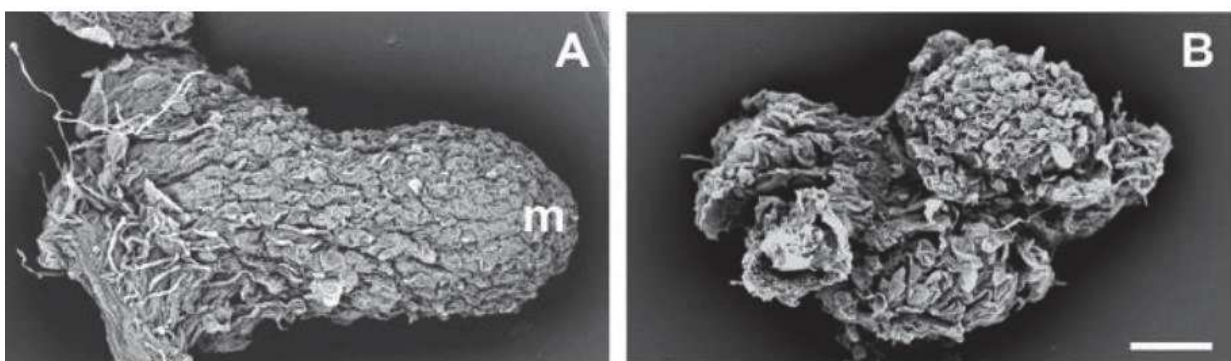


Figure 25 : Photographies prises au microscope électronique à balayage présentant la structure des nodules racinaires de *Pisum sativum* cv. *Argona*. Les plants de pois ont été inoculés avec la souche *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841.

Le panel A) présente un nodule issu d'un contrôle (sans stress salin) et le panel B), un nodule issu d'un plant qui s'est développé dans une concentration de 75 mM de NaCl. Le symbole « m » indique le méristème nodulaire et la barre d'échelle est de 300 µm. Extrait de El-Hamdaoui *et al.* (2003)

2.3.3 Les effets des paramètres environnementaux sur les microorganismes du sol

Les facteurs climatiques, les conditions édaphiques et la distribution spatiale sont les meilleurs indicateurs pouvant expliquer la richesse et la composition des communautés des champignons du sol (Tederloo *et al.*, 2014). La communauté bactérienne est également influencée par les paramètres du sol (Fierer & Jackson, 2006). Parmi les bactéries du sol, les rhizobia sont influencés par des facteurs abiotiques, tels que la salinité, l'humidité du sol et les éléments traces métalliques (Gadd, 1990 ; Zahran, 1999 ; El-Hamdaoui *et al.*, 2003).

La salinité influence les rhizobia du sol et répond de manière différente à cette contrainte (Figure 24 et Figure 25). Des souches de rhizobia du genre *Bradyrhizobium* isolées à partir de nodules d'*Acacia* sont sensibles à la salinité et aux sols alcalins, mais tolérantes aux sols acides. En revanche, les rhizobia du genre *Rhizobium* peuvent présenter une certaine tolérance à la salinité et aux sols alcalins (Marsudi *et al.*, 1999). De plus, dans le genre *Rhizobium*, la tolérance à la salinité varie selon les espèces. Des études recensent ainsi que la croissance de la plupart des rhizobia est inhibée à une concentration en NaCl de 100 mM, alors que certaines souches tolèrent des concentrations en NaCl de 250 à 850 mM (Lal & Khanna, 1994). Une étude a également montré que des rhizobia sensibles à la salinité pouvaient être rendus tolérants au stress salin, suite à une exposition à des rayons gammas (Figure 24 ; Hassan & Eissa, 2013). Un mécanisme pouvant expliquer cette tolérance à la salinité chez les rhizobia serait l'accumulation intracellulaire d'osmolytes (Csonka & Hanson, 1991).

L'humidité du sol est un paramètre abiotique pouvant influencer les microorganismes, dont les rhizobia. Des populations rhizobiennes retrouvées dans des sols désertiques sont capables d'établir des symbioses fixatrices d'azote (Jenkins *et al.*, 1989). Une étude a montré qu'une souche de *Rhizobium* (AZ-M1) isolée d'un sol désertique à partir de nodules racinaires de *Prosopis* pouvait survivre dans un sol désertique durant un mois, tandis qu'une souche commerciale de rhizobia (31A5) ne pouvait pas survivre dans les mêmes conditions (Shoushtari & Pepper, 1985). La survie et l'activité des microorganismes peuvent varier selon l'humidité, en fonction de leur distribution dans les microhabitats du sol (Orchard & Cook, 1983). Des études ont montré que l'humidité initiale du sol influençait la distribution d'une souche de *Rhizobium leguminosarum* (Postma *et al.*, 1989) et qu'une humidité modérée ralentissait les déplacements de *Rhizobium trifolii* (Hamdi, 1971). Enfin, des études ont montré que des souches de rhizobia présentaient une morphologie irrégulière en condition de stress hydrique (Shoushtari & Pepper, 1985; Busse & Bottomley, 1989), suggérant une influence significative de ce paramètre sur la morphologie des rhizobia.

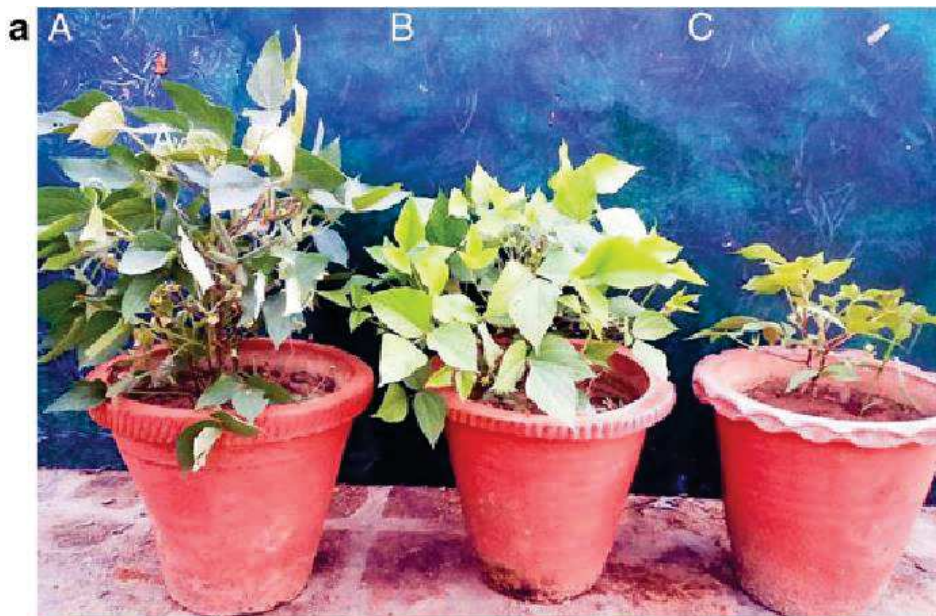
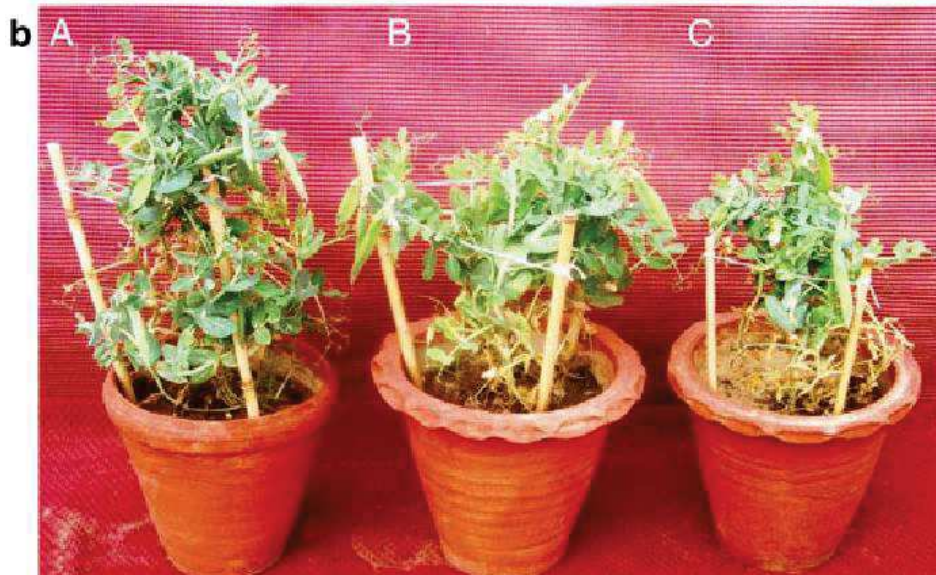


Figure 26 : Photographies de trois légumineuses inoculées ou non avec des rhizobia, selon différents métaux. Extrait de Ahmad *et al.*, 2012

Le panel a) présente des plants de *Vigna radiata* traités selon : A) une inoculation avec une souche de *Bradyrhizobium* sp., B) une inoculation avec une souche de *Bradyrhizobium* et l'ajout de cadmium et C) un ajout de cadmium.



Le panel b) présente des plants de *Pisum sativum* traités selon : A) une inoculation avec une souche de *Rhizobium* sp., B) une inoculation avec une souche de *Rhizobium* sp. et l'ajout de cuivre et C) un ajout de cuivre.



Le panel c) présente des plants de *Cicer arietinum* traités selon : A) une inoculation avec une souche de *Mesorhizobium ciceri*, B) une inoculation avec une souche de *Mesorhizobium ciceri* et l'ajout de chrome et C) un ajout de chrome.

2.3.4 Les effets des ETM sur les microorganismes du sol

Les ETM impactent les microorganismes du sol et leur fonctionnement (Giller *et al.*, 1998). Les premières observations des effets des ETM sur les processus microbiens du sol remontent au début des années 1900 (Lipman & Burgess, 1914 ; Brown & Mingos, 1916). Les ETM impacteraient la minéralisation du carbone (Giller *et al.*, 1998). Plusieurs études rapportent par exemple que la matière organique, notamment la litière de feuilles, se décompose plus lentement dans des sols forestiers, proches de fonderies métallurgiques et contaminés en ETM (Rühling & Tyler, 1973 ; Coughtrey *et al.*, 1979 ; Berg *et al.*, 1991). Les ETM impactent également les biomasses et la structure de la communauté microbienne du sol. Les travaux de Maliszewska *et al.* (1985) rapportent que le plomb, le zinc, le cuivre, l'arsenic et le mercure influencent les microorganismes du sol. Les résultats de cette étude montrent que les effets de ces ETM sur les microorganismes peuvent varier selon plusieurs facteurs : le type d'ETM, le type de sol, la dose introduite et le type de microorganisme (Maliszewska *et al.*, 1985). Les ETM affectent également le fonctionnement de la symbiose fixatrice d'azote (Ahmad *et al.*, 2012).

2.3.5 La symbiose fixatrice d'azote en fonction des paramètres environnementaux

La symbiose rhizobium-légumineuse et la formation des nodules sont sensibles aux paramètres environnementaux (Figure 25 et Figure 26). Plusieurs études ont montré que la salinité et le stress osmotique pouvaient affecter la mise en place de la symbiose rhizobium-légumineuse, retarder son développement ou complètement inhiber son fonctionnement (Tu, 1981 ; Zahran & Sprent, 1986). Les travaux de Tu (1981) démontrent qu'en présence de 170 mM de NaCl, les poils racinaires du soja présentaient une faible déformation lorsqu'ils étaient inoculés avec la souche *Bradyrhizobium japonicum*. En présence de 210 mM, la nodulation était totalement inhibée (Tu, 1981). Chez *Vicia faba*, la déformation des poils racinaires est réduite lorsque la plante est mise en présence de 50 à 100 mM de NaCl, mais également en présence de 100 à 200 mM de polyéthylène glycol (Zahran & Sprent, 1986). Ces travaux montrent également que la colonisation des rhizobia dans les poils racinaires est réduite respectivement de 30 à 52 % en présence de NaCl et de polyéthylène glycol (Zahran & Sprent, 1986). Plusieurs études ont montré que le stress salin affectait le fonctionnement de la fixation biologique (Abdel-Wahab & Zahran, 1981 ; Delgado *et al.*, 1994). Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer ces observations : le stress salin (i) affecterait la respiration des bactéroïdes (Delgado *et al.*, 1994), (ii) réduirait la synthèse des protéines cytosoliques et plus particulièrement, de la léghémoglobine (Delgado *et al.*, 1993) et (iii) réduirait l'activité photosynthétique de la plante (Georgiev & Atkins, 1993).



Figure 27 : Photographie des racines d'*Acacia koa* A.Gray, 1854 portant des nodules fixateurs d'azote. Entouré en jaune, un nodule coupé longitudinalement, révélant un intérieur rose, caractéristique de la présence de léghémoglobine et donc, du fonctionnement de la fixation d'azote. Les nodules sont présents sous forme de grappes réparties de manière non-homogène le long des racines, tel que décrit par Allen & Allen (1936).

Crédit – Source : J.B. Friday - <https://www.flickr.com/photos/jbfriday/22455513124>

Chez une espèce d'*Acacia*, l'inoculation d'une souche halophile de *Rhizobium* améliore la tolérance au sel chez *Acacia ampliceps* Maslin (Zou *et al.*, 1995). Certaines souches symbiotiques sont résistantes à de fortes températures (> 40°C), mais ne sont pas capables de former des nodules chez *Acacia mellifera* dans ces conditions (Habish, 1970). Une étude de (Barnet *et al.*, 1985) a montré que les taux de fixation d'azote chez *A. longifolia* (Andrews) Willd. et chez *A. suaveolens* (Sm.) Willd., en Australie étaient les plus élevés durant les mois les plus doux de l'année. Certains auteurs s'appuient sur ces résultats pour expliquer l'installation d'*Acacia* dans les régions tropicales (Leary *et al.*, 2006).

Pour résumer : le sol, les légumineuses, les rhizobia et les paramètres édaphiques (et plus particulièrement les ETM) ont une influence sur la physiologie des légumineuses, la diversité des microorganismes et la symbiose fixatrice d'azote. Parmi les symbioses rhizobium-légumineuse, l'association étudiée durant ces 3 années de thèse est la symbiose entre une espèce d'*Acacia* et des rhizobia.

2.4 Les associations rhizobia-*Acacia*

Au niveau mondial, les connaissances sur le fonctionnement des symbioses rhizobia-légumineuses sont principalement issues de recherches utilisant des légumineuses modèles telles que *Glycine max*, *Medicago truncatula* ainsi que *Lotus japonicus* (Young *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2004) et leur nombre ne cesse d'augmenter. Environ 90% des légumineuses appartenant à l'ancienne sous-famille des *Mimosoideae* (aujourd'hui inclus dans les *Caesalpinioideae*) sont capables d'établir des symbioses avec des rhizobia (Allen & Allen, 1981; de Faria *et al.*, 1989). Les études centrées sur des légumineuses ligneuses sont moins fréquentes, mais dans le genre *Acacia*, une quantité non-négligeable d'informations scientifiques ont déjà été acquises concernant la symbiose rhizobienne. Chez les espèces d'*Acacia*, la plupart des rhizobia isolés appartiennent aux genres *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* et *Ensifer* (de Lajudie *et al.*, 1998; Marsudi *et al.*, 1999; Nick *et al.*, 1999a,b; Lafay & Burdon, 2001). Dreyfus & Dommergues (1981) ont remarqué qu'il y avait des spécificités symbiotiques chez *Acacia* spp., car suivant les espèces, certaines nodulaient préférentiellement avec des rhizobia à croissance rapide (*Rhizobium*) tandis que d'autres s'associent plus spécifiquement à des bactéries à croissance lente (*Bradyrhizobium*). Ces auteurs ont également observé à une fréquence plus rare que quelques espèces végétales étaient capables de s'associer avec des rhizobia appartenant aux deux genres.

En 2015, une liste de plus de 160 espèces de rhizobia, ainsi que leurs hôtes, ont été recensées dans la revue de Peix *et al.* (2015). Les associations symbiotiques fixatrices d'azote chez les *Acacia* sont très courantes, de l'ordre de 90% (Allen & Allen, 1981 ; De Faria *et al.*, 1989). Concernant la nodulation chez les *Acacia s.l.*, Vassal (1972) a remarqué que de nombreuses espèces du genre *Aculeiferum* sont non-nodulantes. Néanmoins, ces espèces non-nodulantes présentent des stades de pré-infection similaires à ceux de la mise en place des nodules, tels que le recourbement des poils racinaires et l'induction des gènes *nod* (Shaw *et al.*, 1997; Harrier *et al.*, 2000).



Figure 28 : Carte des activités industrielles et des services de la Nouvelle-Calédonie, éditions Hatier, Paris, 1990. Consultable sur : <https://www.monde-diplomatique.fr/cartes/nouvellecaledonie>



Figure 29 : Photographies des différents paysages et écosystèmes en Nouvelle-Calédonie. Légende : A) le lagon et sa barrière de corail dans la Province Sud, B) une mine d'extraction de nickel à ciel ouvert en 1980, C) le maquis minier et ses sols riches et métaux lourds, D) les reliquats d'une forêt sèche de niaoulis sur la Grande-Terre, E) la forêt dense et humide, F) la mangrove et ses palétuviers, une zone tampon entre le lagon et les massifs miniers et G) les falaises calcaires de Lékiny sur l'île d'Ouvéa.

Crédits - sources :

A) Martial Dosdane - <https://www.tour-du-monde.nc/faune-et-flore/index.html>

B) J.J Syllebranque - <http://www.jjsyllebranque.fr/aerienne/pages/aerien%20nouvelle%20caledonie%2080%20%2817%29.htm>

C) Bananaflo - https://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Landscape,_south_of_New_Caledonia.jpg

D) Barsamuphe - https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Savane_niaoulis_nouvelle_caledonie.jpg

E) La caravane - <http://www.lacaravane.nc/les-entreprises-et-leurs-activites/co-worker/noe-conservation/>

F) E. Coste - <https://www.ird.fr/layout/set/print/la-mediathèque/fiches-d-actualite-scientifique/406-la-mangrove-filtre-pour-les-métaux-lourds>

G) Sans auteur - <https://www.nouvellecaledonie.travel/fr/annuaire-professionnels/activites/les-falaises-de-lekiny>

Les nodules se développent typiquement le long des racines latérales fines et se présentent sous la forme de clusters (grappes de nodules) se répartissant de manière non-homogène (Figure 27 ; (Allen & Allen, 1936). Des études menées sur la contribution de la symbiose fixatrice d'azote à la nutrition azotée chez les *Acacia s.l.* montrent que celle-ci varie selon les espèces : chez *Vachellia caven* (Molina) Seigler & Ebinger, *Acacia holosericea* A.Cunn. ex G.Don, *A. mangium* Willd., *A. melanoxyton* R.Br., *A. mucronata* Willd. ex H.L.Wendl, la symbiose fixatrice d'azote fournit respectivement 86, 39, 50, 43 et 48% de l'azote de la plante (Hamilton *et al.*, 1993; Ovalle *et al.*, 1996; Ndiaye & Ganry, 1997; Galiana *et al.*, 2002).

Les associations *Acacia*-rhizobia sont fonctionnelles, diverses et variées. Cependant, ces symbioses sont sujettes aux paramètres environnementaux, et notamment à la présence d'ETM dans le sol qui peuvent influencer la vie libre des rhizobia, la plante hôte ainsi que le fonctionnement de la symbiose. Ces éléments doivent être pris en compte dans le cadre d'une réhabilitation d'écosystèmes dégradés, notamment après une exploitation minière. Ce cas de figure est caractéristique de la Nouvelle-Calédonie, où les entreprises minières doivent réhabiliter les sols qu'elles ont exploitées et qui présentent des concentrations élevées en ETM tels que le cobalt, le chrome, le fer, le nickel ou le manganèse.

2.5 La Nouvelle-Calédonie et *Acacia spirorbis*

2.5.1 Un hotspot de la biodiversité

La Nouvelle-Calédonie est un archipel situé dans l'océan Pacifique, à 1200 km de la côte Est de l'Australie (Figure 28). Suite à un phénomène d'obduction à la fin de l'Eocène il y a environ 35 Ma, une partie du plancher océanique a émergé et recouvert le substrat volcano-sédimentaire plus ancien qui constitue le socle géologique de l'île principale de la Grande Terre (Pelletier, 2006). Au Nord-Est de celle-ci, un soulèvement de massifs coralliens calcaires survenu il y a environ 1 Ma en lien avec le glissement de la plaque australienne dans la zone de subduction du Vanuatu, a donné naissance aux îles Loyauté (Pelletier, 2006 ; Fig 29 G). Malgré sa petite taille de 18 000 km², les sols de l'archipel sont très variés en fonction de la diversité des roches-mères sur lesquelles ils se sont formés : des sols argilo-siliceux formés sur des roches volcano-sédimentaires (basaltes, schistes, cherts flychs ; Fig 29D et 29E) ; des sols ferralitiques formés sur des roches ultrabasiqes (péridotites ; Fig 29B et 29C) ; des sols alumino-calciqes formés sur des calcaires récifaux (Fig 29G) (Bonvallot *et al.*, 2012). Les sols alumino-calciqes sur calcaires sont caractéristiques des îles Loyauté, tandis que la Grande Terre est recouverte pour un tiers de sols ferralitiques sur roches ultrabasiqes et pour deux tiers de sols argilo-siliceux sur roches volcano-sédimentaires. Les sols ferralitiques ont la particularité d'être particulièrement riches en certains ETM (Co, Cr, Fe, Mn et Ni), de présenter un fort déséquilibre du rapport Ca/Mg (pouvant atteindre un ratio de 1/40) et d'être très pauvres en nutriments N, P et K (Rajkumar *et al.*, 2009).

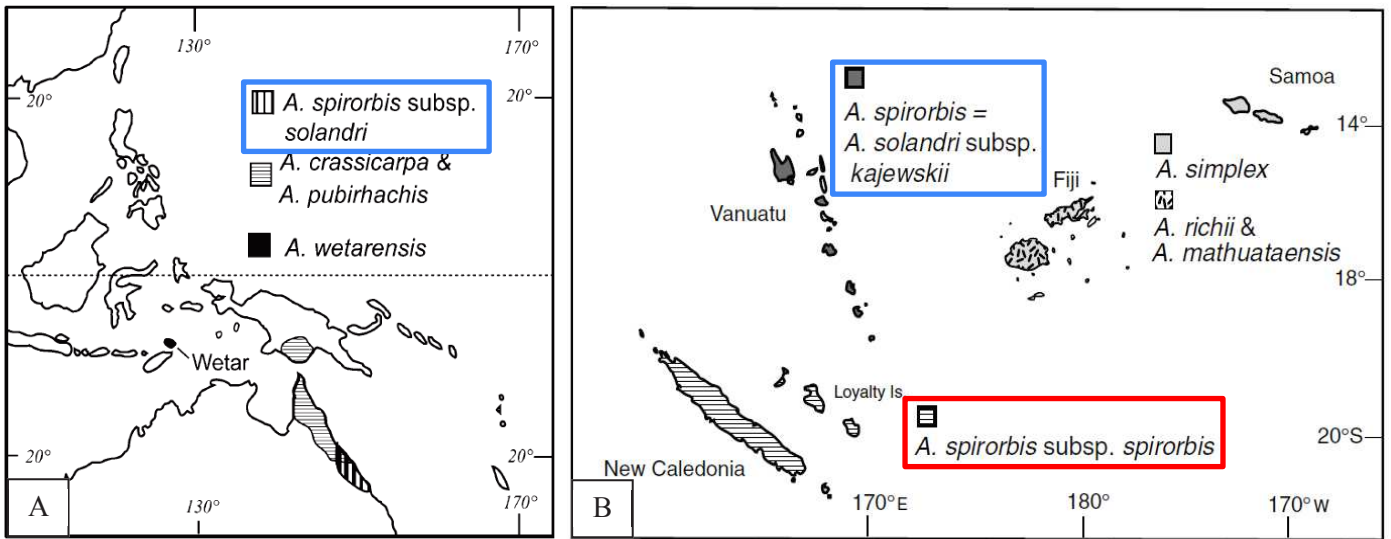


Figure 30 : Carte de la répartition des différentes espèces d'*Acacia* présentant les deux sous-espèces reconnues d'*Acacia spirorbis*. Le panel A) situe *A. spirorbis* subsp. *solandri* (encadré en bleu) au Nord-Est de l'Australie. Le panel B) situe la sous-espèce d'*A. spirorbis* subsp. *solandri*, synonyme d'*A. solandri* subsp. *kajewskii* (encadré en bleu) du Vanuatu et la deuxième sous-espèce : *A. spirorbis* subsp. *spirorbis* (encadré en rouge), endémique de la Nouvelle-Calédonie. Extrait et remanié de Brown *et al.*, 2012.

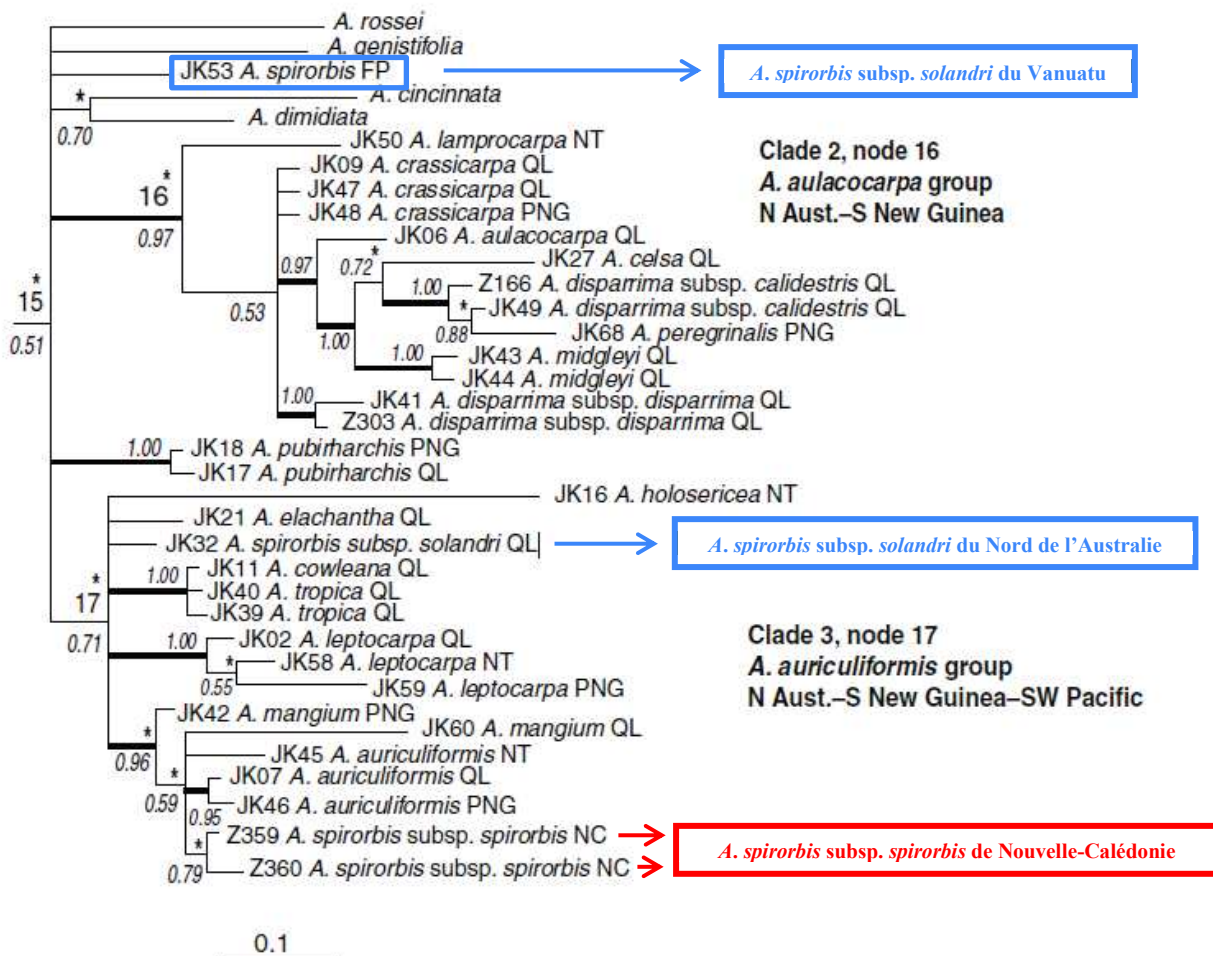


Figure 31 : Phylogénie des *Acacias* retrouvés au Nord de l'Australie, Sud de la Nouvelle-Guinée et Sud-Ouest du Pacifique, en se basant sur des données ITS et ETS, selon Brown *et al.*, 2012. Cette phylogénie est extraite d'un arbre plus large (voir Brown *et al.*, 2012 pour plus de précisions) et ce focus permet d'une part de positionner la sous-espèce *A. spirorbis* subsp. *spirorbis* (encadrée en rouge) par rapport aux autres espèces d'*Acacias* australiens et d'autre part par rapport à la deuxième sous-espèce *A. spirorbis* subsp. *solandri* (encadrée en bleu). Extrait et modifié de Brown *et al.*, 2012.

Le caractère insulaire de l'archipel néo-calédonien et cette diversité de sols a permis le développement d'une biodiversité terrestre végétale remarquable, caractérisée par un fort taux d'endémisme, supérieur à 75% (Morat *et al.*, 2012). Les conditions édaphiques des sols ferrallitiques jouent un rôle sur la structure de la flore (Isnard *et al.*, 2016). Cependant, l'urbanisation, la déforestation au profit des élevages extensifs, les feux de forêt et l'exploitation minière à ciel ouvert du nickel sont des menaces qui pèsent sur ces écosystèmes (Jaffré *et al.*, 2010 ; Losfeld *et al.*, 2014). De ce fait, la Nouvelle-Calédonie a été classée parmi les *hotspots* mondiaux de la biodiversité (Myers *et al.*, 2000 ; Marchese, 2015).

Les activités minières sont essentielles pour l'économie de nombreux pays, mais elles engendrent une dégradation de l'environnement. Pour exploiter un gisement, les industriels miniers commencent par décaper et/ou détruire la végétation, puis retirent les couches arables supérieures du sol ; le topsoil (Festin *et al.*, 2018). L'exploitation du minerai génère alors une grande quantité de déchets, se présentant sous la forme de roches grossières et de particules fines (Lottermoser, 2010). Ces déchets sont caractérisés par une faible rétention d'eau, une faible teneur en matière organique, une faible teneur en nutriments, une faible activité microbiologique et de fortes teneurs en ETM (Krzaklewski & Pietrzykowski, 2002).

Pour limiter l'impact de l'exploitation des ressources minérales sur l'environnement néo-calédonien, le Code Minier exige que les entreprises minières répondent à une obligation de réhabilitation des sols dégradés (Losfeld *et al.*, 2014). Pour ce faire, les industriels miniers se tournent vers des concepts de restauration des écosystèmes utilisant des « plantes hôtes ». Dans ce cadre, plusieurs espèces ligneuses, telles que des *Eucalyptus* et des *Acacia* australiens, ont été testées. Cependant, à l'exception de *Pinus caribaeae* Morelet, aucune d'entre elles n'a pu s'adapter aux conditions extrêmes des sols miniers nickélifères (Sarrailh, 2002). Depuis la fin des années 2000, l'utilisation de ces espèces non endémiques est sujette à controverse. En effet, bien que ces essences soient capables de reboiser rapidement des zones dégradées, plusieurs études suggèrent que leur introduction aurait un impact négatif sur l'endémisme et constituerait une erreur écologique (Bavard, 1989 ; Bouchet *et al.*, 1995 ; Richer de Forges & Pascal, 2008).

2.5.2 Une population d'*Acacia spirorbis* subsp. *spirorbis* endémique de l'archipel

L'échec de la réhabilitation des sols miniers dégradés en Nouvelle-Calédonie à l'aide d'espèces exotiques a poussé les études à se focaliser sur des espèces endémiques capables de surmonter naturellement une toxicité polymétallique (Sarrailh, 2002). Dans les maquis miniers, *Acacia spirorbis* subsp. *spirorbis* Labill. (1823) se développe naturellement sur des sols riches en ETM, mais également sur des sols riches en calcium ou en silicium, dans une gamme de pH allant de 4 à 8, jusqu'à 400 m d'altitude (Ducousso *et al.*, 2014).

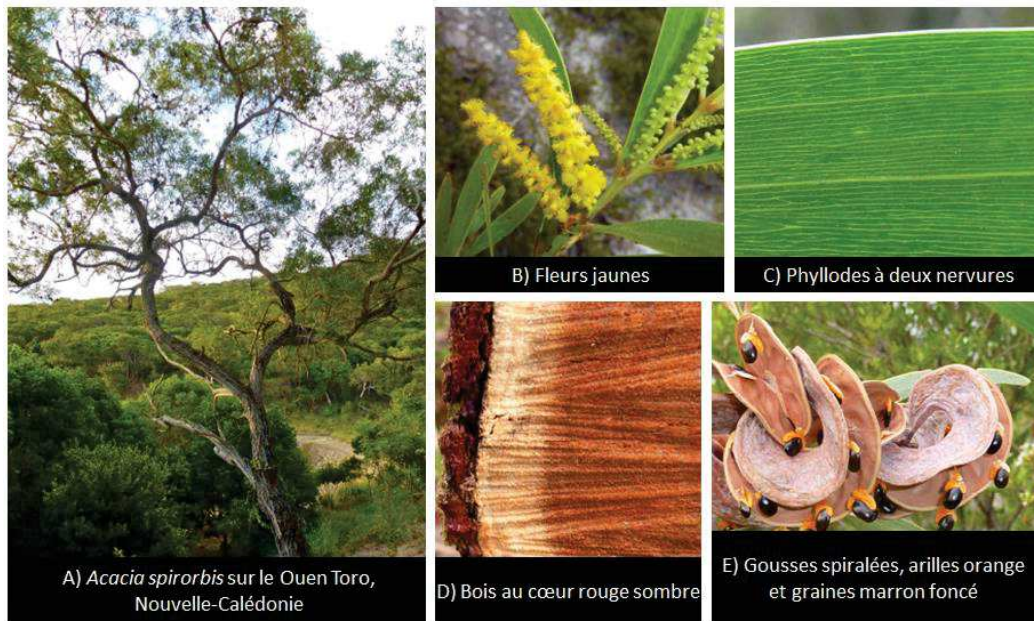


Figure 32 : Photographies des caractéristiques de l'*Acacia spirorbis* en Nouvelle-Calédonie. Légende : A) forme arbustive de l'*Acacia spirorbis*, B) détails des fleurs, C) caractéristiques des feuilles d'acacias à phyllodes, D) coupe transversale du bois et E) présentation des gousses et graines. Les photographies sont tirées de Ducouso *et al.*, 2014.

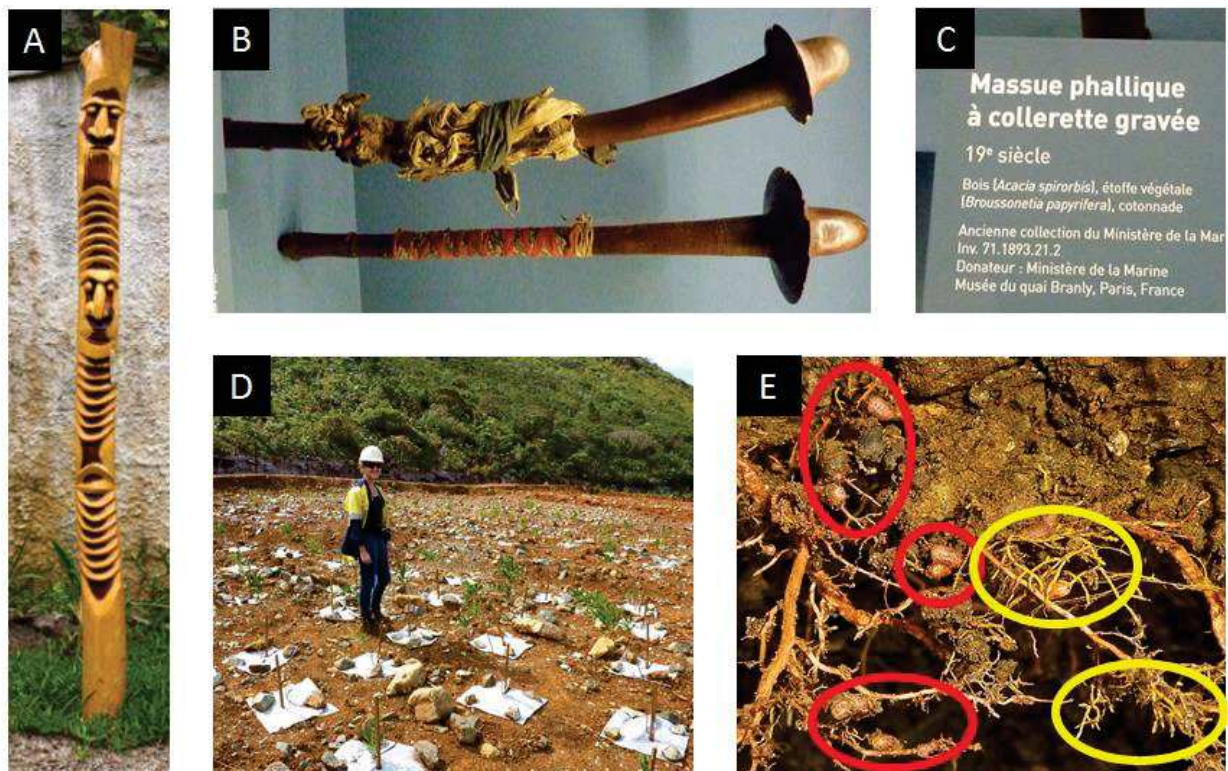


Figure 33 : Photographies illustrant l'utilisation du faux gaïac en Nouvelle-Calédonie. Bois d'œuvre dans la culture kanak : totem (A) et casse-tête (B et C). Plante facilitant la réhabilitation de sols miniers (D) en utilisant les symbioses (E). Sur la photographie E) les racines d'*Acacia spirorbis* portent des nodules fixateurs d'azotes (entourés en rouge) et des ectomycorhizes jaunes de *Pisolithus albus* (entourées en jaune) sur le massif minier de Koniambo en Nouvelle-Calédonie. Crédits - Source :

- A) Jifasch32 - <http://www.fotocommunity.fr/photo/poteaux-sculptes-en-bois-de-gaac-nouvelle-jifasch32/35939059>
- B) Marc Ducouso - Collection personnelle
- C) Marc Ducouso - Collection personnelle
- D) Marc Ducouso - <https://umr-lstm.cirad.fr/actualites/soutenance-de-these-20174>
- E) Marc Ducouso - <https://umr-lstm.cirad.fr/principaux-projets/adaspir>

L'espèce *Acacia spirorbis* fait partie du clade Australasien des *Acacia*. Elle est présente en Australie, Nouvelle-Calédonie et au Vanuatu. Néanmoins, deux sous-espèces se distinguent en fonction de leur origine (Figure 30). La sous-espèce *A. spirorbis* subsp. *solandri* (synonyme d'*A. spirorbis* subsp. *kajewski* Pedley) est présente dans le Queensland (Australie) et au Vanuatu, tandis qu'en Nouvelle-Calédonie il s'agit de la sous-espèce *A. spirorbis* subsp. *spirorbis* Labill. D'un point de vue phylogénétique, la population d'acacias néo-calédoniens est assez éloignée des autres sous-espèces pour la considérer en tant qu'une sous-espèce à part entière (Brown *et al.*, 2012). Les *Acacia spirorbis* trouvés sur la Grande Terre et les îles Loyauté présentent une grande proximité phylogénétique et la population d'*A. spirorbis* subsp. *spirorbis* est considérée comme endémique de l'archipel (Brown *et al.*, 2012). En se basant sur les données ITS et ETS, les espèces les plus proches de l'*Acacia spirorbis* néocalédonien sont *Acacia mangium* et *Acacia auriculiformis* (Figure 31 ; Brown *et al.*, 2012).

En Nouvelle-Calédonie, *Acacia spirorbis* est communément appelé faux-gaïac, voire tout simplement gaïac. Pour information, *A. spirorbis* n'a rien à voir avec le véritable gaïac puisque ce dernier, originaire d'Amérique, appartient à la famille des *Zygophyllaceae*, plus précisément au genre *Guaiacum* (source : <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Zygophyllaceae/Guaiacum/>). Les caractéristiques du bois de gaïac sont très appréciées par la population locale. En effet, son bois solide et imputrescible est parfait pour fabriquer par exemple des outils, piquets de clôture, etc. (Figure 33 ; Ducouso *et al.*, 2014). Les tribus kanak s'en servaient également pour confectionner des casses têtes et massues (Figure 33). Pour certains, le gaïac est plus qu'un outil, c'est un symbole de la Nature et de la sagesse. Un dramaturge kanak, originaire de l'île de Maré lui attribue le rôle de plante pionnière et d'ancêtre dans sa pièce intitulé « La parenthèse » et dit : « Le gaïac a beaucoup de fonctions chez nous, à Maré. [...] Le gaïac est assez grand, mais pas trop ; il pousse dans le jardin de tout le monde pour son ombrage qui est bon, pour ses feuilles qui chassent les moustiques, pour ses fleurs, parce que son écorce sert à attacher les ignames. [...] Puis ses racines servent aussi de médicament, donnent de la force, de l'énergie pour être bien. [...] Pour me symboliser moi, [...] je prends le gaïac. » (Gope, 2005).

2.5.3 *Acacia spirorbis* : écologie, feux et utilisation

Acacia spirorbis peut se présenter sous une forme buissonnante ou bien arbustive (Figure 32A). C'est un *Acacia s.s.* qui ne possède pas d'épine, à la différence des *Acacia s.l.* Ses fleurs sont de couleur jaune et portées sur des inflorescences en épis (Figure 32B). Elles donnent après pollinisation des gousses spiralées, portant des graines marron foncé, attachées avec des arilles orange (Figure 32E). Dans les premiers stades de la germination, les deux cotylédons sont des feuilles composées, alors que dans un stade plus mature, son feuillage est constitué de phyllodes (et non de feuilles) avec une forme oblongue, de couleur vert-olive et possédant deux nervures (Figure 32C). Son écorce brune, dure et largement crevassée abrite un bois résistant avec un cœur rouge sombre dont le diamètre dépasse rarement les 40 cm (Figure 32D).



A) Forêt d'*A. spirorbis* (VS)



B) Population d'*A. spirorbis* (VS)



C) Maquis d'*A. spirorbis* (UF)

Figure 34 : Photographies de vue aériennes prises en drone au-dessus de différentes population naturelles d'*Acacia spirorbis*.

La photographie A) présente une forêt dense d'*Acacia spirorbis* sur un sol de type volcano-sédimentaire. B) une population naturelle d'*Acacia spirorbis* se développant sur un acrisol et C) un maquis d'*Acacia spirorbis* sur un sol métallifère.

Pour les photographies A et C, l'échelle est définie selon la présence de la route et le véhicule tout-terrain.

Légende : UF = sols métallifères ; VS = sols volcano-sédimentaires

Crédits – source : Marc Ducouso – collection personnelle

Acacia spirorbis peut former des forêts denses présentant une dominance forte d'*A. spirorbis* (Figure 34A) ou des forêts mixtes avec d'autres arbres tels que *Melaleuca quinquenervia* (Figure 34C). Dans un contexte de maquis minier (Figure 34C) ou sur des sols très siliceux, acides et pauvres en nutriments comme des acrisols (Figure 34B), les populations naturelles d'*Acacia spirorbis* sont plus clairsemées qu'en forêt naturelle. *Acacia spirorbis* présente un comportement envahissant dans des écosystèmes dégradés et sur les terres déboisées au même titre que de nombreuses autres espèces d'*Acacia* Australiens (Miller *et al.*, 2011; Richardson *et al.*, 2015). Naturellement, *Acacia spirorbis* se propage dans les milieux ouverts suite à des feux de forêts (Jaffré *et al.*, 1997). Les causes de ces incendies sont majoritairement d'origine anthropique (défrichement, chasse, prospection minière, involontaire) et plus rarement d'origine naturelle (foudre) (Jaffré *et al.*, 1997). En Nouvelle-Calédonie, ces feux entraînent la disparition totale et durable des espèces ligneuses ne rejetant pas de souches. Différents types de couvert végétal se reconstituent à partir de semences enfouies dans le sol ou provenant d'espèces voisines (Jaffré *et al.*, 1997). C'est le cas pour *Acacia spirorbis* dont les graines tolérantes au feu et la croissance très compétitive lui permettent de se développer dans des environnements post-incendies en formant des fourrés (Jaffré *et al.*, 1997). Ce type de végétation a un impact sur la biodiversité puisque des recensements d'arthropodes montrent qu'en termes de richesse spécifique et d'abondance, ce fourré à *Acacia spirorbis* est bien plus pauvre que celui d'une forêt sèche (Jaffré *et al.*, 1997). Néanmoins, il a été montré qu'après un feu de forêt, l'azote du sol s'est en partie volatilisé et que la symbiose rhizobium-légumineuse permet de réintroduire de l'azote atmosphérique dans le sol (Hingston *et al.*, 1982). C'est pourquoi la présence d'*A. spirorbis* et sa capacité à établir des symbioses pourrait être bénéfique aux écosystèmes post-incendies.

2.5.4 *Acacia spirorbis* : une triple symbiose mycorhizes-rhizobia

Sur le terrain, *A. spirorbis* forme des symbioses avec des champignons mycorhiziens à arbuscule, des champignons ectomycorhiziens et des bactéries fixatrices d'azote (Figure 33E ; Grangeteau *et al.*, 2012 ; Ducouso *et al.*, 2014). Des travaux menés sur ce sujet ont démontré l'importance des mycorhizes chez *A. spirorbis*, notamment avec *Pisolithus albus* (Cooke & Masee), pour son adaptation aux sols ferrallitiques riches en ETM via la présence d'une pompe à efflux pour le nickel (Jourand *et al.*, 2014). De manière remarquable, ce champignon présente deux écotypes reliés à deux types de sols (ferrallitiques vs. argilo-siliceux) en Nouvelle-Calédonie (Jourand *et al.*, 2010).

2.5.4.1 Le cortège ectomycorhizien d'*Acacia spirorbis*

En parallèle de ce travail de thèse, quelques mois ont été attribués à la caractérisation du cortège de champignons ectomycorhiziens associés à *Acacia spirorbis* en conditions naturelles. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Environmental Microbiology* en Avril 2018 (Houlès *et al.*, 2018). La publication est disponible dans les annexes.

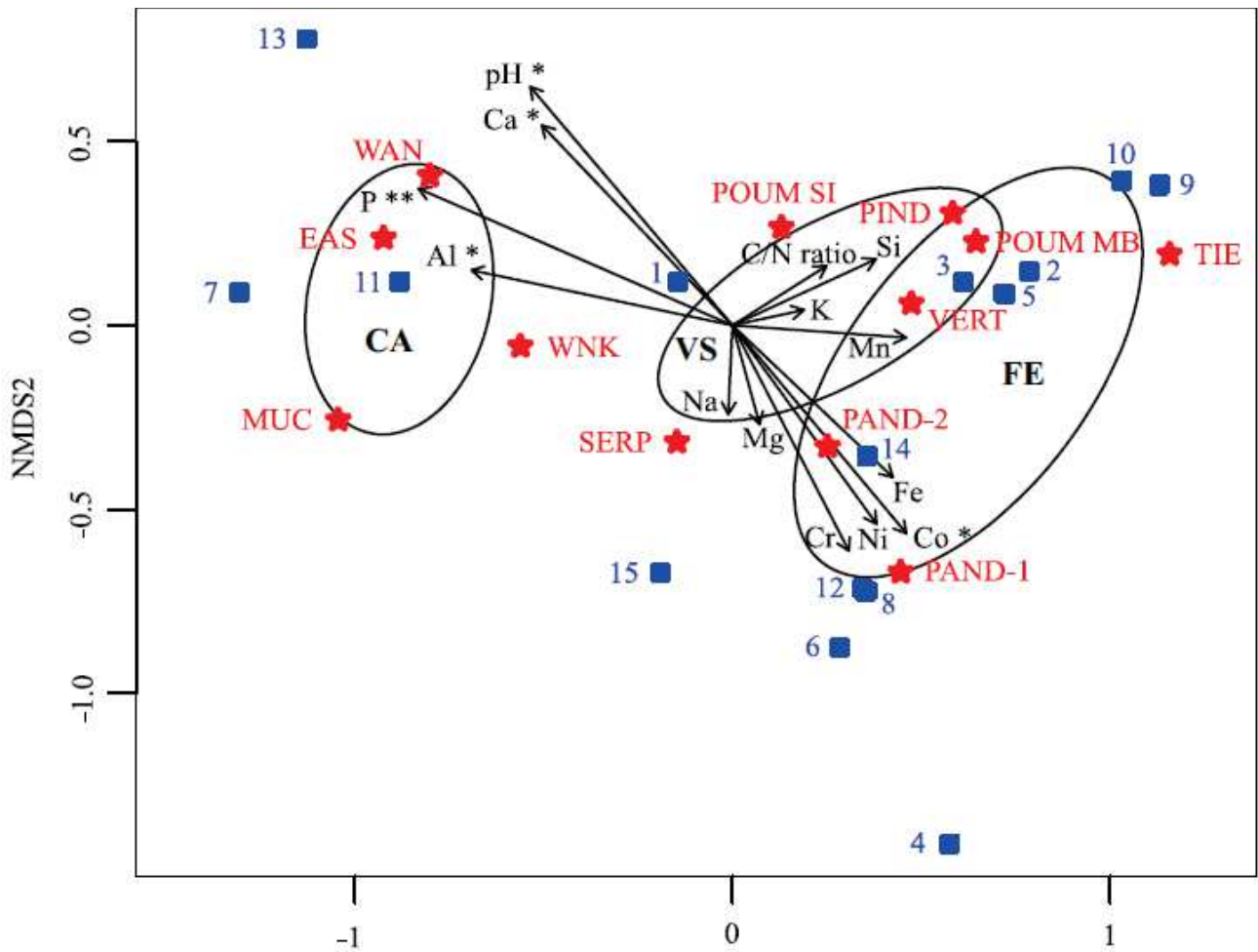


Figure 35 : Analyse du positionnement multidimensionnel *non métrique* (NDMS) de la distribution des lignées de champignons ectomycorhiziens en fonction des sites d'étude et des paramètres physico-chimiques des sols. Les carrés bleus représentent les lignées de champignons ectomycorhiziens associés à *Acacia spirorbis*. Ces lignées ont été définies selon les travaux de Terdersoo *et al.* (2010). Les numéros des carrés bleus correspondent aux noms de lignées suivants : 1 /*tomentella-thelephora*; 2 /*boletus*; 3 /*pisolithus-scleroderma*; 4 /*unspecified Boletaceae*; 5 /*russula-lactarius*; 6 /*cortinarius*; 7 /*inocybe*; 8 /*amanita*; 9 /*tricholoma*; 10 *unspecified Agaricales*; 11 /*sebacina*; 12 /*clavulina*; 13 /*peziza*; 14 /*unspecified Ascomycota*; 15 *dothideomycetes incertae sedis*.

Les étoiles rouges représentent les 12 sites d'études et sont placées sur le graphique en fonction des lignées de champignons ectomycorhiziens. Les paramètres édaphiques sont représentés sous la forme de vecteurs (flèches). Des analyse de Permanova ont permis d'identifier quelles paramètres édaphiques influençaient significativement la distribution des lignées d'ECM. Le niveau de significativité est symbolisé selon les conventions usuelles (par * lorsque $P < 0,05$ et par ** lorsque $P < 0,01$). Des ellipses ont également été ajoutées pour visualiser la distribution des lignées de champignons ectomycorhizien en fonction des types de sol : CA = sols calcaires ; FE = sols métallifères et VS = sols volcano-sédimentaires. Extrait de Houlès *et al.* (2018).

Cette étude avait pour objectif de caractériser les communautés de champignons ectomycorhiziens (ECM) associées à *Acacia spirorbis*. Pour ce faire, les paramètres géochimiques des sols et la diversité des communautés sur 12 sites d'études représentatifs des trois catégories de sols ont été mesurés. Le statut ectomycorhizien d'*Acacia spirorbis* a été confirmé sur les trois types de sols, avec une communauté dominée à 92 % par des Basidiomycètes. Ces basidiomycètes sont composés principalement des lignées de champignons ectomycorhiziens suivantes (définis par Tedersoo *et al.*, 2010) : */tomentella-telephora* (à 26%), */boletus* (à 15,8 %), */sebacina* (à 10,5%), */russula-lactarius* (à 10,5%) et */pisolithus-scleroderma* (à 7,9%).

Pour visualiser la distribution des données de diversité ECM en fonctions des sites d'études, une analyse de positionnement multidimensionnel *non métrique* (NMDS ; Figure 35) a été réalisée. Cette analyse permet de présenter la distribution des lignées de champignons ectomycorhiziens échantillonnées sur les sites d'études. Cette analyse a été complétée en superposant (i) les regroupements des sites en fonction des types de sols et (ii) les paramètres édaphiques correspondant aux sites d'études (Figure 35). Cette représentation a montré que la diversité et la proportion des lignées ECM étaient similaires entre les sols ferrallitiques sur roches ultrabasiques et les sols argilo-siliceux sur roches volcano-sédimentaires. En revanche, la diversité et la proportion des lignées ECM sur les sols ferrallitiques sur roches ultrabasiques et les sols argilo-siliceux sur roches volcano-sédimentaires sont significativement différentes de celles dans des sols alumino-calciques sur roches calcaires. Les analyses statistiques ont montré que la distribution des communautés ECM est statistiquement corrélée avec (i) les teneurs totales en calcium, phosphore et aluminium des sols alumino-calciques sur roches claciaires et (ii) la teneur totale en cobalt des sols ferrallitiques sur roches ultrabasiques.

L'ensemble de ces résultats suggère qu'en Nouvelle-Calédonie, la légumineuse *Acacia spirorbis* possède la capacité à établir des symbioses avec des champignons ectomycorhiziens pour des conditions édaphiques particulièrement contrastées.

2.5.4.2 Les rhizobia associés à *Acacia spirorbis*

Les rhizobia associés à *Acacia spirorbis* ont fait l'objet d'une étude préliminaire (Grangeteau *et al.*, 2012) qui a montré que ces rhizobia appartiennent au genre *Bradyrhizobium* pour les sols argilo-siliceux sur roches volcano-sédimentaires.

Pour approfondir les recherches sur les rhizobia associés à *A. spirorbis*, ce travail de thèse cherche à comprendre la contribution de la symbiose fixatrice d'azote dans l'adaptation d'*A. spirorbis* à des sols contrastés, et parfois extrêmes.

Chapitre 1

Évaluation du potentiel fixateur d'azote d'*A. spirorbis* en conditions naturelles

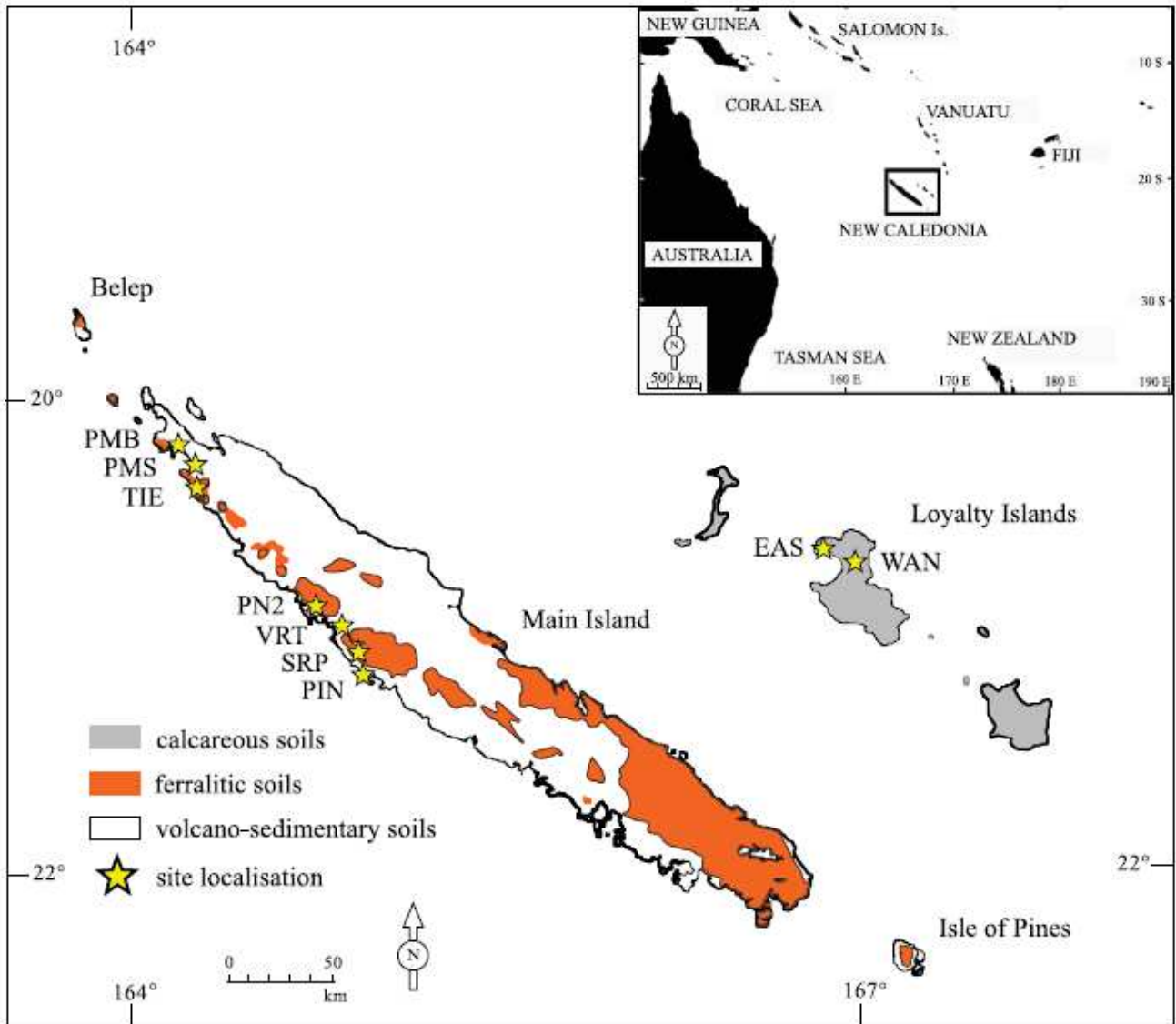


Figure 36 : Carte de la Nouvelle-Calédonie selon les trois types de sol : calcaires (en gris), ferralitiques (en orange) et volcano-sédimentaire (en blanc). Les sites d'études sont localisés avec des étoiles jaunes.

3.1 Introduction

En Nouvelle-Calédonie, *Acacia spirorbis* subsp. *spirorbis* est une légumineuse endémique (Brown *et al.*, 2012) se développant naturellement sur des sols ferrallitiques sur roches ultrabasiques, des sols argilo-siliceux sur roches volcano-sédimentaires et des sols alumino-calciques sur roches calcaires, dans une gamme de pH allant de 4 à 8 et jusqu'à 400 m d'altitude (Figure 36 ; Ducouso *et al.*, 2014). Sur le terrain, *A. spirorbis* établit des symbioses avec des champignons mycorhiziens à arbuscule, des champignons ectomycorhiziens et plus particulièrement, avec des bactéries fixatrices d'azote : les rhizobia (Grangeteau *et al.*, 2012 ; Ducouso *et al.*, 2014). Ces symbioses pourraient jouer un rôle essentiel dans l'adaptation d'*A. spirorbis* à des contraintes édaphiques variées. A ce jour, une seule étude s'est intéressée au statut fixateur d'azote d'*A. spirorbis* et ses résultats ont montré que les rhizobia majoritairement isolés des nodules appartiennent au genre *Bradyrhizobium* (Grangeteau *et al.*, 2012). Cependant, en Nouvelle-Calédonie *A. spirorbis* colonise des sols qui présentent des contraintes édaphiques variées et parfois extrêmes, telles que les concentrations élevées en ETM, et aucune recherche n'a été menée sur la variation éventuelle du potentiel fixateur d'azote de cette espèce en fonction de telles conditions.

3.2 Méthodologie : Evaluer le potentiel fixateur d'azote d'*A. spirorbis*

Ce travail de thèse porte sur l'évaluation du potentiel fixateur d'azote d'*A. spirorbis* à partir de populations naturelles se développant sur des sols alumino-calciques sur roches calcaires, ferrallitiques sur roches ultrabasiques et argilo-siliceux sur roches volcano-sédimentaires. La méthode utilisée pour l'évaluation *in situ* du potentiel fixateur d'azote d'*A. spirorbis* est celle de l'abondance naturelle d'un isotope stable de l'azote : le ^{15}N . Pour rappel, cette méthode se base sur la différence du $\delta^{15}\text{N}$ entre une légumineuse fixatrice d'azote et des espèces de référence non-fixatrices, appelées plantes compagnes. Dans un premier temps, des calculs ont été réalisés sur la différence entre les rapports $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ de ces plantes et celui de l'air qui est considéré comme constant ($^{15}\text{N}_{\text{air}}/^{14}\text{N}_{\text{air}} = 0,3663 \%$; Mariotti, 1983). Les écarts obtenus pour la légumineuse et les espèces compagnes sont respectivement appelés $\delta^{15}\text{N}_f$ et $\delta^{15}\text{N}_{nr}$ et s'expriment en pour mille (‰), selon la formule suivante (Shearer & Kohl, 1986 ; Högberg, 1997) :

$$\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = [({}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N} - 0,3663) / 0,3663] \times 1000$$

Le rapport $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ s'exprime en ‰. Par définition, le $\delta^{15}\text{N}$ de l'air est égal à zéro. Une fois que les $\delta^{15}\text{N}$ de la légumineuse et des plantes compagnes sont connus, il est possible d'estimer le pourcentage d'azote dérivé de la fixation biologique du N_2 (%Ndfa), selon la formule suivante (Shearer & Kohl, 1986) :

$$\% \text{Ndfa} = (\delta^{15}\text{N}_{nr} - \delta^{15}\text{N}_f) / (\delta^{15}\text{N}_{nr} - \beta) \times 100$$

Le paramètre β correspond au $\delta^{15}\text{N}$ de la légumineuse lorsqu'elle fixe 100 % de son azote, en se développant sur un milieu dépourvu d'azote minéral.

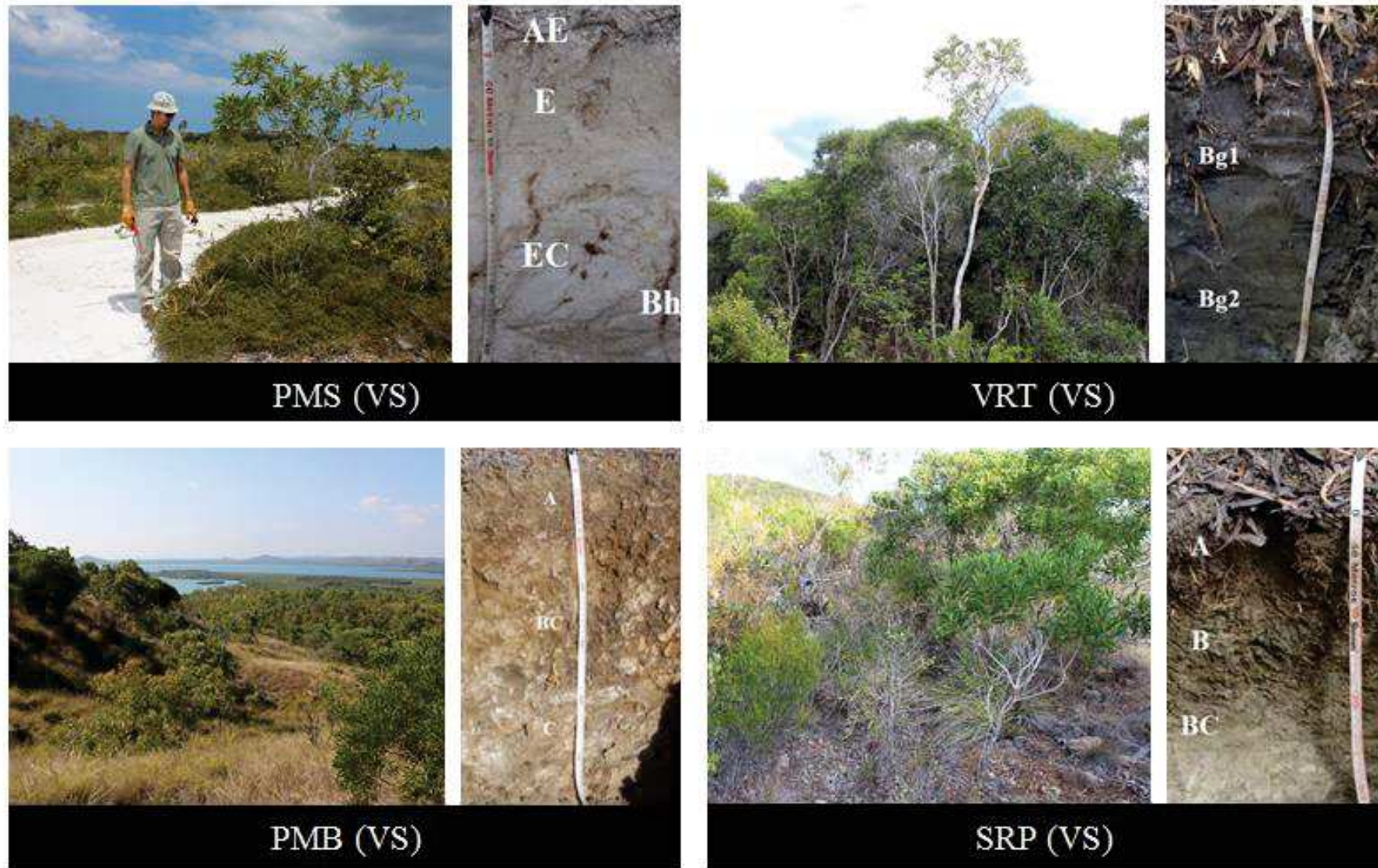


Figure 37 : Photographie de quatre sites d'étude présentant des sols de type volcano-sédimentaire (VS), où se développe naturellement *A. spirorbis*. Pour chacun des sites, une photographie des environs est associée au profil de sol correspondant au site d'étude. Les horizons sont symbolisés par des lettres A, AE, B, BC, Bg1, Bg2, C, E, et EC. Le sigle Bh qui correspond à des inclusions de matière organique.

Abréviations des sites d'études : PMS = Poum silice ; VRT = Vertisol ; PMB = Poum malabou et SRP = Serpent

L'évaluation *in situ* de la fixation biologique de l'azote d'une légumineuse arbustive dans des environnements contrastés est délicate pour deux raisons. La première vient de la nécessité de repérer des cortèges similaires de plantes compagnes non-fixatrices d'azote entre les différents sites d'étude. La seconde est liée à la nécessité de gérer convenablement les différences de $\delta^{15}\text{N}$ parmi les espèces de références ($\delta^{15}\text{N}_{\text{ref}}$).

3.3 Les sites d'études : description des profils de sol

Plusieurs sites sur lesquels se développe naturellement *A. spirorbis* ont été choisis pour représenter les trois grands types de sols de l'étude : alumino-calcaïques sur roches calcaïres, ferralitiques sur roches ultrabasiqes et argilo-siliceux sur roches volcano-sédimentaires (Figure 37 ; Figure 38 et Figure 39, respectivement).

3.3.1 Les sols de type argilo-siliceux (Figure 37)

Le site *Poum Silice* (PMS) se situe dans une plaine à sables blancs recouverts d'une végétation éparse (plages nues). Le sol est de type siliceux blanchi (acrisol). Les horizons identifiés sont les suivants : un horizon AE (de 0 à 3 cm) beige, limono sableux avec quelques graviers en surface, poreux, présentant une cohésion faible et un chevelu racinaire dense. Un horizon E (de 3 à 10 cm) gris clair, sablo-limoneux, massif, présentant une faible cohésion, une porosité fine et quelques racines. Un horizon EC (de 10 à 40 cm et plus) blanc, sablo-limoneux, compact, peu poreux, présentant une stratification horizontale du sédiment, quelques conduits racinaires imprégnés de matière organique (indiqué par le symbole Bh).

Le site *Poum Malabou* (PMB) se situe sur un sommet de colline surplombant une plaine et une zone côtière à mangrove. Le sol est brun argileux (cambisol), caillouteux et aéré avec un bon enracinement. Les horizons identifiés sont les suivants : un horizon A (de 0 à 10 cm) brun sombre, argileux, frais, poreux, grumeleux en surface, présentant des fragments de roches (35 %), une cohésion forte et de nombreuses racines. Un horizon BC (de 10 à 35 cm) brun, argileux, sec, poreux, possédant de nombreux fragments de roches (70 %), une cohésion forte et quelques racines. Un horizon C (de 35 à 50 cm et plus) brun argileux, présentant des blocs de roche fissurée, une cassure gris pâle, des revêtements noirs et quelques racines.

Le site *Vertisol* (VRT) est proche d'une rivière (Tamaon) et correspond à une plaine de sols noirs avec une litière abondante. Le sol est noir, très argileux et lourd (vertisol à argiles gonflantes). Les horizons identifiés sont les suivants : un horizon A (de 0 à 10 cm) brun noir, très argileux, frais, collant, poreux, grumeleux, présentant une cohésion forte et de nombreuses racines. Un horizon Bg1 (de 10 à 50 cm) brun verdâtre, très argileux, humecté, plastique et collant, massif, peu poreux, présentant une cohésion forte, des faces luisantes et quelques racines, dont certaines sont décomposées. Un horizon Bg2 (de 50 à 60 cm et plus) gris verdâtre, très argileux, humecté, plastique et collant, massif, peu poreux, présentant une cohésion forte, des fentes à face luisante et quelques racines.

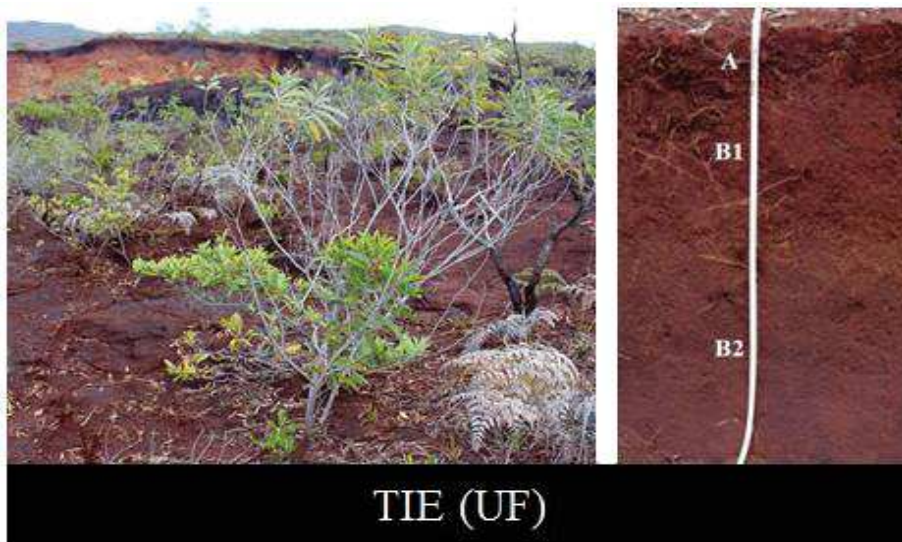


Figure 38 : Photographie de trois sites d'étude présentant des sols de type métallifère (UF), où se développe naturellement *A. spirorbis*. Pour chacun des sites, une photographie des environs est associée au profil de sol correspondant au site d'étude. Les horizons sont symbolisés par des lettres A, AB, B, B1, B2 et BC.
 Abréviation des sites : TIE = Tiébaghi ; PIN = Pindaï ; PN2 = Pandanus 2

Le site *Serpentine* (SRP) se situe en bord de route à la base du massif ultrabasique du Tia (semelle serpentinique). Le sol est brun magnésien (Magnesic Cambisol), caillouteux, moyennement profond avec un bon enracinement. Les horizons identifiés sont les suivants : un horizon A (de 0 à 10 cm) brun foncé, argilo-sableux, poreux, présentant de nombreux points jaunes verdâtres (silicates altérés), des agrégats grumeleux, un chevelu racinaire abondant et de grosses racines horizontales. Un horizon B (de 10 à 20 cm) brun foncé, argilo-sableux, friable, massif, compact, moyennement poreux, présentant des plages jaunes verdâtres et des racines moins abondantes. Un horizon BC (de 20 à 30 cm et plus) jaune verdâtre, sablo-argileux, massif, peu poreux et présentant des remplissages bruns argileux et des racines fines peu abondantes.

3.3.2 Les sols de type ferralitiques (Figure 38)

Le site *Tiébaghi* (TIE) se situe sur le bas d'un versant du massif ultrabasique de Tiébaghi. Le sol colluvionnaire est rouge et riche en pisolites (Ferralsol), profond, très poreux et il présente un enracinement limité. Les horizons identifiés sont les suivants : un horizon A (de 0 à 25 cm) brun rouge foncé, sans cohésion, bouillant, poreux, présentant une partie supérieure compactée à agrégats grumeleux, des pisolites (30%), une poudre très fine et des racines assez nombreuses. Un horizon B1 (de 25 à 45 cm), le premier horizon à colluvion, brun rouge, friable, bouillant, poreux, présentant une poudre très fine, des pisolites (40%) et peu de racines. Un horizon B2 (de 45 à 80 cm et plus), le deuxième horizon à colluvion brun rouge violacé, friable, bouillant, poreux, présentant une poudre très fine, des pisolites (40%) et peu de racine.

Le site *Pindaï* (PIN) se situe sur la presqu'île de Pindaï. Le sol est rouge argileux (Ferralsol), bien structuré avec un bon enracinement. La litière est abondante. Les horizons identifiés sont les suivants : un horizon A (de 0 à 10 cm) brun rouge foncé, argileux, sec, poreux, présentant quelques graviers ferrugineux (10%), des agrégats grumeleux et un chevelu racinaire dense. Un horizon AB (de 10 à 30 cm) brun rouge, argileux, sec, poreux, présentant quelques graviers ferrugineux (10%), des agrégats polyédriques, une cohésion moyenne et des racines abondantes. Un horizon B1 (de 30 à 45 cm) brun, argileux, frais, poreux, présentant quelques graviers ferrugineux (10%), une cohésion moyenne et moins de racines. Un horizon B2 (de 45 à 60 cm et plus) brun jaune, argileux, frais poreux, présentant quelques graviers ferrugineux, une cohésion moyenne et quelques racines.

Le site *Pandanus 2* (PN2) se situe dans la plaine alluviale de la rivière Pandanus, au sein du massif du Koniambo, caractérisée par le dépôt d'un cône de matériaux pisolitiques et un faible couvert végétal. Le sol brun-rouge magnésien (Magnesic Ferralsol) est composé de colluvions dans sa partie supérieure. Les horizons identifiés sont les suivants : un horizon A (de 0 à 15 cm) brun-rouge foncé, bouillant, très poreux, présentant une poudre très fine, de très nombreux pisolites (80%) et un chevelu racinaire. Un horizon B1 (de 20 à 45 cm) brun-rouge, très argileux, collant, moyennement poreux, présentant quelques plages noires, des pisolites (10%) et des racines peu abondantes. Un horizon BC



Figure 39 : Photographie de deux sites d'étude présentant des sols de type calcaire (CA), où se développe naturellement *A. spirorbis*. Pour chacun des sites, une photographie des environs est associée au profil de sol correspondant au site d'étude. Les horizons sont symbolisés par des lettres A, AC et C.

Tableau 3 : Distribution et nombre des individus d'espèces de références non-fixatrices d'azote échantillonnées sur les neuf sites d'études. Légende : CA = Calcaire ; UF = Ultramafique et VS = Volcano-sédimentaire. Abréviation des sites : SRP = Serpent ; PIN = Pindaï ; PN2 = Pandanus 2 ; TIE = Tiébaghi ; PMB = Poum malabou ; VRT = Vertisol ; PMS = Poum silice ; EAS = Easo ; WAN = Wanaham

Site	SRP	PIN	PN2	TIE	PMB	VRT	PMS	EAS	WAN
Type de sol	VS	UF	UF	UF	VS	VS	VS	CA	CA
<i>Dodonaea viscosa</i>	3	3	3	-	-	-	-	-	-
<i>Sannantha</i> sp.	-	-	3	3	-	-	3	-	-
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	-	3	3	3	3	3	3	-	-
<i>Wikstroemia indica</i>	-	3	-	-	-	3	3	3	3
<i>Morinda citrifolia</i>	-	-	-	-	-	-	-	3	3
<i>Psychotria nummularoides</i>	-	-	-	-	-	-	-	3	3
<i>Scaevola</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	3	3



Figure 40 : Photographie de quatre espèces de plantes compagnes non-fixatrice de N₂, échantillonnées sur le terrain à proximité d'*A. spirorbis*. De gauche à droite, un individu de *Dodonaea viscosa* récolté sur le site de PN2, un *Sannantha* sp. sur le site de TIE, un *Melaleuca quinquenervia* sur le site de PN2 et un *Wikstroemia indica* sur le site de VRT. Crédit : Antoine Galiana

(de 30 à 50 cm et plus) brun-jaune verdâtre, argilo-sableux, frais, massif, peu poreux, présentant des plages noires (oxydes de manganèse) et des remplissages bruns foncés.

3.3.3 Les sols de type alumino-calciques (Figure 39)

Le site *Easo* (EAS) se situe à Lifou, sur les îles Loyautés. Son sol est humifère, peu épais sur calcaire (Leptosol) avec un enracinement superficiel. Les horizons identifiés sont les suivants : un horizon A (de 0 à 15 cm) humifère brun foncé, poreux, présentant une cohésion faible, de nombreux fragments de calcaires, des racines et des débris organiques abondants. Un horizon AC (de 15 à 20 cm) correspondant à une transition avec le calcaire sous-jacent, brun noir plus compact, adhérent au calcaire, présentant des fragments de calcaires très abondants. Un horizon C (de 20 à 40 cm et plus) correspondant à une roche calcaire blanche (effervescente au HCl), poreuses, présentant des plages grises dans des cavités de dissolutions et plus ou moins dentelée dans sa partie supérieure et plus massif en dessous.

Le site *Wanaham* (WAN) se situe également sur Lifou, à proximité d'une carrière. Le sol brun-rouge (Ferralsol) est riche en aluminium, très poreux avec un bon enracinement. Les horizons identifiés sont les suivants : un horizon A (de 0 à 10 cm) brun, frais, très poreux, micro agrégé, décarbonaté (pas d'effervescence HCl), présentant peu de cohésion, des fragments calcaires et un chevelu racinaire. Un horizon AC (de 20 à 25 cm) correspondant à une transition avec le calcaire sous-jacent, présentant une matrice brune plus compacte adhérente au calcaire et des fragments calcaires plus abondants que dans l'horizon A. Un horizon C (au-delà de 25 cm) correspondant à une roche calcaire blanche (effervescence HCl), friable (se cassant à la main), poreuse, présentant des plages bruns clairs et une partie supérieure plus ou moins dentelée.

3.4 Les cortèges de plantes compagnes non-fixatrices d'azote

Sur chacun des sites présentés, trois individus appartenant à une population naturelle d'*A. spirorbis*, ainsi qu'un cortège de plantes compagnes non-fixatrices d'azote (Figure 40) ont été échantillonnés. L'application de la méthode de l'abondance naturelle du ^{15}N nécessite que chaque espèce de plante compagne soit au minimum commune entre deux sites d'études (Tableau 3). Ce critère rend alors comparable les résultats d'estimation du %Ndfa entre les sites d'études et les type de sols. Les plantes compagnes échantillonnées sont les suivantes : *Dodonaea viscosa* Jacq., 1760 ; *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T.Blake, 1958 ; *Morinda citrifolia* L., 1753 ; *Psychotria nummularoides* Guillaumin et *Scaevola* sp. L., 1771 ; *Sannantha* sp. Peter G.Wilson ; *Wikstromia indica* (L.) C.A.Mey. Sur chacun des sites d'étude, la position des plantes compagnes échantillonnées a été relevée par rapport à *Acacia spirorbis* et une cartographie de la campagne d'échantillonnage est présentée en Figure 41. Les espèces les plus fréquentes sur les sites d'étude sont *Dodonaea viscosa*, *Melaleuca quinquenervia*, *Sannantha* sp. et *Wikstromia indica*. L'espèce *Wikstromia indica* est présente sur les sols alumino-calciques, ferralitiqes et argilo-siliceux (Tableau 3). Les teneurs en azote et l'abondance du ^{15}N ont été évaluées sur les feuilles d'*A. spirorbis* et des plantes de référence.

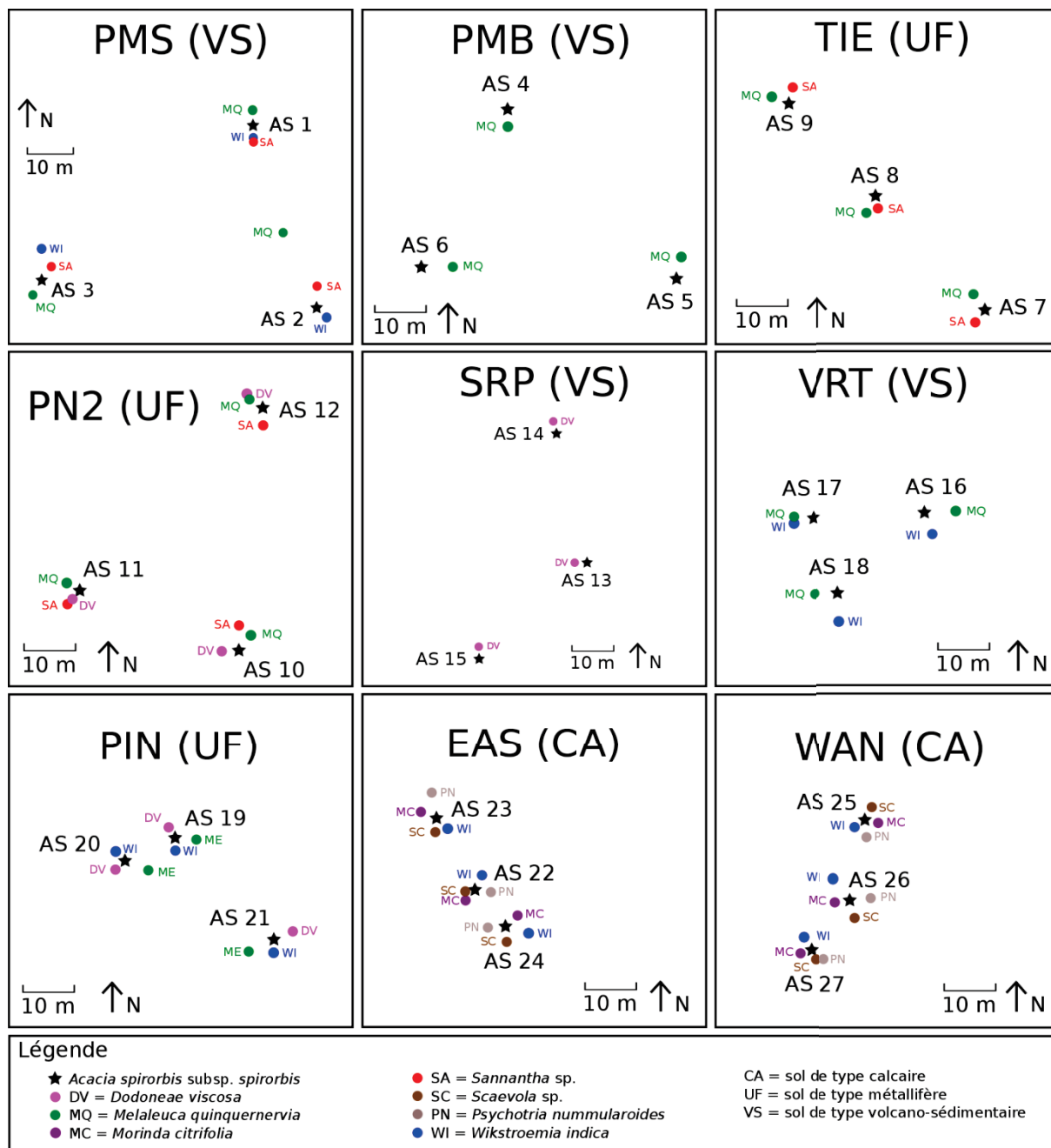


Figure 41 : Cartographie des individus d'*Acacia spirorbis* échantillonnés et de leur plantes compagnes non-fixatrices de N₂ sur chacun des sites d'études. Les *Acacia spirorbis* sont symbolisés par une étoile noire et les plantes compagnes par un rond coloré en fonction des sept espèces. Pour chaque site d'étude, le type de sol est indiqué entre parenthèse.

3.5 Principales données obtenues et leur analyse

Les données présentées dans cet article incluent (i) une description des conditions physico-chimiques des sols des sites d'études, mettant en évidence les conditions édaphiques contrastées entre les sols aluminocalciques, ferrallitiques et argilo-siliceux (Tableau 2 et Figure supplémentaire S1 de l'article), (ii) les teneurs en azote et les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ d'*Acacia spirorbis* et de ses plantes compagnes non fixatrices d'azote en fonction des conditions édaphiques (Tableau 3 de l'article) et (iii) les estimations du taux de fixation de l'azote (%Ndfa) d'*Acacia spirorbis* par rapport à celui des plantes compagnes non fixatrices d'azote (Tableau 4 de l'article).

Toutes les données obtenues (teneurs en azote, $\delta^{15}\text{N}$, %Ndfa) ont été analysées statistiquement en fonction des types de sols (Tableau supplémentaire S3).

Ces analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel R (Development Core Team (2008), en utilisant le package "RVAideMemoire", version 0.9-54, disponible dans le lien suivant : <http://CRAN.R-project.org/package=RVAideMemoire> et le package "agricolae", version 1.2-3, disponible sur le lien suivant : <http://CRAN.R-project.org/package=agricolae>. Lorsque la distribution des données ne suivait pas une loi normale, des tests non-paramétriques ont été utilisés. Les corrélations entre deux variables numériques ont été calculées en utilisant le test non-paramétrique de corrélation de rang de Spearman. Des matrices de corrélation ont ainsi été réalisées pour synthétiser les résultats de l'analyse statistique des variables quantitatives (Tableaux supplémentaires S2 et S3 de l'article). Pour chacune des matrices de corrélation obtenues, les résultats des tests de corrélations (les valeurs de P) ont été ajustés selon la méthode de Bonferroni (Bland & Altman, 1995). Des tests non-paramétriques d'analyse de variance du type ANOVA avec 1000 permutations ont été utilisés pour détecter l'influence significative d'un facteur donné (type de sol ou site d'étude par exemple) sur la distribution de données appartenant à une variable de type numérique (les teneurs en éléments du sol, les teneurs en azote des plantes échantillonnées, les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ et %Ndfa). Lorsqu'un facteur exerçait une influence significative sur une variable quantitative (en dessous d'un seuil où $P < 0,05$), un test de comparaison multiple de Tukey a été effectué en prenant en compte un seuil de 0,05. Une Analyse en Composantes principales (ACP) a été réalisée pour étudier la distribution des sites d'études, en fonction des paramètres édaphiques, des teneurs en azote et abondance en ^{15}N d'*Acacia spirorbis* et des plantes de référence non-fixatrices d'azote (Figure 2 de l'article). Une seconde ACP simplifiée a été réalisée en retirant des variables quantitatives corrélées entre elles (Figure supplémentaire S3 de l'article).

Les résultats issus de ces analyses statistiques des données ont fait l'objet d'une publication dans la revue *European Journal of Soil Biology* en Mars 2018 (Vincent *et al.*, 2018 ; soumission initiale en Décembre 2017). Cette publication est présentée dans la partie suivante, telle qu'elle apparaît dans la revue.



Biological *in situ* nitrogen fixation by an *Acacia* species reaches optimal rates on extremely contrasted soils



Bryan Vincent^{a,c,*}, Philippe Jourand^a, Farid Juillot^b, Marc Ducouso^c, Antoine Galiana^c

^a IRD, UMR040 LSTM, NC-98848 Noumea Cedex, New Caledonia

^b IRD, UMR7590 IMPMC, NC-98848 Noumea Cedex, New Caledonia

^c CIRAD, UMR082 LSTM, F-34398 Cedex 5, Montpellier, France

ARTICLE INFO

Handling Editor: Xingliang Xu

Keywords:

Leguminous tree
Nitrogen-fixing symbiosis
¹⁵N natural abundance
Contrasted edaphic conditions
New Caledonia

ABSTRACT

Acacia spirorbis subsp. *spirorbis* Labill. is a legume tree that grows on calcareous, metalliferous and siliceous soils and is endemic to New Caledonia. The present study assesses the nitrogen-fixing potential of *A. spirorbis* in its contrasted natural environments.

Soil samples, the leaves of *A. spirorbis* and of co-occurring non-N₂-fixing reference plant species were collected from nine study sites across New Caledonia. Soil properties were analyzed by ICP-AES. Nitrogen (N) content and natural ¹⁵N abundance ($\delta^{15}\text{N}$) were measured in *A. spirorbis* and in reference plants. The percentage of N derived from the atmosphere (%Nd_{fa}) fixed by *A. spirorbis* was also assessed and correlated with soil parameters.

Remarkably, mean N contents in *A. spirorbis* showed no significant differences whatever the soil categories ($20.2 \pm 3.5 \text{ g kg}^{-1}$) whereas major differences were found in N contents in the reference plants. The average $\delta^{15}\text{N}$ value of *A. spirorbis* was close to zero (+0.29‰), while that of the reference species ranged from -4.83 to +7.05‰. In eight of the nine sites studied, *A. spirorbis* %Nd_{fa} was above 70%, regardless of the soil category. Unlike in the reference species, no statistical correlations were found between *A. spirorbis* N content and $\delta^{15}\text{N}$ abundance and soil parameters.

Despite the difficulty of using the $\delta^{15}\text{N}$ abundance method in such contrasted environments, the resulting data show that *A. spirorbis* has the highest N₂-fixing potential yet recorded in the genus *Acacia* and its nitrogen fixation is effective almost throughout its natural range.

1. Introduction

New Caledonia is a tropical archipelago located in the South Pacific Ocean, comprising the main island (*Grande Terre*), three smaller islands (Loyalty, Belep and the Isle of Pines) and many islets. The geological history of New Caledonia is complex and as a result, many kinds of bedrocks emerged about 37 Ma ago [1,2]. Climatic factors altered the bedrocks, resulting in the formation of different types of soils: ferralsols, Acrisol, cambisol, leptosol, etc., and, in turn, in extremely contrasted soil properties [1,3]. Combined with topographical and climatic diversity, the geological history of New Caledonia means it is host to various ecosystems with a rich flora [1,4]. Over 3371 vascular plant species have been identified, of which 80% are endemic [5]. Ultramafic habitats likely shaped New Caledonia vegetation by promoting plant endemism and speciation [6]. Today, this exceptional flora is threatened by recurrent fires, extensive grazing, urbanization and mining [7,8] making New Caledonia a hotspot of biodiversity [9,10]. Minimizing the anthropic impact on the New Caledonian environment is a

major challenge, and mining companies need to rehabilitate the soil after extracting the mineral resources [8]. Some potential soil rehabilitation species have already been tested including *Eucalyptus* and Australian *Acacias*, but none were able to adapt to the New Caledonian post-mining soils enriched in nickel [11]. Subsequently, endemic species were investigated, with a particular focus on those able to thrive despite poly-metal toxicity and, ideally, able to reintroduce nitrogen into the soil through rhizobia symbioses.

One notable candidate, *Acacia spirorbis* subsp. *spirorbis* Labill. (1825), grows over large areas and occurs naturally on all types of soils throughout the archipelago. This phyllodinous species of *Acacia* belongs to the Fabaceae family and the Caesalpinioideae subfamily in the clade of Australasian *Acacia* [12,13]. *Acacia spirorbis* is probably the result of natural long term dispersal from Australia [14] and displays invasive behavior in degraded ecosystems and deforested lands, which is a common feature of numerous Australian *Acacia* species [15–17]. Field observations have shown that *A. spirorbis* is spontaneously widespread in New Caledonia and grows in calcareous, ultramafic and

* Corresponding author. IRD, UMR040 LSTM, NC-98848 Noumea Cedex, New Caledonia.
E-mail address: bryan.vincent@ird.fr (B. Vincent).

<https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2018.03.003>

Received 8 December 2017; Received in revised form 5 March 2018; Accepted 16 March 2018
1164-5563/ © 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

volcano-sedimentary environments, with a pH ranging from 4 to 8, up to an elevation of 400 m asl., and on heavy metal or non-heavy metal enriched soils [18]. Recent field observations showed that *A. spirorbis* naturally establishes symbioses with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), ectomycorrhizal fungi (ECM) and nitrogen fixing bacteria [18,19]. These symbioses are presumed to play a key role in *A. spirorbis* adaptation to varied and extreme constraints. So far, only one study has been performed on the nitrogen fixing symbiotic status of *A. spirorbis*, which showed that the bacteria isolated from its root nodules were predominantly represented by *Bradyrhizobium* spp. strains [19]. However, no investigation has yet been undertaken of the potential key role of the N₂-fixing occurring with symbioses of *A. spirorbis* (shortened by N₂-fixation in the text) under such harsh soil conditions, especially in the N depleted soils found in ultramafic environments.

Assessing the N₂-fixation of a given legume tree that occurs naturally on extremely contrasted soils is challenging for two main reasons. The first is finding shared patterns in companion non-N₂-fixing reference species across the study sites. The second reason is coping with the marked variation in ¹⁵N abundance in the reference species ($\delta^{15}\text{N}_{\text{ref}}$) that may occur across such contrasted environments.

The aim of the present study was thus to assess the N₂-fixing potential of *A. spirorbis* in various soil conditions, using the ¹⁵N natural abundance method. This paper includes a brief description of the contrasted soil properties under which *A. spirorbis* occurs naturally, i.e. in metalliferous, calcareous and siliceous soils. The N contents and ¹⁵N natural abundance ($\delta^{15}\text{N}$) of the legume tree and of non-N₂-fixing reference species were measured according to each site and each soil category concerned. The percentage of N derived from atmosphere (% Ndfa) by *A. spirorbis* was estimated in comparison with the companion reference species. Correlation analyses were performed between the soil properties of the different study sites and the nitrogen parameters.

2. Material and methods

2.1. Selection and description of the study sites

A total of nine sampling sites distributed across the main island and Loyalty Islands were chosen by superimposing the distribution map of *A. spirorbis* onto the geological map of the archipelago (Fig. 1). The sites selected were Easo (EAS), Pandanus 2 (PN2), Pindaï (PIN), Poum Malabou (PMB), Poum Silice (PMS), Serpent (SRP), Tiébaghi (TIE), Vertisol (VRT) and Wanaham (WAN), to ensure that the maximum range of soil conditions in New Caledonia were covered in our study.

2.2. Soil properties

The characteristics of the sampling sites are summarized in Table 1. Soils were identified using the WRB Classification (<http://www.fao.org/3/a-i3794e.pdf>). The soil samples were taken from the top 30 cm layer, where nodules are assumed to find the best conditions for their development [20]. Total concentrations of major and minor elements (Al, Ca, Co, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P and Si) in the soil were assessed at the ISO 9002-certified *Laboratoire des Moyens Analytiques* (LAMA) in Noumea IRD Center (New Caledonia) by ICP-AES after alkaline fusion. Organic carbon (C) and nitrogen (N) contents were determined, following the Walkley-Black and Kjeldahl methods respectively, as described by Perrier et al. [21].

The soils of the nine study sites can be grouped in three contrasted soil types, metalliferous, calcareous and siliceous according to their chemical composition (Table 2) as revealed by principal component analysis (PCA) (Fig. S1). The metalliferous soils (at the Pindaï, Pandanus 2 and Tiébaghi sites) contain significantly higher concentrations of metallic elements than the siliceous and organic soil types (all sites combined), in particular Co, Cr, Fe, and Ni, which are on average 10, 40, 3 and 40 times higher, respectively (Table 2). The calcareous soils (at Easo and Wanaham sites) have the highest concentrations of C, N and P

elements respectively, 3, 8 and 40 times higher on average than those obtained in the two other soil types (Table 2). The siliceous soils (at Poum Malabou, Poum Silice, Serpent and Vertisol sites) are characterized by the highest Si contents, on average 2 times higher than those of metalliferous or calcareous soils (Table 2).

The total N contents of soils (N_{soil}) differed significantly (P < 0.001) with the site, with the lowest N_{soil} values (less than 500 mg kg⁻¹) measured in Pandanus 2, Tiébaghi and Poum silice sites and the highest in Easo (21,817 mg kg⁻¹) (Table S1). Although Easo and Wanaham presented contrasted soil N contents, calcareous soils had higher N_{soil} values than metalliferous or siliceous soils, averaging 1338 and 1182 mg kg⁻¹ respectively. The soil ¹⁵N abundances ($\delta^{15}\text{N}_{\text{soil}}$) were all positive and differed significantly according to the site (P < 0.001), ranging from +3.04‰ in Serpent site up to +11.0‰ in Pandanus 2 site (Table S1).

2.3. Sampling method and collection of plant material

In each of the nine selected sites, we collected all the leaves from three *A. spirorbis* trees growing at a distance of at least 50 m apart and leaves from non-N₂-fixing reference tree or shrub species found within a 2–4 m radius from the base of the trunk of each *A. spirorbis* tree sampled. The leaves sampled from each individual tree were reduced to form representative subsamples each weighing about 10 g (fresh weight). Seven non-N₂-fixing reference species were sampled across the nine sites, namely *Dodonaea viscosa* Jacq., *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake, *Morinda citrifolia* L., *Psychotria nummularoides* (Guillaumin), *Sannantha* spp., *Scaevola* sp. and *Wikstroemia indica* (L.) C.A. Mey., confirmed by referring to the botanical collection at the IRD Herbarium in Noumea. These plant species were selected (i) according to their representativeness and abundance in each study site and (ii) because they occurred in a maximum of study sites. Each of the reference species was present in at least two sites, but none was present in all nine study sites (Table 1). However, *Wikstroemia indica* was present in the three soil types and in five of the nine study sites (Table 1), and, like *A. spirorbis*, is one of the rare ubiquitous plant species found in the three major soil types in New Caledonia. *Melaleuca quinquenervia* (Myrtaceae), an ectomycorrhizal tree species [22] like *A. spirorbis*, was also found in five of the nine study sites but only in two of the three soil types, the metalliferous and siliceous ones (Table 1). The leaves and soil samples were oven dried at 50 °C for 48 h and ground into a fine powder with a sample mill (Foss Cyclotec 1093). Next, 5–10 mg (dry weight) of each sample were transferred into tin capsules before total N contents and $\delta^{15}\text{N}$ were determined using a CN analyzer in tandem with a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (Europa ANACA-GSL, PDZ Europa Ltd, Sandbach, UK) at the UC Davis (University of California, Davis) Stable Isotope Facility for leaf samples. The $\delta^{15}\text{N}$ in the soil samples was assessed at the *Laboratoire des Moyens Analytiques* (LAMA) of the Noumea IRD Center (New Caledonia), on a CHN analyzer Sercon Integra 2, combining a Sercon 20–22 Stable Isotope Ratio Mass Spectrometer (IRMS) and an SL elemental analyzer.

2.4. Determination of the proportion of nitrogen derived from atmospheric N₂

The percentage of nitrogen derived from atmospheric N₂ (%Ndfa) was calculated according to the following equation [23]:

$$\%Ndfa = (\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}} - \delta^{15}\text{N}_f) / (\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}} - \beta) \times 100$$

Where $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$ is the natural ¹⁵N abundance in the non-N₂-fixing reference species, $\delta^{15}\text{N}_f$ is the natural ¹⁵N abundance in *A. spirorbis* and β , the $\delta^{15}\text{N}$ measured in leaves of nodulated *A. spirorbis* growing in a N-free nutrient medium that fixed 100% of atmospheric N₂. In this study, the average β was -0.937‰ (standard error = ± 0.37‰). The β value was calculated from three *A. spirorbis* seedlings inoculated with a

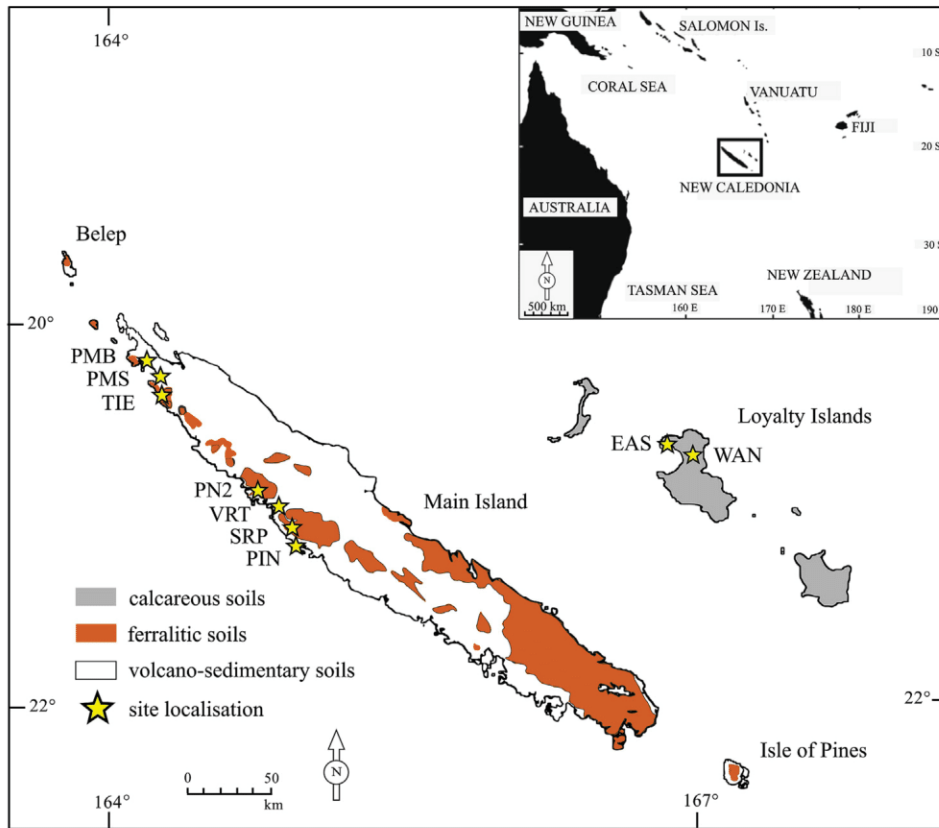


Fig. 1. Map of New Caledonia according to the three main soil categories: calcareous (in grey), ferrallitic (in orange) and volcano-sedimentary (in white). Sampling sites are located with white stars. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Table 1

Characteristics of the nine study sites with soil categories, WRB classification, geographical coordinates, altitude, the occurring non-N₂-fixing reference plant species sampled for determination of ¹⁵N natural abundance and the means ± standard error of the height and circumference at ground level of the *A. spirorbis* trees sampled.

Site name	Soil category	Soil WRB classification	Soil description	Coordinates	Elevation	Non-N ₂ -fixing reference species	<i>A. spirorbis</i> height (in m)	<i>A. spirorbis</i> circumference (in cm)
Pandanus 2	Metalliferous	Abruptic Ferralsol	Brown clayey soil with pisolitic cover	S 21°01'58.8" E 164°46'41.0"	31 m	<i>Dodonaea viscosa</i> <i>Melaleuca quinquenervia</i> <i>Sannantha</i> sp.	2.00 ± 0.36	14.3 ± 3.8
Pindai	Metalliferous	Haplic Ferralsol	Red-brown soil	S 21°19'55.4" E 164°58'19.2"	65 m	<i>Dodonaea viscosa</i> <i>Wikstroemia indica</i>	5.28 ± 0.46	17.3 ± 1.7
Tiébaghi	Metalliferous	Geric Plinthosol	Red pisolitic soil	S 20°28'19.2" E 164°15'35.2"	69 m	<i>Melaleuca quinquenervia</i> <i>Sannantha</i> sp.	2.37 ± 0.38	14.7 ± 0.5
Easo	Calcareous	Rendzic Leptosol (Humic)	Very thin dark-brown humic soil	S 20°47'12.2" E 167°07'21.7"	25 m	<i>Morinda citrifolia</i> <i>Psychotria nummularoides</i> <i>Scaevola</i> sp.	3.23 ± 0.90	15.7 ± 1.9
Wanaham	Calcareous	Gibbsic Ferralsol (Magnesic)	Thin yellow-brown soil	S 20°44'43.56" E 167°13'17.88"	31 m	<i>Wikstroemia indica</i> <i>Morinda citrifolia</i> <i>Psychotria nummularoides</i> <i>Scaevola</i> sp.	4.73 ± 0.26	15.0 ± 0.8
Poum Malabou	Siliceous	Leptic Cambisol	Brown gravel-rich soil	S 20°17'32.6" E 164°05'22.6"	48 m	<i>Melaleuca quinquenervia</i>	2.13 ± 0.57	25.7 ± 8.7
Poum Silice	Siliceous	Geric Acrisol (Albic)	Silicic bleached soil	S 20°13'38.5" E 164°04'44.5"	14 m	<i>Melaleuca quinquenervia</i> <i>Sannantha</i> sp. <i>Wikstroemia indica</i>	2.21 ± 0.23	17.6 ± 2.0
Serpent	Siliceous	Haplic Cambisol	Thin silty grey-brown soil	S 21°10'27.7" E 164°52'40.5"	75 m	<i>Dodonaea viscosa</i>	1.43 ± 0.19	11.0 ± 0.8
Vertisol	Siliceous	Haplic Vertisol	Black clayey soil	S 21°07'59.8" E 164°54'55.5"	16 m	<i>Melaleuca quinquenervia</i> <i>Wikstroemia indica</i>	6.00 ± 0.71	48 ± 8

Table 2
Soil properties of the nine study sites. Mean values (n = 3) of each element content are expressed in milligram per kilogram of dry matter (mg kg⁻¹ ± standard error). Sites were grouped according to their soil category. Values in bold indicate the most representative parameters of the soils type.

Soil category	Study site	pH	C	N	C/N	P	K	Ca	Mg	Ca/Mg
Metalliferous	Pandanus 2	5.9 ± 0.03	800 ± 100	380 ± 40	2.2 ± 0.5	54 ± 54	149 ± 58	150 ± 20	14,297 ± 4581	0.01 ± 0.002
	Pindai	6.8 ± 0.1	4900 ± 1900	2175 ± 525	2.2 ± 0.4	141 ± 18	1151 ± 135	4635 ± 1135	9100 ± 1407	0.50 ± 0.05
	Tiébaghi	5.4 ± 0.1	1350 ± 250	470 ± 60	2.9 ± 0.2	129 ± 4	89 ± 15	225 ± 15	2107 ± 73	0.11 ± 0.01
Calcareous	Easo	7.7 ± 0.1	9550 ± 650	13,945 ± 1235	0.7 ± 0.01	6727 ± 653	226 ± 57	113,675 ± 29,965	2510 ± 64	45 ± 11
	Wanaham	7.8 ± 0.1	6167 ± 1621	2660 ± 553	2.3 ± 0.2	7549 ± 1650	189 ± 34	83,760 ± 36,098	36,001 ± 15,727	2.33 ± 0.01
Siliceous	Poum Malabou	6.5 ± 0.2	2267 ± 896	1027 ± 226	2.1 ± 0.4	100 ± 16	6104 ± 2263	1020 ± 43	44,445 ± 3558	0.02 ± 0.003
	Poum Silice	4.2 ± 0.03	2800 ± 1667	387 ± 113	6.6 ± 2.1	27 ± 14	27 ± 19	183 ± 53	83 ± 23	2.2 ± 0.5
	Serpent	6.5 ± 0.02	3300 ± 3612	1427 ± 1243	1.8 ± 0.6	431 ± 131	4930 ± 1685	46,780 ± 8397	34,792 ± 4680	1.3 ± 0.9
Vertisol	5.8 ± 0.5	4550 ± 2350	1695 ± 775	2.6 ± 0.2	162 ± 0.2	236 ± 69	6095 ± 285	8171 ± 497	0.75 ± 0.08	
Soil category	Study site	Al	Co	Cr	Fe	Mn	Ni	Si		
Metalliferous	Pandanus 2	13,805 ± 2965	797 ± 404	31,598 ± 8648	327,700 ± 79,890	4783 ± 2272	3970 ± 688	110,525 ± 50,055		
	Pindai	52,405 ± 2125	517 ± 109	19,965 ± 677	261,740 ± 11,460	4453 ± 371	7556 ± 2449	146,415 ± 3025		
	Tiébaghi	45,875 ± 1865	753 ± 39	15,047 ± 1035	508,175 ± 2895	19,328 ± 2118	2650 ± 28	17,695 ± 445		
Calcareous	Easo	60,735 ± 3115	6 ± 2	533 ± 40	52,605 ± 3605	1694 ± 44	26 ± 9	4060 ± 300		
	Wanaham	170,473 ± 34,078	53 ± 11	579 ± 118	61,920 ± 1971	3208 ± 699	59 ± 19	7233 ± 309		
Siliceous	Poum Malabou	67,287 ± 9586	98 ± 11	1509 ± 116	103 ± 69	818 ± 93	1792 ± 105	265,167 ± 14,164		
	Poum Silice	250 ± 57	< 0.01	153 ± 74	62,980 ± 1361	2 ± 0.8	31 ± 11	431,537 ± 8276		
	Serpent	81,020 ± 2416	52 ± 3	359 ± 52	89,865 ± 1425	1178 ± 124	241 ± 59	209,353 ± 6289		
Vertisol	76,800 ± 2240	48 ± 2	344 ± 3	89,865 ± 1425	1008 ± 76	49 ± 2	226,270 ± 530			

mix of 4 *Bradyrhizobium* strains (STM7788, STM7791, STM7802 and STM8919), isolated from *A. spirorbis* nodules on contrasted New Caledonian soils, and grown on a full strength N-free nutrient solution [24] in the greenhouse for three months. In each study site, different % Ndfa were assessed according to (i) each co-occurring reference species sampled and (ii) different scenarios of β values ranging from -1.00 to $+1.00\%$. All %Ndfa values greater than 150% were classified as non-applicable (NA).

2.5. Statistical analyses

All statistical analyses were performed with R software R (Development Core Team 2008), using the “RVAideMemoire” package, version 0.9–54, available at the following link: <http://CRAN.R-project.org/package=RVAideMemoire> and the package “agricolae”, version 1.2–3, available at <http://CRAN.R-project.org/package=agricolae>. Non-parametric tests were used when data did not follow a normal distribution. Correlations between numerical variables were assessed using a non-parametric Spearman's rank correlation test. Non-parametric ANOVA with 1000 permutations were used to evaluate the influence of a given factor (soil category or sampling site) on a numerical variable (soil parameters, N contents, $\delta^{15}\text{N}$ or %Ndfa). When a factor was found to have a significant effect ($P < 0.05$) on a given numerical variable, a Tukey's multiple comparison test was applied at a confidence level of 0.05. A PCA was performed to analyze the distribution of the study sites based on their soil conditions and relationship with nitrogen parameters. When correlation matrices were used, the p values obtained were adjusted using the Bonferroni method [25].

3. Results

3.1. Nitrogen content

The leaf N content of *A. spirorbis* (N_f), averaging 20,178 mg kg⁻¹ for all the study sites combined, varied significantly among sites ($P < 0.01$) from 16,707 mg kg⁻¹ in Serpent to 23,459 mg kg⁻¹ in Vertisol (Table 3). However, N_f did not differ significantly ($P = 0.4$) according to the soil category. The mean N contents of leaves of the seven selected non- N_2 -fixing reference species (N_{nr}) varied significantly according to the species, all sites combined ($P < 0.001$), i.e. from 7877 mg kg⁻¹ in *Sannantha* sp. to 29,954 mg kg⁻¹ in *P. nummularoides* (Table 3). Moreover, significant variations in N_{nr} ($P < 0.001$) were detected among sites for a given species, especially for *W. indica* in which it ranged from 10,861 to 29,600 mg kg⁻¹ in Poum silice and Wanaham, respectively. A two-way ANOVA revealed that on calcareous soils, represented by two sites in which the same reference species were present, leaf N_{nr} differed (i) between species ($P < 0.001$), ranging from 17,790 mg kg⁻¹ for *Scaevola* sp. to 29,954 mg kg⁻¹ for *P. nummularoides*, and (ii) according to the site concerned, with a mean of 28,026 mg kg⁻¹ in Wanaham and 21,148 mg kg⁻¹ in Easo, all reference species combined (Table 3).

3.2. ^{15}N natural abundance

Mean ^{15}N abundance ($\delta^{15}\text{N}_f$) measured in *A. spirorbis* gave a total mean of $+0.07\%$ that varied significantly with the site ($P < 0.001$), although this was only due to the high value ($+3.13\%$) measured in Wanaham (Table 3 and Fig. S2). The $\delta^{15}\text{N}_f$ values of the eight other sites, ranging from -1.04% in Serpent to $+0.50\%$ in Vertisol, did not differ significantly, as they were ranked in the same mean group according to the Tukey mean multiple range test at $P = 0.05$ (Table 3 and Fig. S2).

By contrast, the natural abundance of ^{15}N in the reference species ($\delta^{15}\text{N}_{nr}$) varied significantly according to the species ($P < 0.001$) in each site. In the same way, $\delta^{15}\text{N}_{nr}$ varied among sites ($P < 0.001$) all species combined, ranging from -4.12% in Poum Silice to $+4.07\%$ in

Table 3

Total nitrogen contents^a (in mg.kg⁻¹ ± standard error) and ¹⁵N natural abundances¹ (δ¹⁵N) (in ‰ ± standard error) of the leaves of the reference species (N_{nf} and δ¹⁵N_{nf}) and *A. spirorbis* (N_f and δ¹⁵N_f).

Soil category	Site	Non-N ₂ -fixing reference species			<i>Acacia spirorbis</i>	
		Name	N _{nf}	δ ¹⁵ N _{nf}	N _f	δ ¹⁵ N _f
Metalliferous	Pandanus 2	<i>Dodonaea viscosa</i>	10,323 ± 798	-1.68 ± 0.55	19,540 ± 358 abc	+0.35 ± 0.97 b
		<i>Melaleuca quinquenervia</i>	9690 ± 1330	-1.25 ± 1.05 b'		
		<i>Sannantha</i> sp.	8523 ± 450	-1.15 ± 0.51		
	Pindaï	<i>Dodonaea viscosa</i>	16,571 ± 441	-1.16 ± 0.72	19,338 ± 2328 abc	+0.45 ± 0.79 b
		<i>Melaleuca quinquenervia</i>	8833 ± 1196	+4.43 ± 0.36 a'		
		<i>Wikstroemia indica</i>	18,002 ± 391 c	+1.46 ± 0.22 a		
Calcareous	Tiébaghi	<i>Melaleuca quinquenervia</i>	7478 ± 998	-2.09 ± 0.07 b'	17,821 ± 746 bc	+0.09 ± 0.09 b
		<i>Sannantha</i> sp.	7214 ± 690	-3.28 ± 1.37		
		<i>Morinda citrifolia</i>	20,832 ± 2110	+4.86 ± 1.77		
	Easo	<i>Psychotria nummularoides</i>	25,379 ± 1039	+2.06 ± 0.72	19,111 ± 519 abc	-0.88 ± 0.74 b
		<i>Scaevola</i> sp.	14,836 ± 2283	+2.97 ± 0.59		
		<i>Wikstroemia indica</i>	23,545 ± 2559 b	+2.94 ± 1.18 a		
Siliceous	Wanaham	<i>Morinda citrifolia</i>	26,641 ± 562	+7.05 ± 1.47	22,435 ± 1072 ab	+3.13 ± 0.54 a
		<i>Psychotria nummularoides</i>	34,529 ± 1751	+4.10 ± 0.75		
		<i>Scaevola</i> sp.	20,745 ± 3170	+2.97 ± 0.14		
	Poum Malabou	<i>Wikstroemia indica</i>	29,600 ± 1471 a	+2.28 ± 1.27 a	20,397 ± 1431 abc	+0.21 ± 0.11 b
		<i>Melaleuca quinquenervia</i>	13,377 ± 6528	-1.09 ± 0.22 b'		
		<i>Melaleuca quinquenervia</i>	10,837 ± 3097	-2.71 ± 1.11 b'		
Poum Silice	<i>Sannantha</i> sp.	7894 ± 908	-4.81 ± 0.42	17,943 ± 1552 bc	-0.20 ± 0.83 b	
	<i>Wikstroemia indica</i>	10,861 ± 1204 d	-4.83 ± 0.09 b			
	<i>Dodonaea viscosa</i>	13,558 ± 2775	-3.22 ± 0.03			
Vertisol	Serpent	<i>Dodonaea viscosa</i>	13,558 ± 2775	-3.22 ± 0.03	16,707 ± 1947 c	-1.04 ± 0.42 b
	Vertisol	<i>Melaleuca quinquenervia</i>	13,222 ± 2461	+5.17 ± 0.23 a'	23,459 ± 1623 a	+0.50 ± 0.29 b
		<i>Wikstroemia indica</i>	23,089 ± 1964 bc	+2.97 ± 0.95 a		

Notes: The average of nitrogen content (in mg.kg⁻¹), all study sites combined for *A. spirorbis* is 20,178 ± 2059; *Sannantha* sp.: 7877 ± 535; *P. nummularoides*: 29,954 ± 4575 and *Scaevola*: 17,790 ± 2954. The average of nitrogen content (in mg.kg⁻¹), all reference species combined in Wanaham is 28,026 ± 4990 and 21,148 ± 3847 in Easo.

^a Means ± standard errors were obtained from 3 replicates per soil sample or per plant species in each site.

Vertisol. The δ¹⁵N_{nf} values differed significantly (P < 0.001) among the three main soil categories, all species combined, with calcareous soils presenting significantly higher δ¹⁵N_{nf} values (+3.51‰) than metalliferous (-0.94‰) or siliceous soils (-1.03‰) (Table 3 and Fig. S2).

All the non-N₂-fixing reference species sampled on calcareous soils (in the Easo and Wanaham sites) presented highly positive ¹⁵N abundances, whereas those growing on metalliferous and siliceous soils had negative ¹⁵N abundances except in two sites, Pindaï and Vertisol (Table 3 and Fig. S2).

When only *W. indica* was considered, since it is the only reference species distributed in all soil categories, its ¹⁵N abundance varied significantly with the site (P < 0.001), i.e. from -4.83‰ in Poum Silice, up to +2.97‰ in Vertisol (Table 3 and Fig. S2). *Melaleuca quinquenervia*, which in our study, only occurred on metalliferous and siliceous soils, followed the same trend as *W. indica* in the same sites, namely that their respective ¹⁵N abundances were both positive in Pindaï and Vertisol and negative in Poum Silice, which were considered as two significantly different levels by Tukey's multiple range test (Table 3 and Fig. S2). In the same way, *Sannantha* sp. and *M. quinquenervia* had both negative δ¹⁵N values in the sites where they co-occurred, i.e. in Pandanus 2, Tiébaghi and Poum Silice (Table 3 and Fig. S2).

3.3. Percentage of nitrogen derived from atmosphere (%Nd_f) by *A. spirorbis*

Considering different non-N₂-fixing reference species and an average β value of -0.937‰, the estimation of %Nd_f in *A. spirorbis* reached (i) 95%–144% in six of the nine study sites (Pandanus 2, Tiébaghi, Easo, Poum Malabou, Poum Silice and Serpent), (ii) 40–70% in Pindaï and Vertisol and (iii) a significantly lower %Nd_f in Wanaham with 10% (Table 4). In two sites, the %Nd_f estimated by the formula presented some variations according to the non-N₂-fixing reference and ranged from 42% to 100% in Pindaï and from -26 to 49% in Wanaham (Table 4). In this study, the average β value of *A. spirorbis* had a high

standard error (β = -0.937 ± 0.37‰), so estimations of %Nd_f were strengthened by using simulations of different β values, ranging from -1.00 to +1.00‰ (Table 4). A total of 230 simulations were run. In 192 of them, the %Nd_f did not exceed 150%, and in 135 of them, the %Nd_f estimated for *A. spirorbis* was above 70% (Table 4). In percentage terms, %Nd_f was above 70% in most cases, representing 59% of the total simulations, and 70% of the simulations in which the %Nd_f did not exceed 150%.

3.4. Correlations between nitrogen contents, ¹⁵N abundance and soil properties

Correlations between nitrogen contents, ¹⁵N abundance and soil properties are presented graphically in Fig. 2 and Fig. S3. Spearman correlation tests were used to investigate correlations between N contents and δ¹⁵N of the soil, *A. spirorbis* and the reference species. Neither the N content (N_f) nor the ¹⁵N abundance (δ¹⁵N_f) in *A. spirorbis* was correlated (at P < 0.05) with N_{soil}, N_{nf} or %Nd_f (Table S2). However, N_f and δ¹⁵N_f were positively correlated (r = 0.64 at P < 0.001). In our dataset, no correlations were found between the soil properties and N_f or δ¹⁵N_f (Table S3).

The N contents (N_{nf}) of the reference species were positively correlated with N_{soil} (r = 0.80 at P < 0.01, see Table S2). More importantly, N_{nf} data were positively correlated with their respective δ¹⁵N_{nf} (r = 0.72 at P < 0.001, Table S2 and Fig. S4). Our results presented significant positive correlations between N_{nf} and several soil properties, i.e., pH (r = 0.76 at P < 0.05), C (r = 0.93 at P < 0.001), N (r = 0.92 at P < 0.001), P (r = 0.83 at P < 0.05), Ca (r = 0.88 at P < 0.01) and Al (r = 0.70 at P < 0.05). A positive correlation was also found between δ¹⁵N_{nf} and N_{soil} (r = 0.75 at P < 0.05).

Table 4
 Estimations of *Acacia spirorbis* %Ndfa^a based on data from Table 3. On each site, the %Ndfa was estimated according to the non-N₂-fixing reference species sampled with 9 different β values, ranging from -1.00 to +1.00‰. The β value assessed in this study by greenhouse experiment is -0.937‰. When the %Ndfa was superior to 150%, the Non Applicable (NA) mention was applied.

Soil category	Study site	Reference species	<i>A. spirorbis</i> %Ndfa = f(β)									
			$\beta = -1.00\text{‰}$	$\beta = -0.937\text{‰}$	$\beta = -0.75\text{‰}$	$\beta = -0.50\text{‰}$	$\beta = -0.25\text{‰}$	$\beta = 0.00\text{‰}$	$\beta = +0.25\text{‰}$	$\beta = +0.50\text{‰}$	$\beta = +0.75\text{‰}$	$\beta = +1.00\text{‰}$
Metalliferous	Pandanus 2	<i>D. viscosa</i>	NA	NA	NA	NA	142	121	105	93	84	76
		<i>M. quinquenervia</i>	NA	NA	NA	NA	NA	128	107	91	80	71
	Pindai	<i>Sannantha</i> sp.	NA	NA	NA	NA	NA	130	107	91	79	70
		<i>D. viscosa</i>	NA	NA	NA	NA	NA	139	114	97	84	75
		<i>M. quinquenervia</i>	73	74	77	81	85	90	95	101	108	116
Tiébâghi	<i>W. indica</i>	41	42	46	52	59	69	83	105	142	NA	
	<i>M. quinquenervia</i>	NA	NA	NA	137	118	104	93	84	77	71	
	<i>Sannantha</i> sp.	148	144	133	121	111	103	95	89	84	79	
Calcareous	Easo	<i>M. citrifolia</i>	98	99	102	107	112	118	125	132	140	149
		<i>P. nummularoides</i>	96	98	105	115	127	143	NA	NA	NA	NA
	Wanaham	<i>Scaevola</i> sp.	97	99	103	111	120	130	142	NA	NA	NA
		<i>W. indica</i>	97	99	104	111	120	130	142	NA	NA	NA
		<i>M. citrifolia</i>	49	49	50	52	54	56	58	60	62	65
Siliceous	Poum Malabou Poum Silice	<i>P. nummularoides</i>	19	19	20	21	22	24	25	27	29	31
		<i>Scaevola</i> sp.	-4	-4	-4	-5	-5	-5	-6	-6	-7	-8
	Serpent Vertisol	<i>W. indica</i>	-26	-26	-28	-31	-34	-37	-42	-48	-56	-66
		<i>M. quinquenervia</i>	NA	NA	NA	NA	NA	119	97	82	71	62
		<i>M. quinquenervia</i>	147	142	128	114	102	93	85	78	73	68
Metalliferous	Pindai	<i>Sannantha</i> sp.	121	119	114	107	101	96	91	87	83	79
		<i>W. indica</i>	121	119	113	107	101	96	91	87	83	79
	Serpent Vertisol	<i>D. viscosa</i>	98	95	88	80	73	68	63	59	55	52
		<i>M. quinquenervia</i>	76	76	79	82	86	90	95	100	106	112
		<i>W. indica</i>	62	63	66	71	77	83	91	100	111	125

^a For each site, %Ndfa was calculated according to the mean $\delta^{15}\text{N}$ of the different non-N₂-fixing reference species.

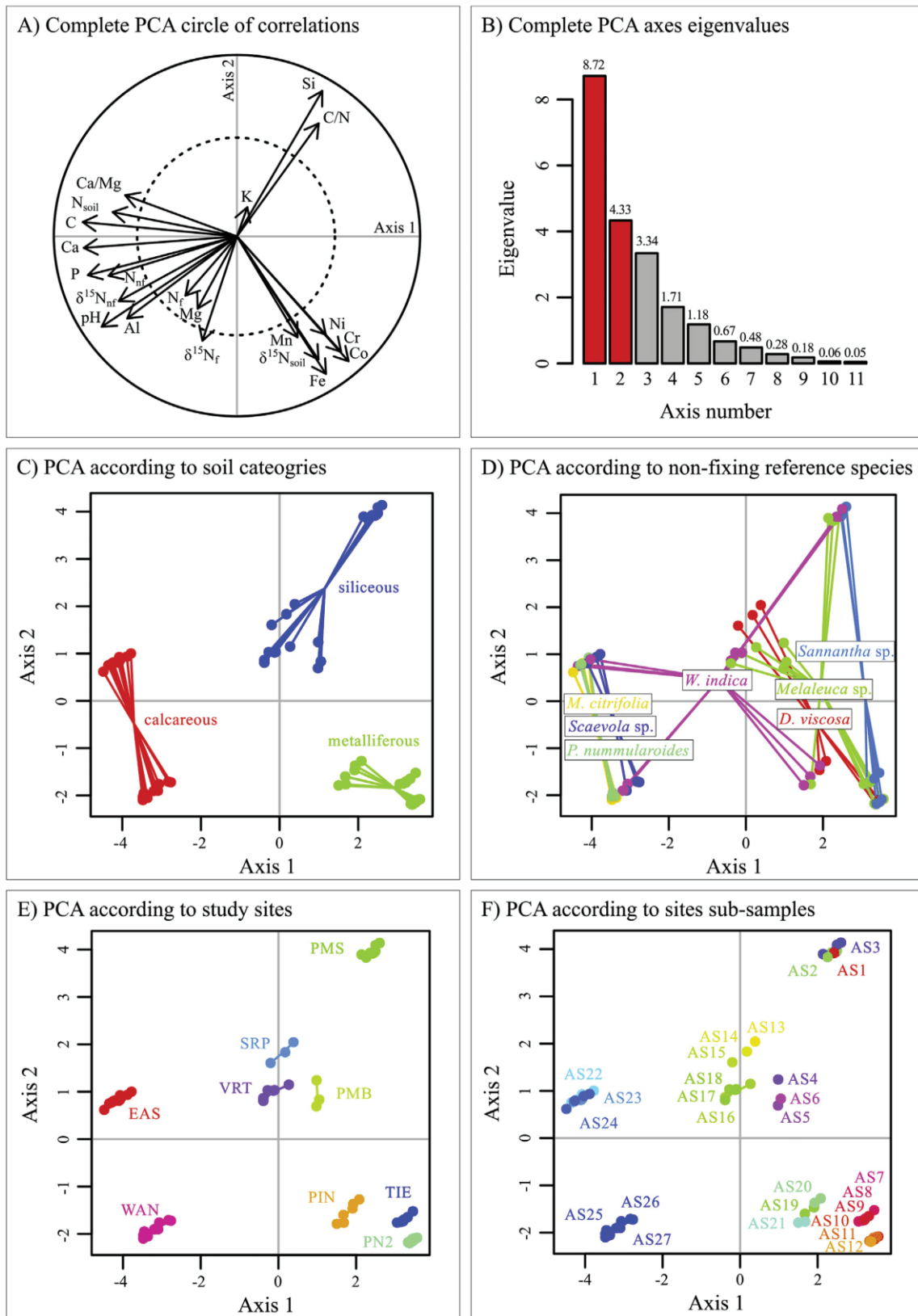


Fig. 2. Complete Principal Component analysis including leaves plant nitrogen for reference species and *A. spirorhis*, with soil parameters. A) Circle of correlation, B) Eigenvalues, C) Distribution of the samples according to the soil categories, D) Non N_2 -fixing reference species, E) Study sites and F) Sub-samples in the sites.

4. Discussion

4.1. Impact of the variation in ^{15}N natural abundance of the non- N_2 -fixing reference species on the accuracy of %Ndfa estimation

It is generally assumed that a significant and minimum difference between $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$ and β value is required to be able to use the ^{15}N natural abundance method in natural ecosystems, especially when information on rooting development and N transformation patterns is lacking. This minimum difference varies according to the author, from 5‰ [26] down to 1‰ when the level of soil heterogeneity is low [27]. Hence, the ^{15}N natural abundance method was poorly applicable in two of our study sites, Pandanus 2 and Poum Malabou, where very slight differences were found between the $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$ and β value, the latter being close to -1.00‰ . Consequently, Ndfa% estimates were abnormally high and above 100% in these sites, since $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$ varied from -2.00‰ to -1.00‰ depending on the non- N_2 -fixing reference species considered (Table 3). By contrast, in the seven other sites studied, where $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$ values were lower than -3.00‰ or higher than $+2.00\text{‰}$, the differences between $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$ and β , and between $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{f}}$, were high enough to provide more reliable estimates of %Ndfa, although higher than 100% in only a few cases (Table 4, where $\beta = -0.937\text{‰}$). However, relatively high variations in %Ndfa estimates were obtained in Pindai and Wanaham depending on the reference species investigated. In Pindai, this could be due to an interaction between the soil heterogeneity and the specific signature of the reference species, since $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$ varied from -1.16‰ to $+4.45\text{‰}$. In Wanaham, this is explained by the outstandingly high $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$ ($+7.05\text{‰}$) measured in *M. citrifolia* that overestimated the %Ndfa (49%) compared to lower and more reliable $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$ values measured in the three other reference species investigated in the same site (Table 3). The β value ($\beta = -0.937\text{‰}$) obtained in our study was measured in young *A. spirorbis* seedlings grown experimentally under 100% N_2 -fixation conditions. However, with slightly positive values of $\delta^{15}\text{N}_{\text{f}}$ (ranging from 0 to $+0.50\text{‰}$) observed in *A. spirorbis* across several sites, our calculated β value ($\beta = -0.937\text{‰}$) can be considered as lower than expected. Even though this β value can be affected by various biotic (e.g. rhizobial strains, plant development stage) and abiotic factors (e.g. the origin of the substrate), as confirmed by several studies (reviewed by Boddey et al. [28]), our simulation based on the use of a range of theoretical β values (Table 4) did not drastically change the %Ndfa estimates and the interpretation of our results, except sites with $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$ values close to -1.00‰ like Pandanus 2 and Poum Malabou.

The choice of the non- N_2 -fixing reference species is also crucial for %Ndfa determination using the ^{15}N natural abundance method and many authors have discussed the different factors involved in variations in $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$ within and between plant species [26,28]. In our study, while the differences between reference species in each site were quite high in most of the sites investigated, the intraspecific variation of $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$ in each site remained quite low in each of the different species investigated (Table 3). This relatively low spatial heterogeneity in $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$, observed at a distance of at least 50 m between the collected *A. spirorbis* and their neighbouring reference trees, validates our sampling method based on the collection of all the leaves on each tree applied to three groups of trees per site. Even though, by contrast, the variation in $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$ between plant species in each site was quite high, and very high across the different study sites for a given species, some specific trends were detected in the most common companion species investigated. Hence, *M. quinquenervia* always had significantly higher $\delta^{15}\text{N}$ values than those measured in *W. indica* in all the sites where both species were present (Pindai, Poum Silice and Vertisol) and higher than *Sannantha* sp. (in Tiébaghi and Poum Silice but not in the particular case of Pandanus 2), while *Sannantha* sp. had very similar values to *W. indica* in Poum Silice, where both species were present. These interspecific differences could be due to different sources of available soil N assimilated by each species, to their different root architectures or to their

mycorrhizal status, which has already been demonstrated and extensively discussed [26,29,30]. Several authors have thus recommended using reference species that have the same mycorrhizal status as that of the legume species under study to estimate N_2 -fixation using ^{15}N abundance. In New Caledonia, *M. quinquenervia* and *Sannantha* sp., which both belong to the Myrtaceae family, have been described as ectomycorrhizal species, as has *A. spirorbis* [31], these three woody species being systematically associated with ectomycorrhizal fungi in natural conditions, as also observed across all the sites used in the present study (personal observation by the author). However, when the reference species were ranked based on their $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$ values as cited above, our study revealed no relationship between the $\delta^{15}\text{N}$ value of the different reference species investigated and their ectomycorrhizal status. Non- N_2 -fixing tree species associated with ectomycorrhiza generally have a higher foliar $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$ than species associated with arbuscular mycorrhiza [32], which was the case for the ectomycorrhizal *M. quinquenervia* but not for *Sannantha* sp compared to non-ectomycorrhizal species like *W. indica* and even other species investigated across the different sites.

Nevertheless, as the difference between $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{f}}$ values was generally high while $\delta^{15}\text{N}_{\text{f}}$ varied from -1.00 to $+1.00\text{‰}$ in most of the sites studied, the intra-specific variation of $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$ did not have a significant effect on the estimation of %Ndfa in *A. spirorbis* in most of the study sites where several non- N_2 -fixing reference species occurred in the same site. Indeed, the values of %Ndfa were above 70% in many simulations, in eight out of nine sites, regardless of the seven reference species analyzed.

The main originality of this study is the range of variation covered by the $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$ value, varying from highly negative to highly positive depending on the site investigated. Based on the literature and on review articles, a large majority of the studies performed on the estimation of N_2 -fixation by legume trees in natural ecosystems have reported positive $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$ values, whatever the non- N_2 -fixing reference species considered [28,33]. By contrast, very few studies have attempted to evaluate N_2 -fixation based on $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$ negative values [30,34–36]. Furthermore, to our knowledge, no estimation of %Ndfa using the ^{15}N natural abundance method based on the use of such extreme negative and positive $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$ values has been reported for any legume species so far. This is probably due to the exceptional adaptation of *A. spirorbis* to the extreme variety of soils found in New Caledonia, which grows beside other ubiquitous companion species, like *M. quinquenervia* and *W. indica*, the only species among the reference non- N_2 -fixing ones that displayed both positive and negative $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$ values in all the different sites used in this study.

Like in other studies performed in Australia [28], we did not find any correlation between the $\delta^{15}\text{N}_{\text{soil}}$, that was positive in all the study sites, and $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$ of the reference species that ranged from very negative to highly positive values depending on the study site. Since the $\delta^{15}\text{N}$ of the reference plant species should reflect that of the available soil N source, this suggests that the $\delta^{15}\text{N}_{\text{soil}}$ positive values correspond to that of the dominant N not available from soil organic matter. It is known that total N in undisturbed soils under long-established ecosystems, like those in New Caledonia, are generally enriched in ^{15}N while that of the plant-available soil N and hence $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$ may be lower in ^{15}N abundance, sometimes reaching negative values [28,37,38].

As it was impossible to sample the whole trees in our study, the estimation of %Ndfa in *A. spirorbis* could be biased, as it was only based on leaf $\delta^{15}\text{N}$ values. However, while variations in ^{15}N abundance in the different parts of trees have been reported in several studies due to internal recycling of plant N and translocation [28,39]), comparisons between N_2 estimations based on $\delta^{15}\text{N}$ of entire trees vs. that of leaves, revealed similar proportions of N derived from N_2 -fixation [28,40]. Indeed, in the study conducted by Bouillet et al. [40], the low contribution of wood and twigs to total $\delta^{15}\text{N}$ in the whole tree supports extrapolation from leaves. However, further investigations on whole trees are needed to validate this extrapolation in *A. spirorbis*.

4.2. *In situ* N₂-fixing potential of *Acacia spirorbis* versus other legume tree species

Although leaf N concentrations varied significantly among the sampling sites and soil types in both *A. spirorbis* and the non-N₂-fixing reference species, its range of variation was much narrower in *A. spirorbis* species than in the reference species, with standard errors reaching 10% in *A. spirorbis* ($20,178 \pm 2011 \text{ mg g}^{-1}$) vs. 29% in *M. quinque-neria* ($10,007 \pm 2853 \text{ mg g}^{-1}$) and 32% in *W. indica* ($21,263 \pm 6905 \text{ mg g}^{-1}$) (Table 3 and Table S2). This is probably due to the compensatory effect of the high *in situ* level of N₂-fixation found in *A. spirorbis* in all the different study sites while the non-N₂-fixing reference species are more subject to soil nitrogen deficiency. This phenomenon has already been observed in a study performed on mixed plantations of *Acacia mangium* Willd. with *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake [41] where leaf N content in *A. mangium* did not vary between blocks along a soil fertility gradient while that of interplanted eucalypts did vary with soil N content. While the natural ¹⁵N abundance in the non-N₂-fixing reference species ($\delta^{15}\text{N}_{\text{nr}}$) varied from highly negative to highly positive in the sites investigated, that of *A. spirorbis* ($\delta^{15}\text{N}_i$) was close to 0 in the same sites, thereby underlining the outstandingly high *in situ* N₂-fixing potential of this legume tree species whatever the soil type. Among other *Acacia* species and even other tree legume species studied, *A. spirorbis* is one of the species with the highest N₂-fixing potential. Estimation of %Ndfa using the ¹⁵N natural abundance method in *Acacia* spp. and other Mimosoideae species in studies reviewed by Andrews et al. [42] showed that in natural ecosystems, the average %Ndfa of nine *Acacia* spp. growing in arid zones of Namibia was 29% [43] while it was 21% in seven *Mimosa* species from Brazilian savannahs [44]. Another study reported that a 2-year plantation of *Acacia mangium*, a fast-growing Australasian *Acacia* species originating from humid zones that was grown in silvicultural conditions and inoculated with *Bradyrhizobium* strains in Ivory Coast, biologically fixed an average of 50% of its total N [41]. Two Australian *Acacia* species, *Acacia melanoxylon* R. Br. and *Acacia mucronata* Wendl., symbiotically fixed about 43% and 48% of their N as assessed by the ¹⁵N enrichment method [45]. Other studies performed in arid zones reported that *Acacia senegal* (syn. *Senegalia senegal*) had %Ndfa values reaching 39% under natural conditions in Sudan [46,47] versus 30% in the Australian *Acacia holosericea* G. Don throughout Senegal [48]. Beyond *Acacia* species, our results show that *in situ* N₂-fixation was also much higher in *A. spirorbis* than in many other tree legumes. In a review article by Nygren et al. [49], which cited 38 N₂-fixing tree species mentioned in different studies, the average %Ndfa was $59 \pm 17\%$. Other examples of moderate N₂-fixation rates have also been reported for *Calliandra calothyrsus*, where an average of 58% of its N derived from fixation in field conditions [50]. In the same way, moderate %Ndfa values (50%) were reported in *Pericopsis mooniana* [51] while, like *A. spirorbis*, it is one of the rare legume species other than *Acacia* spp. with a dual N₂-fixing and ectomycorrhizal symbiotic status [52].

Further evidence for the high N₂-fixing potential of *A. spirorbis* compared to other tree legumes species was found in the Vertisol site where the exotic *Leucaena leucocephala* also grows. The $\delta^{15}\text{N}$ measured in *L. leucocephala*, which varied from +1.33 to +8.36‰ depending on the tree sampled (data not shown), was not significantly different from that of the different reference species found in the same site, i.e. +2.97 and +5.17‰ for *W. indica* and *Melaleuca* sp. respectively, while that of *A. spirorbis* was +0.50‰. Although the widespread and overexploited agroforestry species *Leucaena leucocephala* is known for its high N₂-fixing potential in various ecosystems throughout the world [53,54], its estimated %Ndfa is about nil in this study site, showing that *A. spirorbis* is very well adapted to harsh soil conditions like those found in New Caledonia.

Aside from *A. spirorbis*, only non-legume actinorhizal N₂-fixing tree species like *Alnus glutinosa* and *Alnus incana* in temperate ecosystems have been shown to have such high estimated %Ndfa, which can reach

95% [35,55,56]. Like *A. spirorbis*, these *Alnus* species are able to form a tripartite association with N₂-fixing bacteria (*Frankia* in this case), arbuscular and ectomycorrhizal fungi. However, in *Casuarina equisetifolia*, an actinorhizal tree species that has the same tripartite symbiosis as *Alnus* spp., only 40% of its nitrogen was reported to derive from N₂-fixation under forest plantation conditions in Senegal [57].

4.3. N₂-fixation by *Acacia spirorbis* is effective under contrasted soil conditions

In the rhizobium-legume symbiosis, the physiological state of the host plant may be affected by harsh conditions such as salt stress, extreme pH, lack of nutrients, mineral toxicity, extreme temperatures, insufficient or excess soil moisture and plant diseases that affect N₂-fixation [58]. The same phenomenon has been reported in the case of rhizobial symbionts and nodules: they are sensitive to photosynthate deprivation, water stress, salinity, soil nitrates, temperature, heavy metals and biocides [59]. Most N₂-fixing plants require a neutral or slightly acidic soil for growth, especially when they depend on N₂-fixation [60,61]. Although we expected that the N₂-fixing potential of *A. spirorbis* would be influenced by extreme soil conditions in our study, in fact, it did not vary in the variety of metalliferous, calcareous and siliceous soils found in New Caledonia. The maximum rates of N₂-fixation estimated for *A. spirorbis* in such contrasted soils suggest that both the host plant species and its rhizobial symbionts are fully adapted to these different types of soil. Many studies have shown that the soil microbial diversity is affected by soil conditions. For example, a study by Chodak et al. [62] suggests that pH and heavy metal pollution affect soil bacterial diversity. Similar results were reported by Sheik et al. [63] for Cr contents. In New Caledonia, Amir and Pineau [64] demonstrated that metal toxicity and the presence of organic matter in ultramafic soils influenced the number and activity of microorganisms. Consequently, as we would expect the rhizobial diversity associated with *A. spirorbis* to differ in contrasted soil types, further investigations are needed to be sure that the different rhizobial taxa involved have similar high N₂-fixing efficiencies under *in situ* conditions.

Exceptionally, a dramatic reduction in the N₂-fixation rate in *A. spirorbis* was observed in Wanaham. This gibbsic ferralsol has the highest Al content ($197,125 \text{ mg kg}^{-1}$) of all the study sites (Table S1). Previous studies reported that high Al contents may inhibit the growth of fast- and slow-growing rhizobia, thus negatively affecting N₂-fixation by plants [65,66]. However, this low level of N₂-fixation by *A. spirorbis* in Wanaham did not have any impact on its N content. In this site, *A. spirorbis* N content was one of the highest among the nine sites investigated in the same way as the N_{nr} contents of the neighbouring non-N₂-fixing reference species in the same site. Rather than aluminium toxicity towards N₂-fixation, this suggests that high concentrations of available soil N contained in the calcareous soil of Wanaham inhibit N₂-fixation while promoting N assimilation.

Beyond its role under harsh soil conditions, N₂-fixation is of major importance after forest fires, especially in young legume trees or shrubs [67], since a high proportion of the soil N is volatilized. In New Caledonia, forest fires are a major threat [7] and field observations showed that *A. spirorbis* is one of the most widely spread pioneer species due to its high sprouting ability after such events. The high N₂-fixing potential of *A. spirorbis* in natural conditions implies that this plant species re-introduces N to the soil through N₂-fixation, which is beneficial in early post-fire ecosystems [68].

5. Conclusions

Acacia spirorbis, a species native to New Caledonia, has the rare ability to grow on very contrasted soils. Our data showed that N₂-fixation by *A. spirorbis* was very effective in natural conditions with an average of %Ndfa that reached 80%, which is one of the highest rates recorded in the genus *Acacia*. Moreover, N₂-fixation by *A. spirorbis* is

also very effective in highly contrasted metalliferous, calcareous and siliceous soils. Considering that its associated rhizobial bacteria could be affected by soil conditions, the diversity and metal tolerance of these N_2 -fixing bacteria in the different types of soil require further investigation. This legume is able to form a tripartite symbiosis with arbuscular fungi, ectomycorrhizas and rhizobia [18]. The present study focused on N_2 -fixing interactions, but the other symbioses may be involved in the ability of *A. spirorbis* to adapt to contrasted soils. This tripartite symbiosis could be exploited to improve the introduction of this tree species in the framework of ongoing rehabilitation programs of ex-mining tailings in New Caledonia.

Acknowledgements

This work was supported by the French National Agency for Research (ANR) financial support through the BIOADAPT Program 2012 [grant number ANR-12-ADAP-0017 ADASPIR]. We would like to thank D. Utramadra for his invaluable support during the collection of biological samples on Lifou island.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2018.03.003>.

References

- [1] J. Bonvallot, J.-C. Gay, E. Habert, Atlas de la Nouvelle-Calédonie, IRD Editions, Institut de Recherche pour le Développement, Marseille, 2012.
- [2] B. Pelletier, Geology of the New Caledonia region and its implications for the study of the New Caledonian biodiversity, in: C. Payri, B. Richer de Forges, F. Colin (Eds.), Compend. Mar. Species New Caledonia Second Ed, IRD, Nouméa, 2006, pp. 19–32.
- [3] M. Latham, Altération et pédogenèse sur roches ultrabasiques en Nouvelle-Calédonie : genèse et évolution des accumulations de fer et de silice en relation avec la formation du modelé, ORSTOM, 1986.
- [4] T. Jaffré, The relationship between ecological diversity and floristic diversity in New Caledonia, Biodivers. Lett. 1 (1993) 82–87.
- [5] P. Morat, T. Jaffré, F. Tronchet, J. Munzinger, Y. Pillon, J.M. Veillon, M. Chalopin, P. Birnbaum, F. Rigault, G. Dagostini, J. Tinél, P.P. Lowry II, The taxonomic reference base Florical and characteristics of the native vascular flora of New Caledonia, Adansonia 34 (2012) 179–221.
- [6] S. Isnard, L. L'huillier, F. Rigault, T. Jaffré, How did the ultramafic soils shape the flora of the New Caledonian hotspot? Plant Soil (2016) 1–24.
- [7] T. Jaffré, J. Munzinger, P.P. Lowry, Threats to the conifer species found on New Caledonia's ultramafic massifs and proposals for urgently needed measures to improve their protection, Biodivers. Conserv. 19 (2010) 1485–1502.
- [8] G. Losfeld, L. L'huillier, B. Fogliani, T. Jaffré, C. Grison, Mining in New Caledonia: environmental stakes and restoration opportunities, Environ. Sci. Pollut. Res. 22 (2014) 5592–5607.
- [9] C. Marchese, Biodiversity hotspots: a shortcut for a more complicated concept, Glob. Ecol. Conserv. 3 (2015) 297–309.
- [10] N. Myers, R.A. Mittermeier, C.G. Mittermeier, G.A.B. da Fonseca, J. Kent, Biodiversity hotspots for conservation priorities, Nature 403 (2000) 853–858.
- [11] J.M. Sarrailh, La revégétalisation des exploitations minières : l'exemple de la Nouvelle-Calédonie, Bois For. Trop. (2002) 21–31.
- [12] N. Azani, M. Babineau, C.D. Bailey, H. Banks, A.R. Barbosa, R.B. Pinto, J.S. Boatwright, L.M. Borges, G.K. Brown, A. Bruneau, E. Candido, D. Cardoso, K.-F. Chung, R.P. Clark, A. de S. Conceição, M. Crisp, P. Cubas, A. Delgado-Salinas, K.G. Dexter, J.J. Doyle, J. Duminil, A.N. Egan, M. De La Estrella, M.J. Falcão, D.A. Filatov, A.P. Fortuna-Perez, R.H. Fortunato, E. Gagnon, P. Gasson, J.G. Rando, A.M.G. de Azevedo Tozzi, B. Gunn, D. Harris, E. Haston, J.A. Hawkins, P.S. Herendeen, C.E. Hughes, J.R.V. Iganci, F. Javadi, S.A. Kanu, S. Kazempour-Osaloo, G.C. Kite, B.B. Klitgaard, F.J. Kochanovski, E.J.M. Koenen, L. Kovar, M. Lavin, M. le Roux, G.P. Lewis, H.C. de Lima, M.C. López-Roberts, B. Mackinder, V.H. Maia, V. Malécot, V.F. Mansano, B. Marazzi, S. Mattapha, J.T. Miller, C. Mitsuyuki, T. Moura, D.J. Murphy, M. Nageswara-Rao, B. Nevado, D. Neves, D.I. Ojeda, R.T. Pennington, D.E. Prado, G. Prenner, L.P. de Queiroz, G. Ramos, F.L. Ranzato Filardi, P.G. Ribeiro, M. de L. Rico-Arce, M.J. Sanderson, J. Santos-Silva, W.M.B. São-Mateus, M.J.S. Silva, M.F. Simon, C. Sinou, C. Snak, É.R. de Souza, J. Sprent, K.P. Steele, J.E. Steier, R. Steeves, C.H. Stirton, S. Tagane, B.M. Torke, H. Toyama, D.T. da Cruz, M. Vatanparast, J.J. Wieringa, M. Wink, M.F. Wojciechowski, T. Yahara, T. Yi, E. Zimmerman, A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny the Legume Phylogeny Working Group (LPWG), Taxon 66 (2017) 44–77.
- [13] G.K. Brown, D.J. Murphy, J. Kidman, P.Y. Ladiges, Phylogenetic connections of phyllodinous species of *Acacia* outside Australia are explained by geological history and human-mediated dispersal, Aust. Syst. Bot. 25 (2012) 390–403.
- [14] D.M. Richardson, J. Carruthers, C. Hui, F.A.C. Impson, J.T. Miller, M.P. Robertson, M. Rouget, J.J. Le Roux, J.R.U. Wilson, Human-mediated introductions of Australian acacias – a global experiment in biogeography, Divers. Distrib. 17 (2011) 771–787.
- [15] D.C. Le Maitre, M. Gaertner, E. Marchante, E.J. Ens, P.M. Holmes, A. Pauchard, P.J. O'Farrell, A.M. Rogers, R. Blanchard, J. Blignaut, D.M. Richardson, Impacts of invasive Australian acacias: implications for management and restoration, Divers. Distrib. 17 (2011) 1015–1029.
- [16] J.T. Miller, D.J. Murphy, G.K. Brown, D.M. Richardson, C.E. González-Orozco, The evolution and phylogenetic placement of invasive Australian *Acacia* species, Divers. Distrib. 17 (2011) 848–860.
- [17] D.M. Richardson, J.J. Le Roux, J.R.U. Wilson, Australian acacias as invasive species: lessons to be learnt from regions with long planting histories, South. For. 77 (2015) 31–39.
- [18] M. Ducouso, A. Galiana, A. Houllès, Y. Prin, L. Hannibal, P. Jourand, A. Klonowska, F. Carriconde, E. Fritsch, F. Juillot, H. Amir, *Acacia spirorbis* a model plant to study the contribution of symbiotic root microorganisms in plant adaptation to soil constraints: news and prospects, Acacia 2014 "Sustaining the Future of Acacia Plantation Forestry" - Hue - Viet Nam, 2014.
- [19] C. Grangeteau, M. Ducouso, E. Fritsch, F. Juillot, P. Jourand, S. Acherar, M. Lebrun, A. Klonowska, Diversity of nitrogen fixing bacteria associated to the New Caledonian ubiquitous tree *Acacia spirorbis*, Soil Management as a Determinant of Microbial Diversity and Function, European Geoscience Union, General assembly, Vienna - Austria, 2012, p. 4892.
- [20] C. van Kessel, J.P. Roskoski, Nodulation and N_2 fixation by *Inga jinicuil*, a woody legume in coffee plantations, Plant Soil 59 (1981).
- [21] N. Perrier, H. Amir, F. Colin, Occurrence of mycorrhizal symbioses in the metal-rich lateritic soils of the Koniombo Massif, New Caledonia, Mycorrhiza 16 (2006).
- [22] A.J. Cantelmo, S.R. Kaufman, J. Hartman, Mycorrhizal and nitrogen-fixer associations with *Casuarina* spp. and mycorrhizal associations with *Melaleuca quinquenervia* in Everglades National Park, Fla. Sci. 63 (2000) 160–166.
- [23] G. Shearer, D. Kohl, N_2 -fixation in field settings: estimations based on natural ^{15}N abundance, Funct. Plant Biol. 13 (1986) 699–756.
- [24] W.J. Broughton, M.J. Dilworth, Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans, Biochem. J. 125 (1971) 1075–1080.
- [25] J.M. Bland, D.G. Altman, Multiple significance tests: the Bonferroni method, BMJ 310 (1995) 170.
- [26] P. Högberg, Tansley Review No. 95 ^{15}N natural abundance in soil-plant systems, New Phytol. 137 (1997) 179–203.
- [27] M.S. Watt, P.W. Clinton, D. Whitehead, B. Richardson, E.G. Mason, A.C. Leckie, Above-ground biomass accumulation and nitrogen fixation of broom (*Cytisus scoparius* L.) growing with juvenile *Pinus radiata* on a dryland site, For. Ecol. Manag. 184 (2003) 93–104.
- [28] R.M. Boddey, M.B. Peoples, B. Palmer, P.J. Dart, Use of the ^{15}N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials, Nutrient Cycl. Agroecosyst. 57 (2000) 235–270.
- [29] P. Högberg, I.J. Alexander, Roles of root symbioses in African woodland and forest: evidence from $\delta^{15}N$ abundance and foliar analysis, J. Ecol. 83 (1995) 217–224.
- [30] A.C. Spriggs, W.D. Stock, F.D. Dakora, Influence of mycorrhizal associations on foliar $\delta^{15}N$ values of legume and non-legume shrubs and trees in the fynbos of South Africa: implications for estimating N_2 fixation using the ^{15}N natural abundance method, Plant Soil 255 (2003) 495–502.
- [31] P. Jourand, L. Hannibal, C. Majorel, S. Mengant, M. Ducouso, M. Lebrun, Ectomycorrhizal *Pisolithus albus* inoculation of *Acacia spirorbis* and *Eucalyptus globulus* grown in ultramafic topsoil enhances plant growth and mineral nutrition while limits metal uptake, J. Plant Physiol. 171 (2014) 164–172.
- [32] P. Högberg, ^{15}N natural abundance as a possible marker of the ectomycorrhizal habit of trees in mixed African woodlands, New Phytol. 115 (1990) 483–486.
- [33] P.M. Chalk, C.T. Inácio, F.C. Balieiro, J.R.C. Rouws, Do techniques based on ^{15}N enrichment and ^{15}N natural abundance give consistent estimates of the symbiotic dependence of N_2 -fixing plants? Plant Soil 399 (2016) 415–426.
- [34] L. Augusto, N. Crampon, E. Saur, M.R. Bakker, S. Pellerin, C. de Lavaissière, P. Trichet, High rates of nitrogen fixation of *Ulex* species in the understory of maritime pine stands and the potential effect of phosphorus fertilization, Can. J. For. Res. 35 (2005) 1183–1192.
- [35] A.M. Domenach, F. Kurdali, R. Bardin, Estimation of symbiotic dinitrogen fixation in alder forest by the method based on natural ^{15}N abundance, Plant Soil 118 (1989) 51–59.
- [36] S.H. Bai, F. Sun, Z. Xu, T.J. Blumfield, C. Chen, C. Wild, Appraisal of ^{15}N enrichment and ^{15}N natural abundance methods for estimating N_2 fixation by understory *Acacia leucalyx* and *A. disparimma* in a native forest of subtropical Australia, J. Soils Sediments 12 (2012) 653–662.
- [37] G. Gebauer, E.-D. Schulze, Carbon and nitrogen isotope ratios in different compartments of a healthy and a declining *Picea abies* forest in the Fichtelgebirge, NE Bavaria, Oecologia 87 (1991) 198–207.
- [38] C. Wang, X. Wang, D. Liu, H. Wu, X. Lü, Y. Fang, W. Cheng, W. Luo, P. Jiang, J. Shi, H. Yin, J. Zhou, X. Han, E. Bai, Aridity threshold in controlling ecosystem nitrogen cycling in arid and semi-arid grasslands, Nat. Commun. 5 (2014) 4799.
- [39] J.K. Ladha, D.P. Garrity, M.B. Peoples, V.T. Capuno, P.J. Dart, Estimating dinitrogen fixation of hedgerow vegetation using the nitrogen-15 natural abundance method, Soil Sci. Soc. Am. J. 57 (1993) 732–737.
- [40] J.P. Bouillet, J.P. Laclau, J.L.M. Goncalves, M. Moreira, P.C.O. Trivelin, C. Jourdan, E.V. Silva, M.C. Piccolo, S.M. Tsai, A. Galiana, Mixed-species plantations of *Acacia mangium* and *Eucalyptus grandis* in Brazil - 2: nitrogen accumulation in the stands and biological $N(2)$ fixation, For. Ecol. Manag. 255 (2008) 3918–3930.
- [41] A. Galiana, P. Balle, A. N'Guessan Kanga, A.M. Domenach, Nitrogen fixation

- estimated by the ^{15}N natural abundance method in *Acacia mangium* Willd. inoculated with *Bradyrhizobium* sp. and grown in silvicultural conditions, *Soil Biol. Biochem.* 34 (2002) 251–262.
- [42] M. Andrews, E.K. James, J.I. Sprent, R.M. Boddey, E. Gross, F.B. dos R. Jr, Nitrogen fixation in legumes and actinorhizal plants in natural ecosystems: values obtained using ^{15}N natural abundance, *Plant Ecol. Divers* 4 (2011) 131–140.
- [43] E.-D. Schulze, G. Gebauer, H. Ziegler, O.L. Lange, Estimates of nitrogen fixation by trees on an aridity gradient in Namibia, *Oecologia* 88 (1991) 451–455.
- [44] F.B. dos Reis, M.F. Simon, E. Gross, R.M. Boddey, G.N. Elliott, N.E. Neto, M. de F. Loureiro, L.P. de Queiroz, M.R. Scotti, W.-M. Chen, A. Norén, M.C. Rubio, S.M. de Faria, C. Bontemps, S.R. Goi, J.P.W. Young, J.I. Sprent, E.K. James, Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil, *New Phytol.* 186 (2010) 934–946.
- [45] S.D. Hamilton, P. Hoppmans, P.M. Chalk, C.J. Smith, Field estimation of N_2 fixation by *Acacia* spp. using ^{15}N isotope dilution and labelling with ^{15}S , *For. Ecol. Manag.* 56 (1993) 297–313.
- [46] M.E. Isaac, J.-M. Harmand, D. Lesueur, J. Lelon, Tree age and soil phosphorus conditions influence N_2 -fixation rates and soil N dynamics in natural populations of *Acacia senegal*, *For. Ecol. Manag.* 261 (2011) 582–588.
- [47] E.A.Y. Raddad, A.A. Salih, M.A.E. Fadl, V. Kaarakka, O. Luukkanen, Symbiotic nitrogen fixation in eight *Acacia Senegal* provenances in dryland clays of the Blue Nile Sudan estimated by the ^{15}N natural abundance method, *Plant Soil* 275 (2005) 261–269.
- [48] M. Ndiaye, F. Ganry, Variation in the biological N_2 fixation by tree legumes in three ecological zones from the north to the south of Senegal, *Arid Soil Res. Rehabil.* 11 (1997) 245–254.
- [49] P. Nygren, M.P. Fernández, J.-M. Harmand, H.A. Leblanc, Symbiotic dinitrogen fixation by trees: an underestimated resource in agroforestry systems? *Nutrient Cycl. Agroecosyst.* 94 (2012) 123–160.
- [50] D. Lesueur, A. Sarr, Effects of single and dual inoculation with selected micro-symbionts (rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi) on field growth and nitrogen fixation of *Calliandra calothyrsus* Meissn, *Agrofor. Syst.* 73 (2008) 37–45.
- [51] T.I.L. Wijesundara, L.H.J.V. Holm, S.A. Kulasooriya, Rhizobiology and nitrogen fixation of some tree legumes native to Sri Lanka, *Biol. Fertil. Soils* 30 (2000) 535–543.
- [52] P. Högberg, G.D. Pearce, Mycorrhizas in zambian trees in relation to host taxonomy, vegetation type and successional patterns, *J. Ecol.* 74 (1986) 775–785.
- [53] J.A. Parrotta, D.D. Baker, M. Fried, Estimation of Nitrogen Fixation in *Leucaena Leucocephala* Using ^{15}N -enrichment Methodologies, *Advances in Legume Systematics*, 5: the Nitrogen Factor (Book), (1994).
- [54] N. Sanginga, S.K.A. Danso, F. Zapata, Field measurements of nitrogen fixation in leguminous trees used in agroforestry systems: influence of ^{15}N -labeling approaches and reference trees, *Biol. Fertil. Soils* 23 (1996) 26–32.
- [55] H. Beaupied, A. Moiroud, A.-M. Domenach, F. Kurdali, R. Lensi, Ratio of fixed and assimilated nitrogen in a black alder (*Alnus glutinosa*) stand, *Can. J. For. Res.* 20 (1990) 1116–1119.
- [56] T.M. Hurd, D.J. Raynal, C.R. Schwintzer, Symbiotic N_2 fixation of *Alnus incana* spp. rugosa in shrub wetlands of the Adirondack mountains, New York, USA, *Oecologia* 126 (2001) 94–103.
- [57] A. Mariotti, B. Sougoufara, Y.R. Dommergues, Estimation de la fixation d'azote atmosphérique par le traçage isotopique naturel dans une plantation de *Casuarina equisetifolia* (forst), *Soil Biol. Biochem.* 24 (1992) 647–653.
- [58] H.H. Zahran, *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63 (1999) 968–989.
- [59] K.B. Walsh, Physiology of the legume nodule and its response to stress, *Soil Biol. Biochem.* 27 (1995) 637–655.
- [60] L.M. Bordeleau, D. Prévost, Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments, *Plant Soil* 161 (1994) 115–125.
- [61] J. Brockwell, A. Pilka, R.A. Holliday, J. Brockwell, A. Pilka, R.A. Holliday, Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils in central New South Wales, *Anim. Prod. Sci.* 31 (1991) 211–219.
- [62] M. Chodak, M. Gołębiewski, J. Morawska-Płoskonka, K. Kuduk, M. Niklińska, Diversity of microorganisms from forest soils differently polluted with heavy metals, *Appl. Soil Ecol.* 64 (2013) 7–14.
- [63] C.S. Sheik, T.W. Mitchell, F.Z. Rizvi, Y. Rehman, M. Faisal, S. Hasnain, M.J. McInerney, L.R. Krumholz, Exposure of soil microbial communities to chromium and arsenic alters their diversity and structure, *PLoS One* 7 (2012) e40059.
- [64] H. Amir, R. Pineau, Influence of plants and cropping on microbiological characteristics of some New Caledonian ultramafic soils, *Aust. J. Soil Res.* 36 (1998) 457–471.
- [65] N.K. Arora, E. Khare, S. Singh, D.K. Maheshwari, Effect of Al and heavy metals on enzymes of nitrogen metabolism of fast and slow growing rhizobia under *ex planta* conditions, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26 (2009) 811–816.
- [66] A.B. Mendoza-Soto, L. Naya, A. Leija, G. Hernández, Responses of symbiotic nitrogen-fixing common bean to aluminum toxicity and delineation of nodule responsive microRNAs, *Front. Plant Sci.* 6 (2015) 587.
- [67] F.J. Hingston, N. Malajczuk, T.S. Grove, Acetylene reduction (N_2 -Fixation) by Jarrah forest legumes following fire and phosphate application, *J. Appl. Ecol.* 19 (1982) 631–645.
- [68] J.A. Newland, T.H. DeLuca, Influence of fire on native nitrogen-fixing plants and soil nitrogen status in ponderosa pine - douglas-fir forests in western Montana, *Can. J. For. Res.* 30 (2000) 274–282.

3.7 Figures et Tableaux supplémentaire de l'article Vincent *et al.*, 2018

Suite à l'article publié dans la revue *European Journal of Soil Biology*, les figures et tableaux supplémentaires cités dans cet article sont présentés dans la partie suivante. Les figures et tableaux présentés incluent :

- Une Analyse en Composantes principales des paramètres édaphiques des sites d'études (Figure S1).
- Les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ mesurées chez *A. spirorbis* et les espèces de référence sur tous les sites d'études (Figure S2).
- Une Analyse en Composantes principales incluant moins de variables que la Figure 2 présentée dans l'article (Figure S2).
- Une graphique présentant la corrélation entre le $\delta^{15}\text{N}$ des espèces de référence et leur teneur en azote (Figure S4).
- Un tableau des teneurs en azote et du $\delta^{15}\text{N}$ du sol des sites d'études (Table S1).
- Une matrice de corrélation des paramètres azotés mesurés dans cette étude (Table S2).
- Un tableau résumant les corrélations entre les paramètres azotés des plantes et du sol par rapport aux paramètres édaphiques des sites d'études (Table S3).

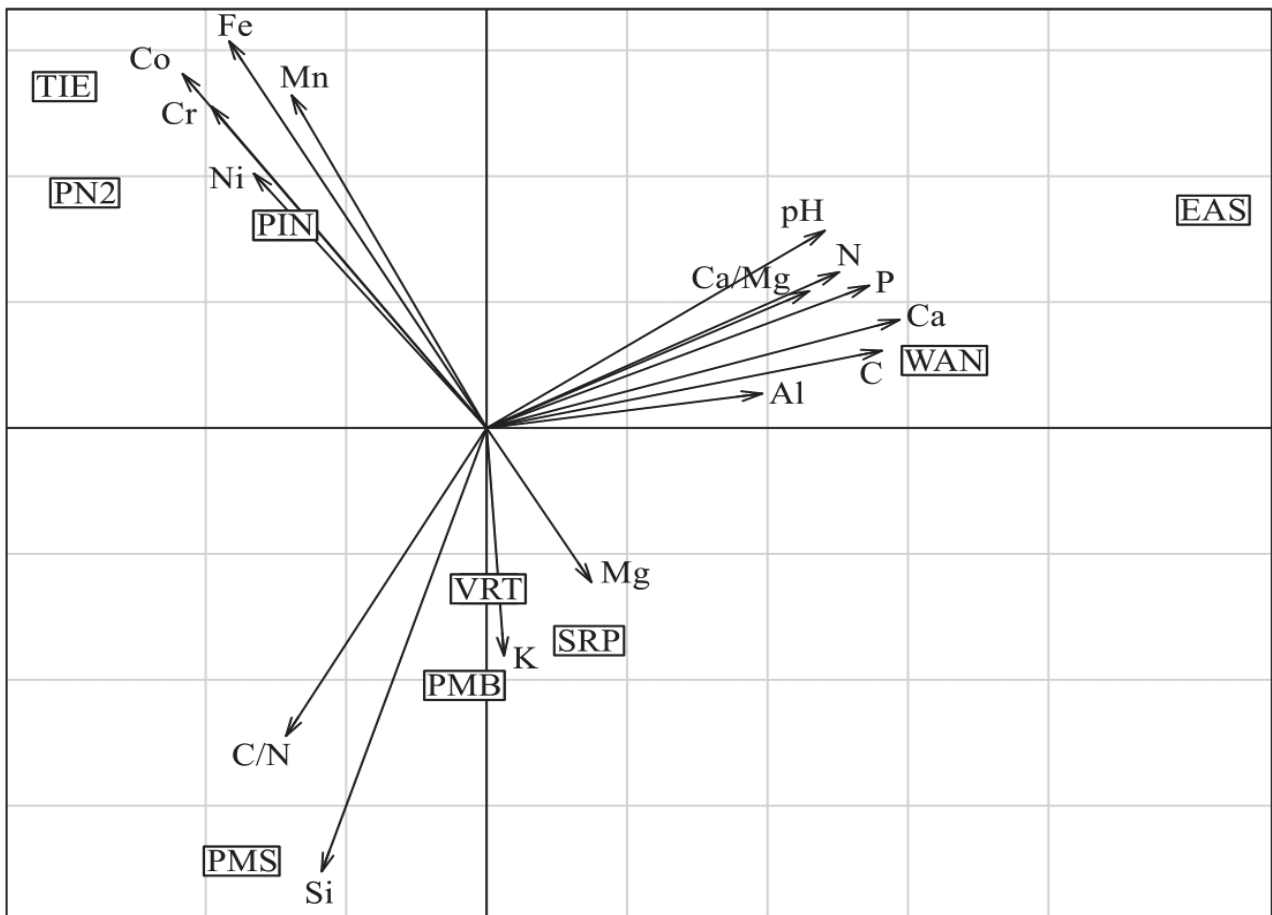


Fig. S1: Principal Component Analysis (PCA) representing the distribution of the study sites according to their soil properties.

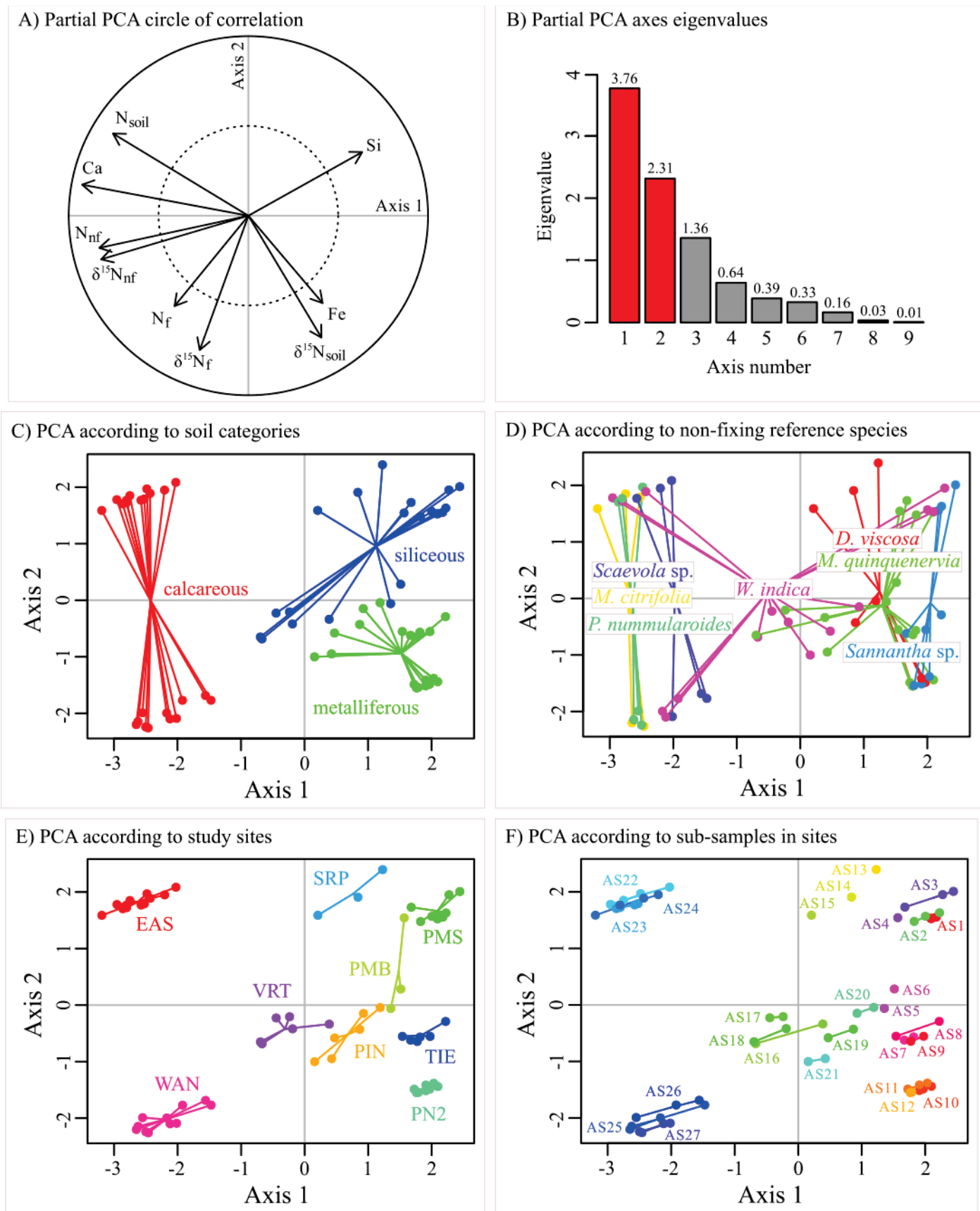


Fig. S3: Partial Component Analysis including leaves plant nitrogen of reference species and *A. spirorbis*, with 3 soil parameters representative of each soil category (Ca for calcareous soils; Fe for metalliferous soils ; Si for siliceous soils). Panel A) Circle of correlation, B) Eigenvalues, C) Samples distributions according to soil categories, D) Non- N_2 -fixing reference species, E) Study sites and F) Sub-samples in sites.

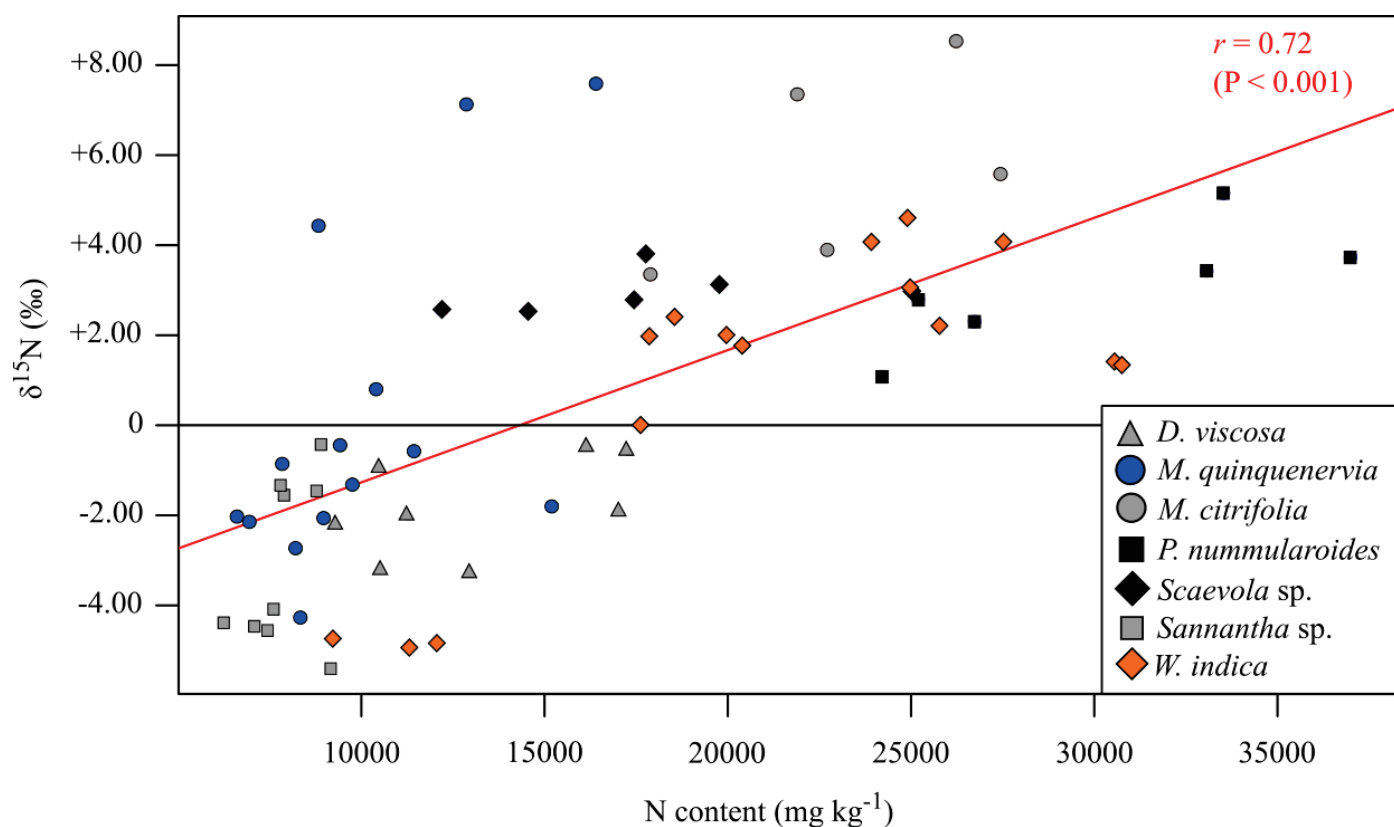


Fig. S4: Correlation between the leaves ^{15}N abundances and N contents of the non- N_2 -fixing reference species.

Table S1: Soil total nitrogen contents¹ (in $\text{mg.kg}^{-1} \pm$ standard errors) and ^{15}N natural abundances¹ (in $\text{‰} \pm$ standard errors) in each of the 9 study sites.

Soil category	Site	$\text{N}_{\text{soil}} (\text{mg.kg}^{-1})$	$\delta^{15}\text{N}_{\text{soil}} (\text{‰})$
Metalliferous	Pandanus 2	$448 \pm 10 \text{ fg}$	$+11.0 \pm 0.4 \text{ a}'$
	Pindaï	$2780 \pm 70 \text{ b}$	$+6.63 \pm 0.47 \text{ bc}'$
	Tiébaghi	$491 \pm 8 \text{ fg}$	$+5.38 \pm 0.37 \text{ cd}'$
Calcareous	Easo	$21817 \pm 555 \text{ a}$	$+3.25 \pm 0.26 \text{ e}'$
	Wanaham	$2477 \pm 25 \text{ bc}$	$+6.65 \pm 0.26 \text{ b}'$
Siliceous	Poum Malabou	$1115 \pm 8 \text{ ef}$	$+7.27 \pm 0.25 \text{ b}'$
	Poum Silice	$194 \pm 9 \text{ g}$	$+4.50 \pm 0.98 \text{ d}'$
	Serpentine	$1504 \pm 6 \text{ de}$	$+3.04 \pm 0.15 \text{ e}'$
	Vertisol	$1913 \pm 23 \text{ cd}$	$+4.99 \pm 0.42 \text{ d}'$

¹Means \pm standard errors were obtained from 3 replicates per soil sample in each study sites

Table S2: Correlation matrix between N contents and ^{15}N abundances of the leaves of reference species (N_{nf} and $\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$), *A. spirorbis* (N_{f} and $\delta^{15}\text{N}_{\text{f}}$), the soil (N_{soil} and $\delta^{15}\text{N}_{\text{soil}}$) and %Ndfa. The upper right part of the matrix contains the correlation coefficients values (r) and the bottom left part corresponds to the level of significance of the correlation. Significant correlations are highlighted in grey.

	N_{nf}	N_{f}	N_{soil}	$\delta^{15}\text{N}_{\text{f}}$	$\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$	$\delta^{15}\text{N}_{\text{soil}}$	%Ndfa
N_{nf}		0.29	0.80	0.20	0.77	-0.01	0.44
N_{f}	NS		0.32	0.64	0.61	0.29	0.10
N_{soil}	***	NS		0.12	0.80	-0.05	-0.23
$\delta^{15}\text{N}_{\text{f}}$	NS	*	NS		0.46	0.73	-0.04
$\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$	***	*	***	NS		0.21	-0.17
$\delta^{15}\text{N}_{\text{soil}}$	NS	NS	NS	***	NS		0.09
%Ndfa	NS	NS	NS	NS	NS	NS	

Table S3: Correlations between leaves N contents and ^{15}N abundances, with %Ndfa and the physico-chemical properties of the soils. Significant correlations are highlighted in grey, whereas NS means the correlation is not significant at a confidence.

	pH	C	N_{soil}	C/N	P	K	Ca	Mg	Ca/Mg	Al	Co	Cr	Fe	Mn	Ni	Si
N_{nf}	*	***	***	NS	*	NS	**	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
N_{f}	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
N_{soil}	NS	NS	***	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
$\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$	NS	***	***	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
$\delta^{15}\text{N}_{\text{f}}$	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
$\delta^{15}\text{N}_{\text{soil}}$	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
%Ndfa	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

N_{nf} = Nitrogen content of the leaves of non- N_2 -fixing reference species

N_{f} = Nitrogen content of the leaves of *A. spirorbis*

N_{soil} = Nitrogen content of the soil

$\delta^{15}\text{N}_{\text{nf}}$ = ^{15}N abundance of the leaves of non- N_2 -fixing reference species

$\delta^{15}\text{N}_{\text{f}}$ = ^{15}N abundance of the leaves of *A. spirorbis*

$\delta^{15}\text{N}_{\text{soil}}$ = ^{15}N abundance of the soil

%Ndfa = Percentage of N_2 fixed by *A. spirorbis* (with $\beta = -0.937\text{‰}$)

3.8 Résultats majeurs issus de la publication

3.8.1 Les teneurs en azote chez *A. spirorbis* et les espèces de référence

Le premier résultat majeur concerne les teneurs en azote chez *A. spirorbis* et chez les espèces de référence (Tableau 4). Les résultats montrent que sur une large gamme aux propriétés contrastées (au niveau de teneurs en nutriments et des métaux lourds), les concentrations foliaires en azote chez *A. spirorbis* varient moins que chez les plantes compagnes non-fixatrices, avec des erreurs standards de 10 % chez *A. spirorbis* ($20\,178 \pm 2011 \text{ mg.g}^{-1}$), comparé à 29 % chez *Melaleuca quinquenervia* ($10\,007 \pm 2853 \text{ mg.g}^{-1}$) et 32 % chez *Wikstromia indica* ($21\,263 \pm 6905 \text{ mg.g}^{-1}$) (Table 3 et Table S2 de l'article). De plus, les teneurs en azote foliaire des plantes compagnes sont très significativement corrélées aux teneurs en azote du sol ($P < 0,001$), ce qui n'est pas le cas pour *A. spirorbis* (Table S3 de l'article).

3.8.2 Les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ chez *A. spirorbis* et les espèces de référence

Le deuxième résultat majeur concerne les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ mesurées chez *A. spirorbis* et chez les espèces de référence non-fixatrices (Table 3 et Figure supplémentaire S2 de l'article). Chez *A. spirorbis*, les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ sont comprises dans un intervalle allant de $-1,04 \pm 0,42 \text{ ‰}$ pour les individus échantillonnés sur le site de SRP, à $+3,13 \pm 0,54 \text{ ‰}$ pour les individus échantillonnés sur le site de WAN (Table 3 de l'article). De plus, les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ chez *A. spirorbis* sont majoritairement centrées autour de 0 ‰ (Table 3 de l'article). A l'inverse, les plantés de référence non-fixatrices présentent des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ sur un intervalle beaucoup plus large que celui d'*A. spirorbis*. En effet, les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ des plantes de référence varient très fortement, allant de $-4,83 \pm 0,09 \text{ ‰}$ dans les *Wikstromia indica* échantillonnés sur le site PMS, à $+7,05 \pm 1,47 \text{ ‰}$ dans les *Morinda citrifolia* échantillonnés sur le site de WAN (Table 3 de l'article).

3.8.3 L'estimation du %Ndfa chez *A. spirorbis* en fonction des types de sol

Le dernier résultat marquant de cette étude est celui de l'estimation du %Ndfa chez des populations naturelles d'*A. spirorbis* se développant sur des sols calcaires, métallières et volcano-sédimentaires. En conditions naturelles, les moyennes des estimations du %Ndfa chez *A. spirorbis* sont de plus de 80 % sur trois sites métallifères (Pandanus 2 = $98 \pm 22 \text{ ‰}$; Pindaï = $85 \pm 27 \text{ ‰}$; Tiébaghi = $105 \pm 24 \text{ ‰}$), sur un site calcaire (Easo = $116 \pm 16 \text{ ‰}$) et sur trois sites volcano-sédimentaires (Poum malabou = $86 \pm 20 \text{ ‰}$; Poum silice = $101 \pm 20 \text{ ‰}$; Vertisol = $88 \pm 17 \text{ ‰}$). Aucune corrélation significative n'a été détectée entre le %Ndfa chez *A. spirorbis* et les paramètres du sol (Table S3).

Type de sol	Site d'étude	Espèces de référence Nom	N _{nf}	<i>Acacia spirorbis</i> N _f
Métallifère	Pandanus 2	<i>Dodonaea viscosa</i>	10323 ± 798	19540 ± 358 abc
		<i>Melaleuca quinquenervia</i>	9690 ± 1330	
		<i>Sannantha</i> sp.	8523 ± 450	
	Pindaï	<i>Dodonaea viscosa</i>	16571 ± 441	19338 ± 2328 abc
		<i>Melaleuca quinquenervia</i>	8833 ± 1196	
		<i>Wikstroemia indica</i>	18002 ± 391 c	
Tiébaghi	<i>Melaleuca quinquenervia</i>	7478 ± 998	17821 ± 746 bc	
	<i>Sannantha</i> sp.	7214 ± 690		
Calcaire	Easo	<i>Morinda citrifolia</i>	20832 ± 2110	19111 ± 519 abc
		<i>Psychotria nummularoides</i>	25379 ± 1039	
		<i>Scaevola</i> sp.	14836 ± 2283	
		<i>Wikstroemia indica</i>	23545 ± 2559 b	
	Wanaham	<i>Morinda citrifolia</i>	26641 ± 562	22435 ± 1072 ab
		<i>Psychotria nummularoides</i>	34529 ± 1751	
<i>Scaevola</i> sp.		20745 ± 3170		
Volcano-sédimentaire	Poum Malabou	<i>Melaleuca quinquenervia</i>	13377 ± 6528	20397 ± 1431 abc
		<i>Melaleuca quinquenervia</i>	10837 ± 3097	
	Poum Silice	<i>Sannantha</i> sp.	7894 ± 908	17943 ± 1552 bc
		<i>Wikstroemia indica</i>	10861 ± 1204 d	
	Serpent	<i>Dodonaea viscosa</i>	13558 ± 2775	16707 ± 1947 c
	Vertisol	<i>Melaleuca quinquenervia</i>	13222 ± 2461	23459 ± 1623 a
<i>Wikstroemia indica</i>		23089 ± 1964 bc		

Tableau 4 : Teneurs en azote¹ (en mg.kg⁻¹ ± écart-type) des feuilles des espèces de références (N_{nf}) et d'*A. spirorbis* (N_f). Ce tableau est issu de la Table 3 de l'article Vincent *et al.*, 2018. Ce tableau est simplifié et fait figurer uniquement les teneurs en azote foliaire des plantes de référence et d'*A. spirorbis*.

¹ Les moyennes ± écart-types sont calculées à partir de 3 répliques par échantillon de feuilles sur chacun des sites. Notes : Les moyennes des teneurs en azote (en mg.kg⁻¹), tout site d'étude confondu, pour les espèces échantillonnées sont de : 20178 ± 2059 mg.kg⁻¹ chez *A. spirorbis* ; 7877 ± 535 mg.kg⁻¹ chez *Sannantha* sp. ; 29954 ± 4575 mg.kg⁻¹ chez *P. nummularoides* ; 17790 ± 2954 mg.kg⁻¹ chez *Scaevola* sp. Les teneurs en azote moyennes (en mg.kg⁻¹), toutes espèces de référence confondues, sont de 28026 ± 4990 mg.kg⁻¹ sur le site de Wanaham et de 21148 ± 3847 mg.kg⁻¹ sur le site de Easo.

3.9 Discussion des résultats majeurs issus de la publication

3.9.1 Les teneurs en azote foliaire chez *A. spirorbis* versus les plantes compagnes.

Les résultats montrent que, tout type de sol confondu, les concentrations foliaires en azote chez *A. spirorbis* variaient moins que celles des plantes compagnes non-fixatrices, avec des erreurs standards de 10 % chez *A. spirorbis* ($20\,178 \pm 2\,011 \text{ mg.g}^{-1}$), comparé à 29 % chez *Melaleuca quinquenervia* ($10\,007 \pm 2\,853 \text{ mg.g}^{-1}$) et 32 % chez *Wikstromia indica* ($21\,263 \pm 6\,905 \text{ mg.g}^{-1}$) (Table 4 et Table S2 de l'article). *Acacia spirorbis* se développe naturellement sur des sols présentant des teneurs en azote minéral très significativement différentes entre les sites d'études, allant de $194 \pm 9 \text{ mg.kg}^{-1}$ sur le site de Poum silice, à $21\,817 \pm 555 \text{ mg.kg}^{-1}$ sur le site de Easo (Table S1). L'analyse statistique des teneurs en azote foliaire chez *A. spirorbis* par rapport à l'azote minéral (N_{soil}) et aux autres paramètres édaphiques (pH, C, P, K, Ca, Mg, Al, Co, Cr, Fe, Mn, Ni et Si) ne révèlent aucune corrélation significative. A l'inverse, les espèces de référence non-fixatrices présentent des teneurs en azote très significativement corrélées aux teneurs en azote du sol ($P < 0,001$; Table S3 de l'article). Une étude menée sur une plantation mixte composée d'*Acacia mangium* Willd. en compagnie d'*Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. (Galiana *et al.*, 2002) montrait que les teneurs en azote foliaire chez la légumineuse fixatrice d'azote *Acacia mangium* ne variaient pas selon un gradient de fertilité. A l'inverse, les teneurs en azote foliaire chez *Eucalyptus* (utilisé en tant qu'espèce de référence non-fixatrice dans l'étude Galiana *et al.*, 2002) étaient significativement corrélées à l'azote minéral (Galiana *et al.*, 2002). Ces résultats chez *Acacia mangium* suggéraient un effet compensatoire du taux de fixation biologique de l'azote. La même hypothèse peut être avancée pour notre modèle d'étude, où la symbiose fixatrice d'azote chez *Acacia spirorbis* contribuerait à maintenir des teneurs en azote foliaire constantes, quelles que soient les teneurs en azote minéral.

3.9.2 L'abondance en ^{15}N : un élément marqueur d'un fort potentiel fixateur d'azote.

Chez *A. spirorbis*, les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ sont comprises dans un intervalle allant de $-1,04 \pm 0,42$ ‰ pour les individus échantillonnés sur le site de SRP, à $+3,13 \pm 0,54$ ‰ pour les individus échantillonnés sur le site de WAN (Table 3 de l'article ; Figure S2). De plus, les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ chez *A. spirorbis* sont majoritairement centrées autour de 0 ‰ (Table 3 de l'article et Figure supplémentaire S2 de l'article). A l'inverse, les plantes de référence non-fixatrices présentent des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ sur un intervalle beaucoup plus large que celui d'*A. spirorbis*. En effet, les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ des plantes de référence varient très fortement, allant de $-4,83 \pm 0,09$ ‰ chez les *Wikstromia indica* échantillonnés sur le site PMS, à $+7,05 \pm 1,47$ ‰ chez les *Morinda citrifolia* échantillonnés sur le site de WAN (Table 3 de l'article). L'application directe de la formule servant à calculer les valeurs du $\delta^{15}\text{N} \rightarrow \delta^{15}\text{N}$ (‰) = $[(^{15}\text{N}/^{14}\text{N} - 0,3663) / 0,3663] \times 1000$ (Shearer & Kohl, 1986 ; Högberg, 1997), montre que plus les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ de la légumineuse sont proches de 0 ‰, plus le potentiel fixateur d'azote estimé sera élevé, puisque par définition, le $\delta^{15}\text{N}$ de l'air est égal à 0 ‰.

La seconde application de la formule proposée par Shearer & Kohl, (1986) servant à estimer le %Ndfa [$\%Ndfa = (\delta^{15}N_{nf} - \delta^{15}N_f) / (\delta^{15}N_{nf} - \beta) \times 100$], montre que plus l'écart entre les signatures isotopiques d'une légumineuse ($\delta^{15}N_f$) et celles d'espèces de références non-fixatrices ($\delta^{15}N_{nf}$) sera grand, plus le potentiel fixateur d'azote de la légumineuse sera élevé (Högberg, 1997; Watt *et al.*, 2003). Nos résultats montrent (i) des valeurs de $\delta^{15}N$ chez *A. spirorbis* centrées autour de 0 ‰ et (ii), des écarts importants de signature isotopique entre les $\delta^{15}N$ d'*A. spirorbis* et les $\delta^{15}N$ des espèces de référence non-fixatrice.

En considérant la méthode de l'abondance naturelle du ^{15}N , nos résultats de $\delta^{15}N$ sont caractéristiques d'un fort potentiel fixateur d'azote chez *A. spirorbis*.

3.9.3 Le potentiel fixateur d'azote d'*Acacia spirorbis* versus d'autres légumineuses

Les estimations du %Ndfa chez *A. spirorbis* révèlent un %Ndfa de plus de 80 % sur la plupart des sites d'études (Tableau 4 de l'article et Tableau 5). Par rapport à d'autres *Acacia* spp., ce taux de fixation biologique est l'un des plus hauts jamais relevé en conditions naturelles. La moyenne de %Ndfa chez neuf *Acacia* spp. en Namibie est de 29 % (Schulze *et al.*, 1991; Andrews *et al.*, 2011) et chez sept espèces de *Mimosa* spp., la moyenne du %Ndfa est de 21 % (dos Reis *et al.*, 2010). Plusieurs études rapportent des valeurs de %Ndfa chez *Acacia mangium*, *A. mucronata* Wendl., *A. melanoxylon* R. Br, *A. senegal* (syn. *Senegalia senegal*), *A. holosericea* G.Don de 50, 43, 48, 39 et 30 %, respectivement (Hamilton *et al.*, 1993; Ndiaye & Ganry, 1997; Galiana *et al.*, 2002; Raddad *et al.*, 2005; Isaac *et al.*, 2011). Parmi l'ensemble des légumineuses, le potentiel fixateur d'azote d'*A. spirorbis* fait partie des plus élevés. Sur 38 espèces arborées capables d'établir des symbioses fixatrices d'azote, une étude rapporte que la moyenne du %Ndfa est de 59 ± 27 % (Nygren *et al.*, 2012). D'autres études portées sur les espèces *Calliandra calothyrsus* Meisn. et *Pericopsis mooniana* Thwaites présentent des taux de fixation d'azote modérés de 58 et 50 % en moyenne, respectivement.

3.9.4 La symbiose fixatrice d'azote chez *A. spirorbis* est performante dans des sols contrastés

Dans les symbioses rhizobia-légumineuse, l'état physiologique de la plante et son taux de fixation biologique de l'azote peuvent être affectés par des contraintes telles qu'un stress salin, des pH extrêmes, un manque de nutriments, une toxicité minérale, des températures extrêmes, une insuffisance/excès d'humidité du sol et des agents phytopathogènes (Zahran, 1999). Des constats similaires ont été faits concernant les rhizobia et les nodules. Ils sont sensibles à plusieurs paramètres tels qu'une carence en photosynthétats, le stress hydrique, la salinité, les nitrates du sol, la température, les métaux lourds et les biocides (Walsh, 1995). La plupart des plantes fixatrices d'azote maximisent leur croissance dans un sol présentant un pH neutre ou légèrement acide (Brockwell *et al.*, 1991; Bordeleau & Prévost, 1994).

Tableau 5 : Synthèse des estimations du %Ndfa (\pm l'écart type) chez *A. spirorbis*, en fonction des sites d'étude et des plantes compagnes. Les moyennes présentées sont calculées à partir du Tableau 4 de l'article Vincent *et al.* (2018). Les moyennes regroupent les estimations du %Ndfa selon les différentes simulations des valeurs du paramètre β , lorsque la méthode de l'abondance naturelle est applicable.

Type de sol	Site d'étude	Plante compagne non-fixatrice de N ₂	%Ndfa \pm EC ¹	%Ndfa \pm EC ²
Métallifère	PN2	<i>D. viscosa</i>	104 \pm 23	
		<i>M. quinquenervia</i>	95 \pm 20	98 \pm 22
		<i>Sannantha</i> sp.	95 \pm 21	
	PIN	<i>D. viscosa</i>	102 \pm 23	
		<i>M. quinquenervia</i>	90 \pm 14	85 \pm 27
		<i>W. indica</i>	71 \pm 32	
	TIE	<i>M. quinquenervia</i>	98 \pm 22	105 \pm 24
		<i>Sannantha</i> sp.	111 \pm 24	
	Calcaire	EAS	<i>M. citrifolia</i>	118 \pm 17
<i>P. nummularoides</i>			114 \pm 17	116 \pm 16
<i>Scaevola</i> sp.			115 \pm 16	
<i>W. indica</i>			115 \pm 16	
WAN		<i>M. citrifolia</i>	56 \pm 5	
		<i>P. nummularoides</i>	24 \pm 4	9 \pm 36
		<i>Scaevola</i> sp.	- 5 \pm 1	
		<i>W. indica</i>	- 39 \pm 13	
		PMB	<i>M. quinquenervia</i>	86 \pm 20
Volcano-sédimentaire	PMS	<i>M. quinquenervia</i>	103 \pm 27	
		<i>Sannantha</i> sp.	100 \pm 14	101 \pm 20
	SRP	<i>W. indica</i>	100 \pm 14	
		<i>D. viscosa</i>	73 \pm 16	73 \pm 16
		VRT	<i>M. quinquenervia</i>	90 \pm 12
<i>W. indica</i>	85 \pm 20			

¹ Le %Ndfa est calculé en fonction des plantes compagnes

² Le %Ndfa est calculé en regroupant les plantes compagnes

En prenant en considération la littérature, il était attendu que le potentiel fixateur d'azote chez *A. spirorbis* varie entre des sols calcaires, métallifères et volcano-sédimentaires.

Cependant, nos résultats montrent que l'azote des populations naturelles d'*A. spirorbis* est majoritairement issu de la fixation biologique de l'azote, à plus de 80 %, dans six sites d'étude répartis parmi ces trois types de sol. Les estimations du %Ndfa chez *A. spirorbis* ne varient pas en fonction des conditions édaphiques (Tableau S3 de l'article et Tableau 5). Les teneurs en azote chez *Acacia spirorbis* ne varient pas en fonction des paramètres édaphiques, à la différence des espèces de références non-fixatrice. Les valeurs maximales du taux de la fixation biologique de l'azote, évaluées dans cette étude chez *Acacia spirorbis*, suggèrent que la plante hôte et ses symbiontes sont adaptés aux sols de type calcaire, métallifère et volcano-sédimentaire. L'efficacité de la fixation biologique de l'azote chez *Acacia spirorbis* ne dépendrait pas de l'azote minéral (Table supplémentaire S3 de l'article). Ce résultat en fait une espèce particulièrement intéressante pour restaurer des sols miniers où l'azote minéral fait défaut.

Dans un seul cas, les *A. spirorbis* échantillonnés sur le site de WAN présentent un $\delta^{15}\text{N}_f$ moyen de $+ 3,13 \pm 0,54 \text{ ‰}$ et une réduction drastique du %Ndfa (Table 4 de l'article et Tableau 5). Ce site présente une teneur en aluminium exceptionnellement élevée de $197\,125 \pm 34\,078 \text{ mg.kg}^{-1}$ contre $81\,020 \pm 2\,416 \text{ mg.kg}^{-1}$ sur le site de SRP. Des études rapportent qu'un fort taux d'aluminium inhiberait la croissance des rhizobia et donc, l'utilisation de la symbiose fixatrice d'azote par les plantes (Arora *et al.*, 2009 ; Mendoza-Soto *et al.*, 2015).

3.10 Conclusion de l'évaluation du potentiel fixateur d'azote d'*A. spirorbis* en conditions naturelles

Pour résumer, nos résultats montrent (i) que la fixation biologique de l'azote permet à *A. spirorbis* d'être relativement indépendant de l'azote minéral dans des conditions édaphiques contrastées, (ii) son potentiel fixateur est extrêmement élevé et (iii), que le type de sol n'affecte pas significativement le fonctionnement de la symbiose. Ces résultats apportent des éléments étayant l'hypothèse générale de ce travail de thèse : la symbiose fixatrice d'azote contribue dans l'adaptation d'*A. spirorbis* à des conditions édaphiques contrastées. De nombreuses études montrent que les conditions édaphiques influencent de manière significative la diversité du microbiome du sol, notamment le pH et les métaux lourds (Sheik *et al.*, 2012; Chodak *et al.*, 2013). En Nouvelle-Calédonie, une étude a démontré que la matière organique et les métaux lourds influencent l'abondance et l'activité des microorganismes (Amir & Pineau, 1998). Les rhizobia sont donc potentiellement influencés par les conditions du sol. *Acacia spirorbis* se développe et fixe l'azote dans des sols contrastés, mais qu'en est-il de ses symbiontes et de leurs caractéristiques ?

Chapitre 2

Caractérisation des rhizobia associés à *A. spirorbis* en conditions naturelles

4.1 Liste des figures et des tableaux principaux et supplémentaires de ce deuxième chapitre

<i>Figure 1: Map of New Caledonia according to the soil type</i>	107
<i>Figure 2: Phylogenetic tree of <u>Bradyrhizobium</u> symbionts of <u>A. spirorbis</u> based on concatemers</i>	113
<i>Figure 3: Phylogenetic tree of <u>Paraburkholderia</u> symbionts of <u>A. spirorbis</u> based on concatemers</i> ..	115
<i>Figure 4: PCA of the nitrogen fixation efficiency of <u>A. spirorbis</u> rhizobial symbionts</i>	117
<i>Figure 5: Phylogenetic tree of alpha-rhizobial <u>A. spirorbis</u> symbionts based on nodA gene</i>	119
<i>Figure 6: Phylogenetic tree of alpha-rhizobial <u>A. spirorbis</u> symbionts based on nifH gene</i>	121
<i>Figure 7: Principal components analyses of the metal tolerance of <u>A. spirorbis</u> symbionts</i>	123
<i>Supplementary Figure 1: PCA of the study sites soil properties</i>	151
<i>Supplementary Figure 2: Phylogenetic tree of <u>Bradyrhizobium</u> symbionts based on the 16S rRNA</i> ...	153
<i>Supplementary Figure 3: Phylogenetic tree of <u>Bradyrhizobium</u> symbionts based on dnaK gene</i>	155
<i>Supplementary Figure 4: Phylogenetic tree of <u>Bradyrhizobium</u> symbionts based on atpD gene</i>	157
<i>Supplementary Figure 5: Phylogenetic tree of <u>Bradyrhizobium</u> symbionts based on recA gene</i>	158
<i>Supplementary Figure 6: Phylogenetic tree of <u>Paraburkholderia</u> sp. based on the 16S rRNA gene</i> ...	159
<i>Supplementary Figure 7: Phylogenetic tree of <u>Paraburkholderia</u> symbionts based on gyrB gene</i>	160
<i>Supplementary Figure 8: Phylogenetic tree of <u>Paraburkholderia</u> symbionts based on atpD gene</i>	161
<i>Supplementary Figure 9: Phylogenetic tree of <u>Paraburkholderia</u> symbionts based on recA gene</i>	162
<i>Table 1: Sampling sites description and information</i>	109
<i>Table 2: Soil properties of the study sites</i>	111
<i>Table 3: Occurrence of metal resistance genes in the strains according to soil type and genus</i>	125
<i>Supplementary Table 1: List of the primers used for PCR amplification and sequencing</i>	127
<i>Supplementary Table 2: Accession numbers of <u>Bradyrhizobium</u> strains deposited in DDJB</i>	129
<i>Supplementary Table 3: Accession numbers of <u>Burkholderia</u> strains deposited in DDJB</i>	131
<i>Supplementary Table 4: Accession numbers of <u>Bradyrhizobium</u> references strains</i>	133
<i>Supplementary Table 5: Accession numbers of <u>Burkholderia</u> references strains</i>	135
<i>Supplementary Table 6: Nitrogen fixation efficiency of each alpha-rhizobial strain</i>	137
<i>Supplementary Table 7: Nitrogen fixation efficiency of each beta-rhizobial strain</i>	139
<i>Supplementary Table 8: Data collected from the nodulation test on <u>A. spirorbis</u> seedlings</i>	141
<i>Supplementary Table 9: Correlation matrix of the nitrogen fixation efficiency parameters</i>	141
<i>Supplementary Table 10: Accession numbers of bacterial nodA references sequences</i>	143
<i>Supplementary Table 11: Nucleotidic BLAST results of nodA sequences from <u>A. spirorbis</u> beta-rhizobial symbionts</i>	145
<i>Supplementary Table 12: Accession numbers of bacterial nifH references sequences</i>	147
<i>Supplementary Table 13: Summary of the strains metal tolerance according to soil type and rhizobial genus</i>	149
<i>Supplementary Table 14: Correlation matrix of the metal tolerance parameters</i>	149

4.2 Introduction

Le chapitre précédent a permis d'évaluer le fonctionnement de la fixation d'azote chez *A. spirorbis* en conditions naturelles, en mettant en évidence que la symbiose fixatrice d'azote fournissait en moyenne 80 % de l'azote total de la plante (Vincent *et al.*, 2018). Les valeurs maximales de cette fixation atteignent 100 % sur des sols ultramafiques et volcano-sédimentaires. Il ne faut pas oublier que la fixation biologique de l'azote n'est possible que lors d'associations symbiotiques entre des rhizobia et des légumineuses. On en déduit alors qu'*Acacia spirorbis* est capable de recruter des rhizobia dans tous les types de sol où il pousse naturellement, notamment dans des sols calcaires (CA), maquis miniers développés sur des sols métallifères (UF) et dans des forêts et pré-bois présentant des sols volcano-sédimentaires (VS). En Nouvelle-Calédonie, les propriétés des sols CA, UF et VS sont contrastées (Table 2 et Figure S1 de l'article Vincent *et al.*, 2018) et des études ont démontré que les conditions du sol, notamment la présence d'éléments traces métalliques, peuvent impacter le développement de la plante, la communauté rhizobienne du sol, ainsi que le fonctionnement de la fixation biologique de l'azote (Zahran, 1999 ; Emamverdian *et al.*, 2015). La mise en commun de ces éléments font émerger les questions scientifiques suivantes : (i) quel est le degré d'intimité symbiotique chez *A. spirorbis* sur des sols UF et VS et (ii) quelles sont les caractéristiques de ces rhizobia en fonction du type de sol ? Cette étude vise à caractériser les rhizobia en fonction des propriétés du sol et de ce fait, les rhizobia présents sur sols calcaires (CA) n'ont pas été pris en compte dans cette étude afin de limiter des effets confondant dûs à la biogéographie. Ce deuxième chapitre aborde donc la caractérisation des rhizobia associés symbiotiquement à *A. spirorbis* sur des sols métallifères et volcano-sédimentaires dans des écosystèmes naturels en Nouvelle-Calédonie.

La structure de ce chapitre est similaire à celle du chapitre précédent avec (i) d'abord une description de la méthodologie, (ii) la présentation des résultats sous la forme d'un projet d'article destiné à être soumis prochainement dans une revue internationale, (iii) un rappel des résultats majeurs, (iv) une discussion desdits résultats par rapport à la littérature scientifique et (v) la liste des figures supplémentaires de cet article.

Note : La notion de « degré d'intimité symbiotique » mentionné dans ce travail de thèse correspond à la diversité taxonomique de bactéries pouvant établir des symbioses fixatrices d'azote fonctionnelles avec une légumineuse donnée. En réciproque, le degré d'intimité symbiotique peut correspondre à la diversité de légumineuses pouvant être infecté par un rhizobia spécifique. En anglais, ce terme est largement utilisé sous la forme de « *symbiotic promiscuity* » (Perret *et al.*, 2000 ; Lira *et al.*, 2015).

Par exemple, la souche rhizobienne *Ensifer* (ex : *Sinorhizobium*) sp. NGR234 est capable de former des nodules chez 232 espèces de légumineuses appartenant à 112 genres différents, tandis que des souches de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolées d'une variété de *Pisum sativum* ne peuvent pas établir de symbioses avec d'autres variétés de la même espèce provenant de différentes origines (Ovtsyna *et al.*, 1998 ; Masson-Boivin *et al.*, 2009).

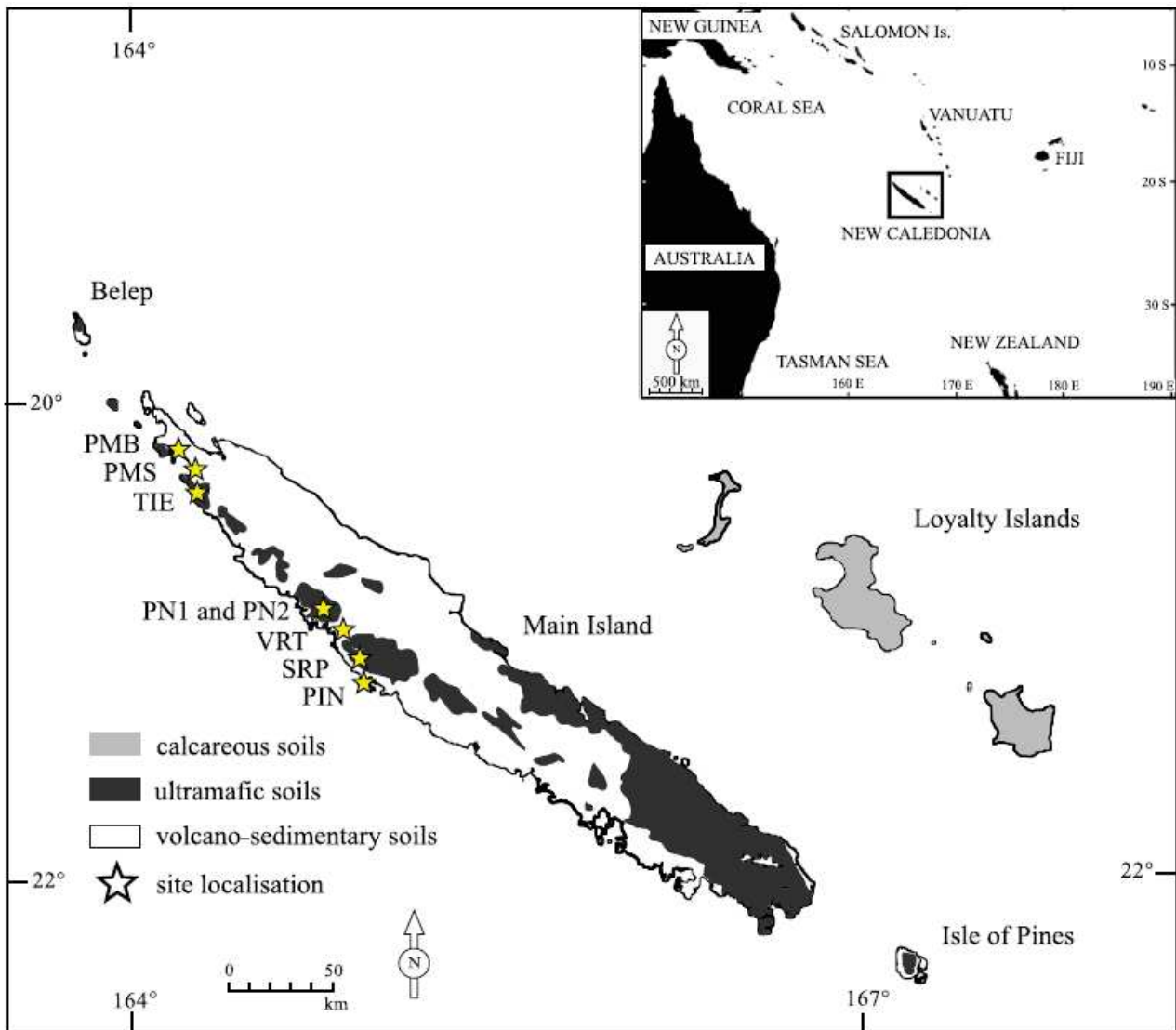


Figure 1: Map of New Caledonia according to the three main soils categories: calcareous (in grey), ferralitic (in darkgrey) and volcano-sedimentary (in white). Study sites are located with white stars. Abreviations of the study sites: PIN: Pindai; PMB: Poug Malabou; PMS: Poug Silice; PN1: Pandanus 1; PN2: Pandanus 2; SRP: Serpent; VRT: Vertisol.

4.3 Méthodologie

Ce chapitre aborde la caractérisation des rhizobia associés à *A. spirorbis* sur des sols métallifères développés sur substrats ultrabasiques et des argilo-siliceux développés sur substrat volcano-sédimentaires dans des écosystèmes naturels en Nouvelle-Calédonie. Pour rappel, les rhizobia des sols calcaires n'ont pas été pris en compte dans cette étude afin de limiter des effets confondant dûs à la biogéographie.

La démarche adoptée pour répondre à la question scientifique se décompose en plusieurs étapes.

1) Des nodules ont été prélevés directement sur les racines de populations naturelles d'*Acacia spirorbis* sur huit sites d'études présentant des sols UF ou VS. Cette méthode d'isolement « directe » diffère de celle du piégeage, dans le sens où prélever des nodules directement depuis le terrain permet d'avoir une description de la communauté de rhizobia associée à *A. spirorbis* à un stade adulte.

2) Des souches ont été isolées directement à partir de nodules provenant d'*A. spirorbis* au laboratoire sur boîtes de Pétri contenant un milieu YMA (Vincent, 1970).

3) Les isollements sont caractérisés selon une analyse polyphasique comportant trois aspects distincts :

a) Une identification moléculaire des souches isolées en effectuant une analyse multilocus incluant plusieurs gènes marqueurs de la diversité : les gènes ARNr 16S, *dnaK*, *gyrB*, *atpD* et *recA*.

b) Une première vérification de la capacité nodulante et fixatrice d'azote de chacune des souches isolées en les inoculant sur de jeunes plants d'*A. spirorbis* en conditions contrôlées dans une chambre de culture. Une deuxième vérification moléculaire du fonctionnement de la symbiose fixatrice d'azote à partir de deux gènes marqueurs de la symbiose : le gène *nodA* et le gène *nifH*.

c) Une première caractérisation de la tolérance aux éléments traces métalliques de chacune des souches en conditions *in vitro*, basée sur le calcul des concentrations inhibitrices de 50 % de la croissance de chacune des souches (CI₅₀) pour six éléments traces métalliques : l'aluminium, le cobalt, le chrome, le fer, le manganèse et le nickel. Une deuxième caractérisation de la tolérance aux éléments traces métalliques portant sur la présence ou non de deux gènes marqueurs de la tolérance aux métaux : le gène *cnrA* et le gène *nreB* (Chaintreuil *et al.*, 2007).

4) Les résultats obtenus sont compilés et analysés sous la forme de phylogénies, de résultats de BLAST, d'analyses multivariées du type ACP et de tableaux de synthèses avec l'appui de tests statistiques.

5) Le travail effectué est valorisé sous la forme d'un article destiné à être soumis dans une revue scientifique internationale du type *FEMS microbiology*.

La partie suivante présente une première version de l'article destiné à une soumission dans la revue *FEMS microbiology*.

Note : Afin de faciliter la lecture de cet article et sa clarté, la liste complète de ces figures et tableaux est communiquée au début de ce deuxième chapitre. Les numéros des tableaux et figures principales et supplémentaires cités dans cet article sont indépendants de la numérotation des autres tables. Les références citées dans cet article sont incluses dans la section bibliographie à la fin du manuscrit de thèse.

Table 1: Sampling sites information, including names, soil type, WRB classification, soil description, coordinates and elevation.

Site name	Soil type	Soil WRB classification	Soil description	Coordinates	Elevation
Pandanus 1	Ultramafic	Haplic Cambisol	Brown gravelly soil	S 21°01'33.36" E 164°46'59.12"	38 m
Pandanus 2	Ultramafic	Abruptic Ferralsol	Brown clayey soil with pisolitic cover	S 21°01'58.8" E 164°46'40.97"	31 m
Pindai	Ultramafic	Haplic Ferralsol	Red-brown soil	S 21°19'55.45" E 164°58'19.24"	65 m
Tiébaghi	Ultramafic	Geric Plinthosol	Red pisolitic soil	S 20°28'19.20" E 164°15'35.16"	69 m
Poum Malabou	Volcano-sedimentary	Leptic Cambisol	Brown gravel-rich soil	S 20°17'32.56" E 164°05'22.60"	48 m
Poum Silice	Volcano-sedimentary	Geric Acrisol	Silicic bleached soil	S 20°13'38.5" E 164°04'44.52"	14 m
Serpent	Volcano-sedimentary	Haplic Cambisol	Thin silty grey-brown soil	S 21°10'27.74" E 164°52'40.47"	75 m
Vertisol	Volcano-sedimentary	Haplic Vertisol	Black clayey soil	S 21°07'59.75" E 164°54'55.49"	16 m

4.4 Manuscrit du deuxième article

1 **Title:** Broad symbiotic promiscuity of *Acacia spirorbis* helps towards adaptation to ultramafic and
2 volcano-sedimentary soils in New Caledonia.

3
4 **Authors:** Bryan Vincent^{1*}, Farid juillot², Agnieszka Klonowska³, Noémie Gerbert¹, Antoine Galiana⁴,
5 Cedric Grangeteau¹, Laure Hannibal⁵, Marc Ducouso⁴, Philippe Jourand⁵.

6
7 ¹ LSTM, Université Montpellier, IRD, CIRAD, Montpellier SupAgro, Montpellier, France

8 ² IRD, UMR206 IMPMC, 98848 Nouméa Cedex, New Caledonia

9 ³ IRD, UMR186 IPME, 911 avenue Agropolis, 34394 Montpellier cedex 5, France

10 ⁴ CIRAD, UMR040 LSTM, TA A-82/J, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier cedex
11 5, France

12 ⁵ IRD, UMR040 LSTM, 98848 Nouméa Cedex, New Caledonia

13
14 *Corresponding author:

15 Bryan Vincent bryan.vincent@ird.fr

16
17 **Key Words:** *Bradyrhizobium*; *Paraburkholderia*; New Caledonia; *Acacia spirorbis*; nitrogen fixation;
18 metal tolerance

20 **Abstract**

21 *Acacia spirorbis* subsp. *spirorbis* Labill. is an endemic species from New Caledonia, naturally
22 occurring in ultramafic (UF) and volcano-sedimentary soils (VS). This *Acacia* establishes nitrogen-
23 fixing symbioses with rhizobia in contrasted soils. The aim of the study was to understand the plant
24 adaptation through its rhizobial symbiotic promiscuity according to the edaphic conditions. Rhizobia
25 were characterized through (i) multilocus analyses, (ii) symbiotic efficiency and (iii) metal tolerance.

26 A total of 40 strains were characterized, with two third of *Bradyrhizobium* and one third of
27 *Paraburkholderia* putative species. *Paraburkholderia* strains were found exclusively on UF soils
28 while 16 and 11 *Bradyrhizobium* strains were found on UF and VS soils, respectively. The symbiotic
29 efficiency of each strain was confirm and nodules formed with *Paraburkholderia* were more effective
30 ($P < 0.05$) than *Bradyrhizobium* strains, with 12.0 ± 4.0 and 21.8 ± 11.1 mg of nodules required to
31 produce 100 mg of shoots. Metal tolerance IC_{50} values of Al, Co, Cr and Fe were significantly higher
32 for *Bradyrhizobium* strains than *Paraburkholderia* strains.

33 The study of *A. spirorbis* symbionts is the first to report such a broad symbiotic promiscuity inside
34 natural ecosystems with (i) confirmation of the symbiotic efficiency with *Bradyrhizobium* and
35 *Paraburkholderia* strains and (ii) a taxonomic and symbiotic efficiency structuration by the soil type.
36 Such a large range of symbionts might be a successful key for *Acacia spirorbis* adaptation to
37 contrasted soils.

Table 2: Soil geochemical characteristics of the eight studied sites. Data are mean values \pm standard deviation ($n = 3$). Contents of each element are expressed as mg.kg^{-1} .

Soil category	Study site	pH	C	N	C/N	P	K	Ca	Mg	Ca/Mg
Ultramafic	Pindaï	6.8 ± 0.1	4900 ± 1900	2175 ± 525	2.2 ± 0.4	141 ± 18	1151 ± 135	4635 ± 1135	9100 ± 1407	0.50 ± 0.05
	Pandanus 1	6.4 ± 0.1	3150 ± 350	1170 ± 20	2.7 ± 0.7	34 ± 15	73 ± 8	1380 ± 310	39370 ± 14215	0.037 ± 0.005
	Pandanus 2	5.9 ± 0.03	800 ± 100	380 ± 40	2.2 ± 0.5	54 ± 54	149 ± 58	150 ± 20	14297 ± 4581	0.01 ± 0.002
	Tiébaghi	5.4 ± 0.1	1350 ± 250	470 ± 60	2.9 ± 0.2	129 ± 4	89 ± 15	225 ± 15	2107 ± 73	0.11 ± 0.01
Volcano-sedimentary	Poum Malabou	6.5 ± 0.2	2267 ± 896	1027 ± 226	2.1 ± 0.4	100 ± 16	6104 ± 2263	1020 ± 43	44445 ± 3558	0.02 ± 0.003
	Poum Silice	4.2 ± 0.03	2800 ± 1667	387 ± 113	6.6 ± 2.1	27 ± 14	27 ± 19	183 ± 53	83 ± 23	2.2 ± 0.5
	Serpent	6.5 ± 0.02	3300 ± 3612	1427 ± 1243	1.8 ± 0.6	431 ± 131	4930 ± 1685	46780 ± 8397	34792 ± 4680	1.3 ± 0.9
	Vertisol	5.8 ± 0.5	4550 ± 2350	1695 ± 775	2.6 ± 0.2	162 ± 34	236 ± 69	6095 ± 285	8171 ± 497	0.75 ± 0.08

(continue)

Soil category	Study site	Al	Co	Cr	Fe	Mn	Ni	Si
Ultramafic	Pindaï	52405 ± 2125	517 ± 109	19965 ± 677	261740 ± 11460	4453 ± 371	7556 ± 2449	146415 ± 3025
	Pandanus 1	17860 ± 2640	595 ± 39	24865 ± 4276	289175 ± 38305	5772 ± 937	8230 ± 1521	126140 ± 28770
	Pandanus 2	13805 ± 2965	797 ± 404	31598 ± 8648	327700 ± 79890	4783 ± 2272	3970 ± 688	110525 ± 50055
	Tiébaghi	45875 ± 1865	753 ± 39	15047 ± 1035	508175 ± 2895	19328 ± 2118	2650 ± 28	17695 ± 445
Volcano-sedimentary	Poum Malabou	67287 ± 9586	98 ± 11	1509 ± 116	61920 ± 1971	818 ± 93	1792 ± 105	265167 ± 14164
	Poum Silice	250 ± 57	< 0.01	153 ± 74	103 ± 69	2 ± 0.8	31 ± 11	431537 ± 8276
	Serpent	81020 ± 2416	52 ± 3	359 ± 52	62980 ± 1361	1178 ± 124	241 ± 59	209353 ± 6289
	Vertisol	76800 ± 2240	48 ± 2	344 ± 3	89865 ± 1425	1008 ± 76	49 ± 2	226270 ± 530

40 4.4.1 Introduction

41 New Caledonia (NC) is a tropical archipelago located in the South-West Pacific, about 1,200
42 km from the East coast of Australia. The geological history of NC is complex and as a result, many
43 kinds of bedrocks that emerged 37 Ma ago from the ocean (Pelletier, 2006; Bonvallot *et al.*, 2012).
44 Then these bedrocks were altered by climatic factors, resulting in the formation of different soil types:
45 acrisols, cambisol, leptosols, ferralsols. Thanks to the topographical and climatic diversities that are
46 present in NC, the archipelago hosts a noteworthy terrestrial biodiversity (Jaffré, 1993; Bonvallot *et al.*
47 *et al.*, 2012). For instance, many studies reported that more than 3,371 vascular plants species have been
48 identified of which 80 % are endemic to NC (Morat *et al.*, 2012). However, NC is affected by
49 recurrent fires, extensive grazing, urbanization and mining activities (Jaffré *et al.*, 2010; Losfeld *et al.*,
50 2014); considering these threats, NC is regarded as a hotspot of biodiversity (Myers *et al.*, 2000;
51 Marchese, 2015).

52 One part of this terrestrial biodiversity has been shaped by ultramafic environments that cover
53 one third of the main island (Kazakou *et al.*, 2008; Pillon *et al.*, 2010; Isnard *et al.*, 2016). Ultramafic
54 soils present harsh edaphic properties for plants physiology with a low content in nutrients (nitrogen,
55 phosphorus and potassium), a strong disequilibrium in the calcium/magnesium ratio (ratio 1/20) and
56 high contents in metals such as cobalt, chromium, iron, nickel and manganese (Pelletier, 2006).
57 Nowadays, nickel deposits are mined by several industries, which today play a key role in the
58 economy of NC. In 2008, the mining industry represented 95 % of the NC exportations and employed
59 6 % of the labor force (Jaffré & L'Huillier, 2010). However, the mining industry stripped over 20,000
60 ha of vegetation, which is 1.2 % of the land territory (Jaffré & L'Huillier, 2010). In agreement to local
61 laws, mining industries must rehabilitate their soils after extracting the nickel ore (Losfeld *et al.*,
62 2014). Several Australian *Eucalyptus* and *Acacia* have been introduced for ecological restoration of
63 post-mining soils but none of them survived the harsh edaphic conditions of the ultramafic soils
64 (Sarrailh, 2002). Subsequently, the use of endemic plant species naturally occurring in ultramafic
65 habitats was investigated.

66 One noteworthy candidate is the legume *Acacia spirorbis* subsp. *spirorbis* Labill. that
67 naturally grows in calcareous, ultramafic and volcano-sedimentary environments. Presence of *Acacia*
68 *spirorbis* is probably resulting from a long-term dispersal from Australia (Richardson *et al.*, 2011) and
69 in some cases displays an invasive behavior in degraded ecosystems like numerous Australian *Acacia*
70 species (Richardson *et al.*, 2015). A phylogenetic study showed that *A. spirorbis* is endemic of the
71 archipelago (Brown *et al.*, 2012). This legume species is able to establish symbioses with both
72 arbuscular, and ectomycorrhizal fungi and also nitrogen fixing bacteria. Moreover, *A. spirorbis*
73 symbioses occur naturally in ultramafic and volcano-sedimentary soils (Grangeteau *et al.*, 2012;
74 Ducouso *et al.*, 2014). *Acacia spirorbis* adaptation to contrasted soils is remarkable and studies
75 argued that this adaptation might be linked with its symbioses with microorganisms (Houlès *et al.*,
76 2018; Vincent *et al.*, 2018).

77
78

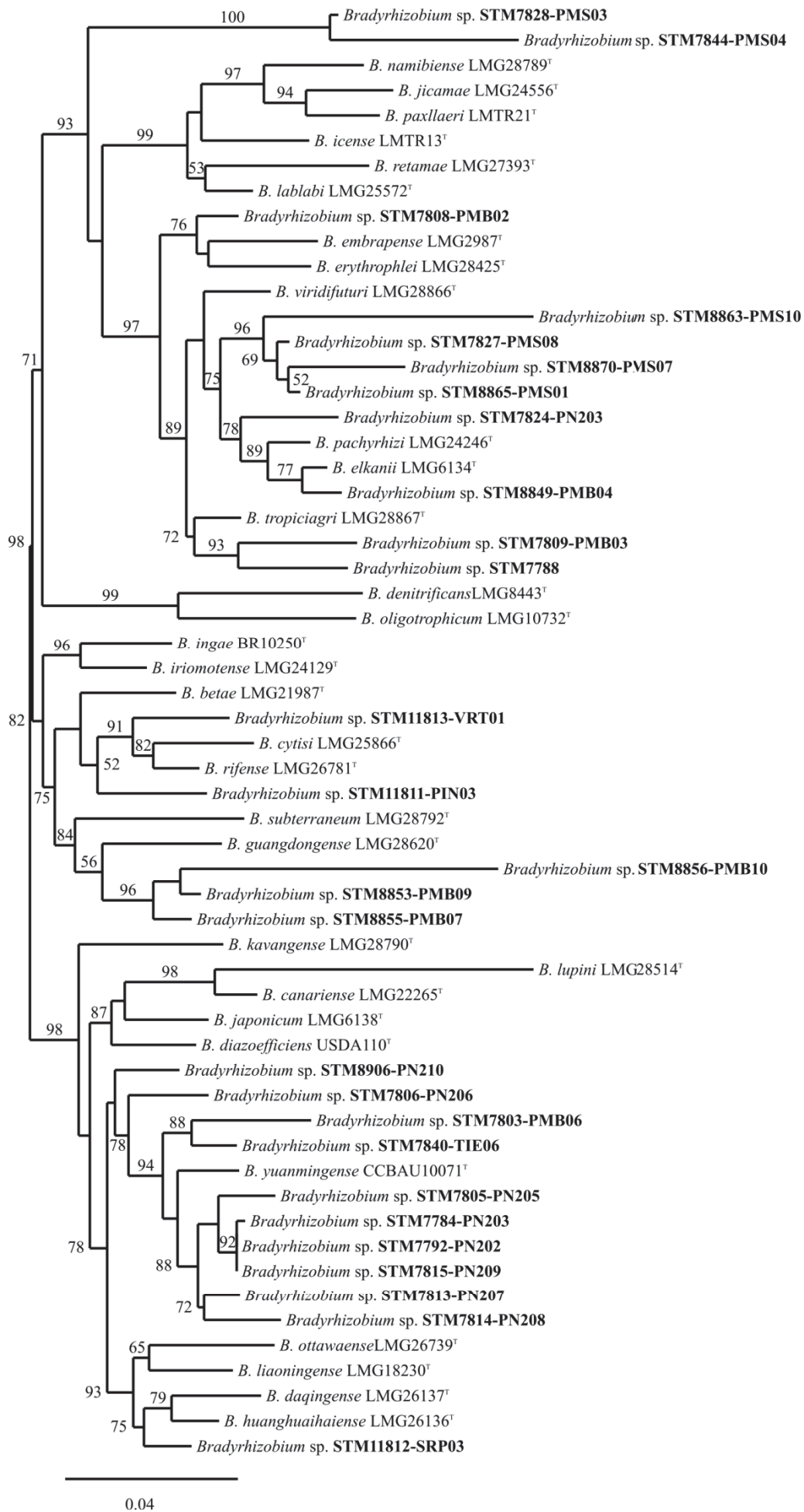


Figure 2: Unrooted phylogenetic tree of *Bradyrhizobium* sp. symbionts of *A. spirorbis* and related species. The tree was inferred from concatenated sequences of the genes 16S rRNA, *dnaK*, *atpD* and *recA*. Numbers at node represent bootstraps percentage from 1,000 replicates (shown only when > 50 %). Strains isolated in this study (New Caledonia) are in bold. Scale bar indicate the number of substitution per site.

79 Houlès *et al.* (2018) reported that *A. spirorbis* is able to establish symbioses with ectomycorrhizal
80 fungi in calcareous, ultramafic and volcano-sedimentary soils. The ectomycorrhizal fungi
81 communities, dominated at 92 % by Basidiomycota, were structured by the soil type and abiotic
82 parameters such as pH, calcium, phosphorus and aluminum (Houlès *et al.*, 2018). Hence, edaphic
83 parameters of New Caledonian soils structure *A. spirorbis* ectomycorrhizal symbionts. Another study
84 focused on the nitrogen-fixing potential of *A. spirorbis* reported that more than 80 % of the plant
85 nitrogen was supplied by the nitrogen-fixing symbiosis (Vincent *et al.*, 2018). Moreover, the nitrogen-
86 fixing symbiosis was effective in natural populations of *A. spirorbis* growing in ultramafic and
87 volcano-sedimentary environments (Vincent *et al.*, 2018).

88 However, little is known about rhizobia that are symbiotically associated with *A. spirorbis*.
89 The aims of this study were to investigate (i) the nitrogen-fixing symbionts associated with *A.*
90 *spirorbis* and (ii) the potential of these rhizobia to adapt to the harsh edaphic conditions of ultramafic
91 and volcano-sedimentary soils. The questions addressed were: which rhizobia are naturally found in
92 the nodules of *A. spirorbis* in ultramafic and volcano-sedimentary environments? Is there a
93 relationship between these harsh edaphic conditions and rhizobia characteristics, such as taxonomy,
94 nitrogen-fixing efficiency and heavy-metal tolerance? To answer these two questions, *A. spirorbis*
95 symbionts were isolated from root nodules naturally found in ultramafic and volcano-sedimentary
96 environments. The molecular diversity of the strains was assessed with a multilocus analysis based on
97 the housekeeping genes 16S rRNA, *dnaK*, *gyrB*, *atpD* and *recA*. The symbiotic efficiency of each
98 strain was tested on *A. spirorbis* seedlings in controlled chamber. In addition, nitrogen-fixing markers
99 were investigated (nodulation gene *nodA* and nitrogen fixing gene *nifH*). The metal tolerance of
100 rhizobia was tested *in vitro*, followed by a molecular characterization with the presence of the nickel
101 and cobalt resistance gene *cnrA* and nickel resistance gene *nreB*.

102

103 4.4.2 Material and Methods

104

105 4.4.2.1 Study sites and soil sampling

106

107 Natural populations of *A. spirorbis* were sampled on eight study sites distributed between
108 ultramafic (UF) and volcano-sedimentary (VS) soils (Figure 1, Table 1). Four of them were UF sites:
109 the site of Pindaï (PIN) is located on the Pindaï peninsula. Soil samples were collected as described in
110 Vincent *et al.*, 2018, from the top 30 cm layer, where nodules are assumed to find the best conditions
111 for their development (Kessel & Roskoski, 1981). Soil total contents of aluminum, calcium,
112 chromium, cobalt, iron, magnesium, manganese, nickel, phosphorus, potassium, silicium, organic
113 carbon and nitrogen were quantified as described in Vincent *et al.*, 2018 (Table 2 and Supplementary
114 Figure 1). Soils were identified using the WRB Classification (<http://www.fao.org/3/a-i3794e.pdf>).

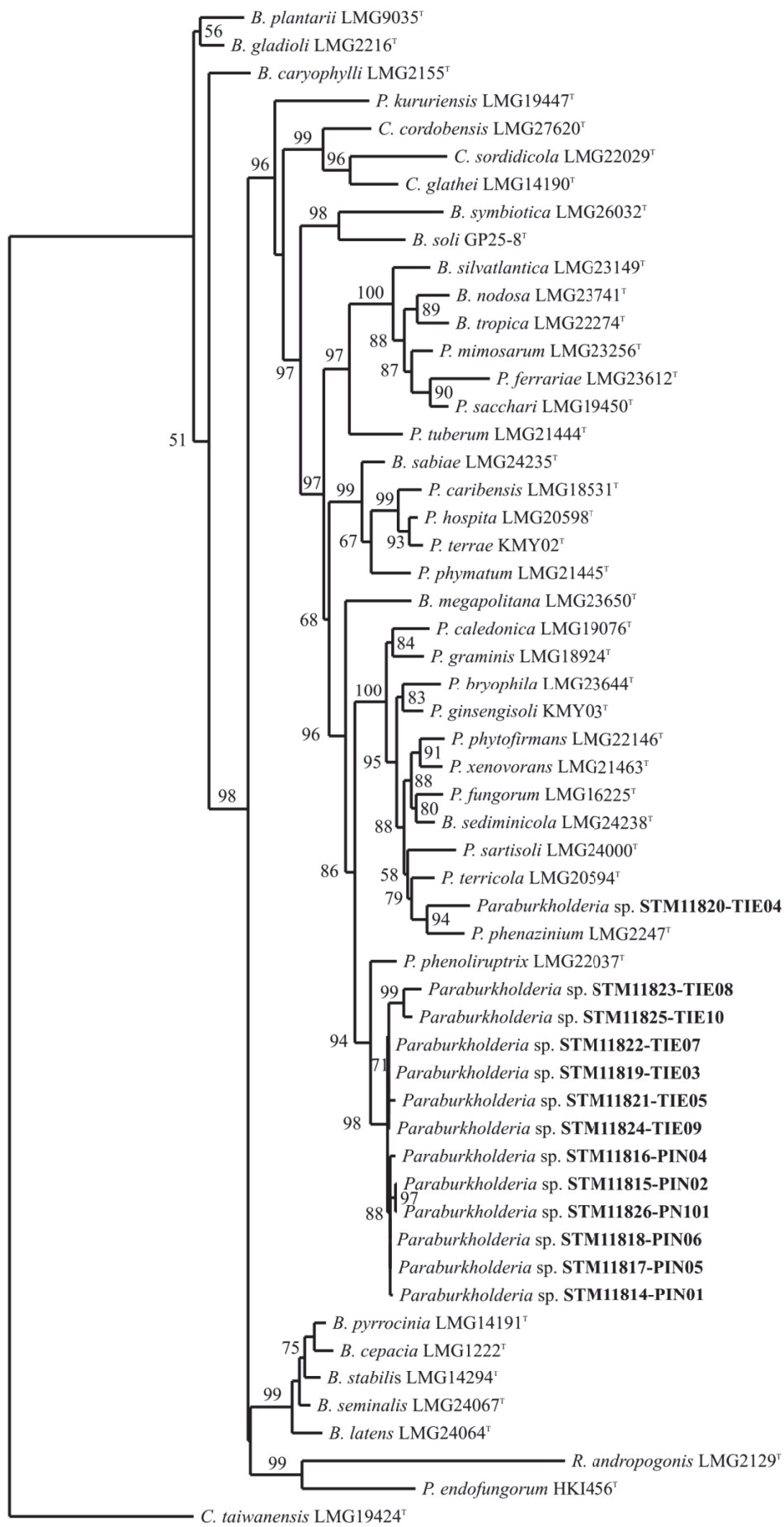


Figure 3: Rooted phylogenetic tree of *Paraburkholderia* sp. symbionts of *Acacia spirorbis* and related species. The tree was inferred from concatenated sequences of the genes 16S rRNA, *gyrB*, *atpD* and *recA*. Numbers at node represent bootstraps percentage from 1,000 replicates (shown only when > 50 %). Strains isolated in this study (New Caledonia) are in bold. Scale bar indicate the number of substitution per site.

4.4.2.2 Isolation of bacterial strains

Five fresh nodules per plant were sampled from three *A. spirorbis* roots on each study sites. All trees sampled were at least 10 m distant from each other. Nodules were kept in Falcon tubes in ice and then in a cooler at 4°C. The nodules were individually washed with sterile ultrapure water, surface sterilized in 70 % ethanol and 3 % calcium hypochlorite (filtered), then crushed in 50 µL of sterile ultrapure water. The suspension was streaked on yeast mannitol agar plates (YMA; Vincent, 1970) and incubated at 28°C for 48 h. The colonies growing in the first isolation plates were streaked again in second plates to obtain pure cultures. For long term maintenance, bacterial strains were grown in YM broth and preserved in 25 % glycerol at -80°C.

4.4.2.3 Molecular methods

For routine PCR amplifications, bacterial DNA was obtained from isolates using a quick Proteinase K method, as described by Wilson (2001). PCR amplifications were performed with GoTaq DNA polymerase kit (Promega, Madison, USA) according to the manufacturer's instructions and using 0.625 unit of GoTaq and 20 µmol of each primer in 25 µL of volume reaction. A routine PCR protocol was applied to the DNA amplifications based on 35 cycles with 30 s of denaturation, 30 s of hybridization and 1 min of elongation steps. The hybridization temperature was adjusted according to the primers used (Supplementary Table 1). Partial 16S rRNA gene (650 pb) was amplified with primers 16S-370-f and 16S-1080-r (Sy *et al.*, 2001). PCR amplification of *dnaK* gene (326 bp) for alpha- and beta-bacteria were obtained with primers TSdnaK3 and TSdnaK2 (Stepkowski *et al.*, 2003). PCR amplifications of *gyrB* gene (738 pb) were obtained for beta-rhizobia with primers gyrBF-Spilker and gyrBR-Spilker (Spilker *et al.*, 2009). PCR amplifications of *atpD* gene (600 pb) were obtained for alpha-rhizobia with primers atpD352F and atpD871R (Martens *et al.*, 2008). The *atpD* gene of beta-rhizobia was amplified with primers atpD-BurkF and atpD-BurkR (Payne *et al.*, 2005). PCR amplifications of *recA* gene fragments (492 pb) were obtained for alpha-rhizobia with primers recAf and recAr (Gaunt *et al.*, 2001). For beta-rhizobia, fragments of *recA* gene (704 pb) were amplified with primers recA-BurkF and recA-BurkR (Spilker *et al.*, 2009). PCR amplifications of *nodA* gene (450 pb) were obtained for alpha-rhizobia with primers NODA1F and NODAB1r (Ba *et al.*, 2002). For beta-rhizobia, fragments of *nodA* gene (367 pb) were amplified with primers nodA-Bf and nodA-Br (Liu *et al.*, 2012). PCR amplifications of *nifH* gene (780 pb) were obtained for alpha-rhizobia with primers nifHrhizo1F and nifHrhizo1R (Laguerre *et al.*, 2001). Fragments of beta-rhizobia *nifH* gene (370 pb) were amplified with the primers nifD (Yun & Szalay, 1984) and nifH(for2) (Frey-Klett *et al.*, 2005). The nickel resistance gene *nreB* (725 pb) was amplified with primers nreB-425F and nreB-1179R (Chaintreuil *et al.*, 2007). The nickel and cobalt resistance gene *cnrA* (1100 pb) was amplified with primers nrAf1 and cnrAf2 (Chaintreuil *et al.*, 2007). Each DNA

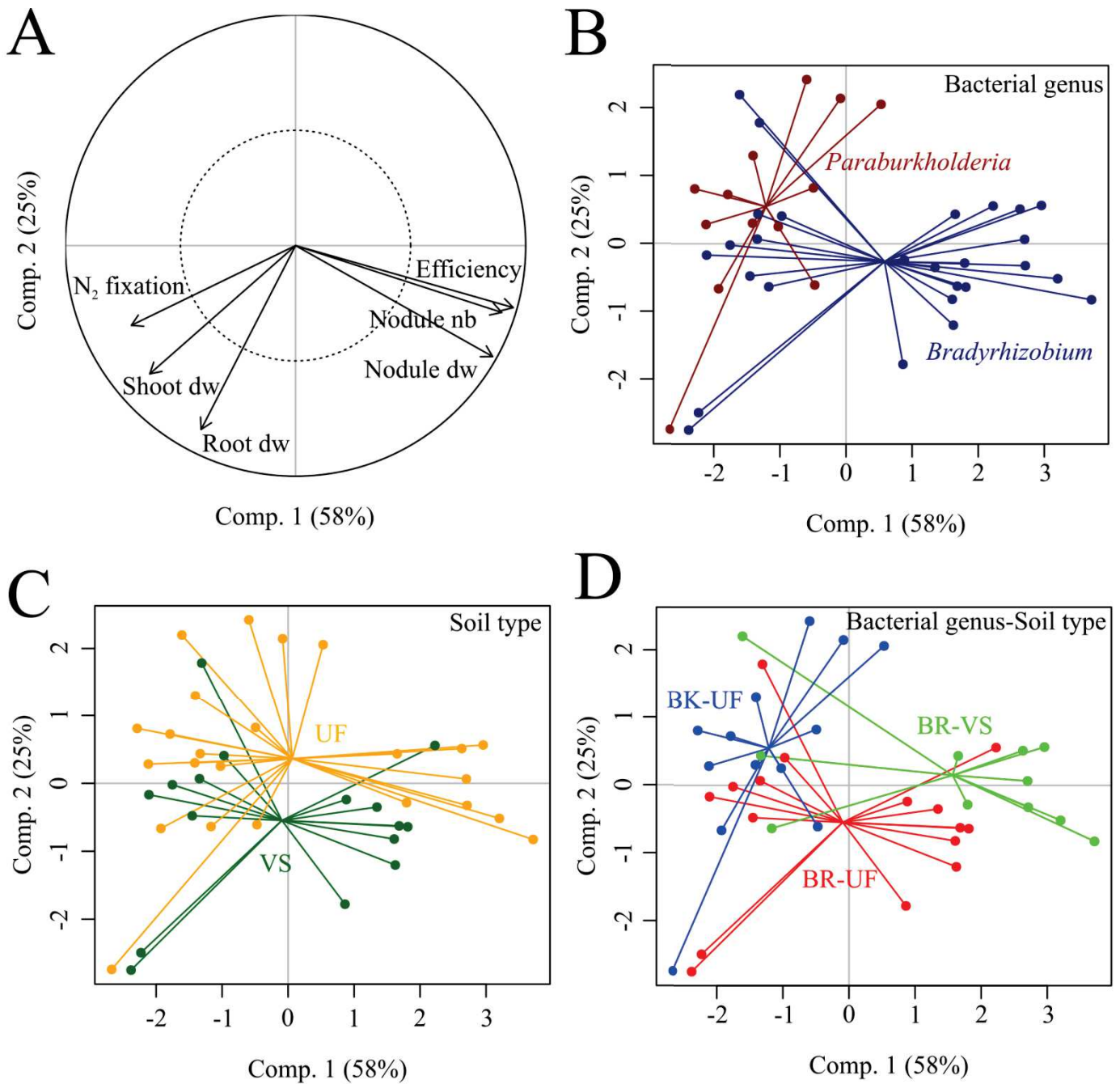


Figure 4: Principal Component Analysis (PCA) of the nitrogen-fixing efficiency of the strains isolated from *A. spirorbis* nodules and growth parameters of *A. spirorbis* seedling. The Figure 4A displays the circle of correlation of the PCA and the percentage of total variation explained by each axis. Data are presented according to the bacterial genus of the rhizobia identified (Figure 4B), the soil type where rhizobia were isolated (Figure 4C) and the combination between the rhizobial genus and the soil type (Figure 4D).

Numerical parameters included in this analysis were (i) the N_2 fixation efficiency of the strains (N_2 is expressed in μmol of ethylene formed by hour and by seedling), (ii) means dry weights of shoots, roots and nodules biomasses per seedling (in mg) and (iii) the nodule dry weight required to produce 100 mg of *A. spirorbis* shoots (Efficiency).

Abbreviations: UF: ultramafic soils; VS: volcano-sedimentary soils; BK-UF: *Paraburkholderia* from ultramafic soils; BR-UF: *Bradyrhizobium* from ultramafic soils; BR-VS: *Bradyrhizobium* from volcano-sedimentary soils.

155 resulting from PCR amplification were purified and sequenced as previously described in Moulin *et*
156 *al.* (2001) by Genoscreen and ADNid companies.

157

158 4.4.2.4 Phylogenetic analyses

159

160 Phylogenetic analyses were carried out as previously reported by Bontemps *et al.*, 2016 and
161 Klonowska *et al.*, 2012. Briefly: each DNA consensus sequences were obtained with an alignment
162 between forward and reverse sequences then, manually edited on ChromasPro software, version 2.1.8.
163 All DNA sequences were deposited into the DNA Data Bank of Japan (DDJB) for attribution of an
164 accession number (Supplementary Table 2 and 3). A set of sequences belonging to a same molecular
165 marker was aligned using Multialin INRA (Corpet, 1988). Every phylogenetic analysis includes a set
166 of reference DNA sequences belonging to the same bacterial genus. Reference sequences used for
167 molecular diversity for alpha- and beta-rhizobial references are listed in Supplementary Table 4 and 5,
168 respectively. Reference sequences of symbiotic markers are listed in Supplementary Table 6 and 7.
169 Phylogenies were inferred by the maximum likelihood (ML) method using PhyML (Guindon *et al.*,
170 2005). Bootstraps analyses were performed using 1,000 replicate for ML using the phylogeny.fr
171 software package (Dereeper *et al.*, 2008; 2010). Concatenated phylogenetic trees were inferred from
172 concatenated sequences obtained with the Genious software version 11.1.4 (Figures 2 and 3).
173 Concatemers were obtained by juxtaposing the DNA sequences of (i) the genes rRNA16S, *dnaK*, *atpD*
174 and *recA* for alpha-rhizobia (Figure 2) and (ii) the genes rRNA16S, *gyrB*, *atpD* and *recA* for beta-
175 rhizobia (Figure 3). Individual phylogenetic trees were obtained for each gene of alpha- and beta-
176 rhizobia (Supplementary Figures 2 to 9). All leaves names and bootstraps values of phylogenetic trees
177 were edited with the Inkscape software.

178

179 4.4.2.5 Plant nodulation and symbiotic efficiency tests

180

181 Plant nodulation and symbiotic efficiency tests were carried out as according to (Bontemps *et*
182 *al.*, 2016). Briefly: *Acacia spirorbis* seeds were surface sterilized 10 min in 96 % H₂SO₄, followed by
183 5 washes with sterile distilled water. Seeds were soaked overnight in sterilized water at 28°C and then
184 placed on 0.8 % water agar plates. Four days later, germinated seedlings were transferred in Gibson
185 tubes for *in vitro* nodulation tests. In each Gibson tube, sterilized stiff paper was bent at the top and
186 drilled at a 2 mm diameter. First, seedling teguments were peeled off and second, the roots of the
187 seedlings were passed through the stiff paper hole. Gibson tubes were watered with Jensen medium
188 (Jensen, 1942). Seedlings were inoculated with bacterial strains grown in YM medium (Vincent,
189 1970). Gibson tubes were closed with carded cotton plugs. Gibson tubes were placed in a tropical
190 plant chamber (28°C, 70 % humidity, day:night, 8h:16h) for 2 months. Five replicates of Gibson tubes
191 were made for each bacterial strain tested.

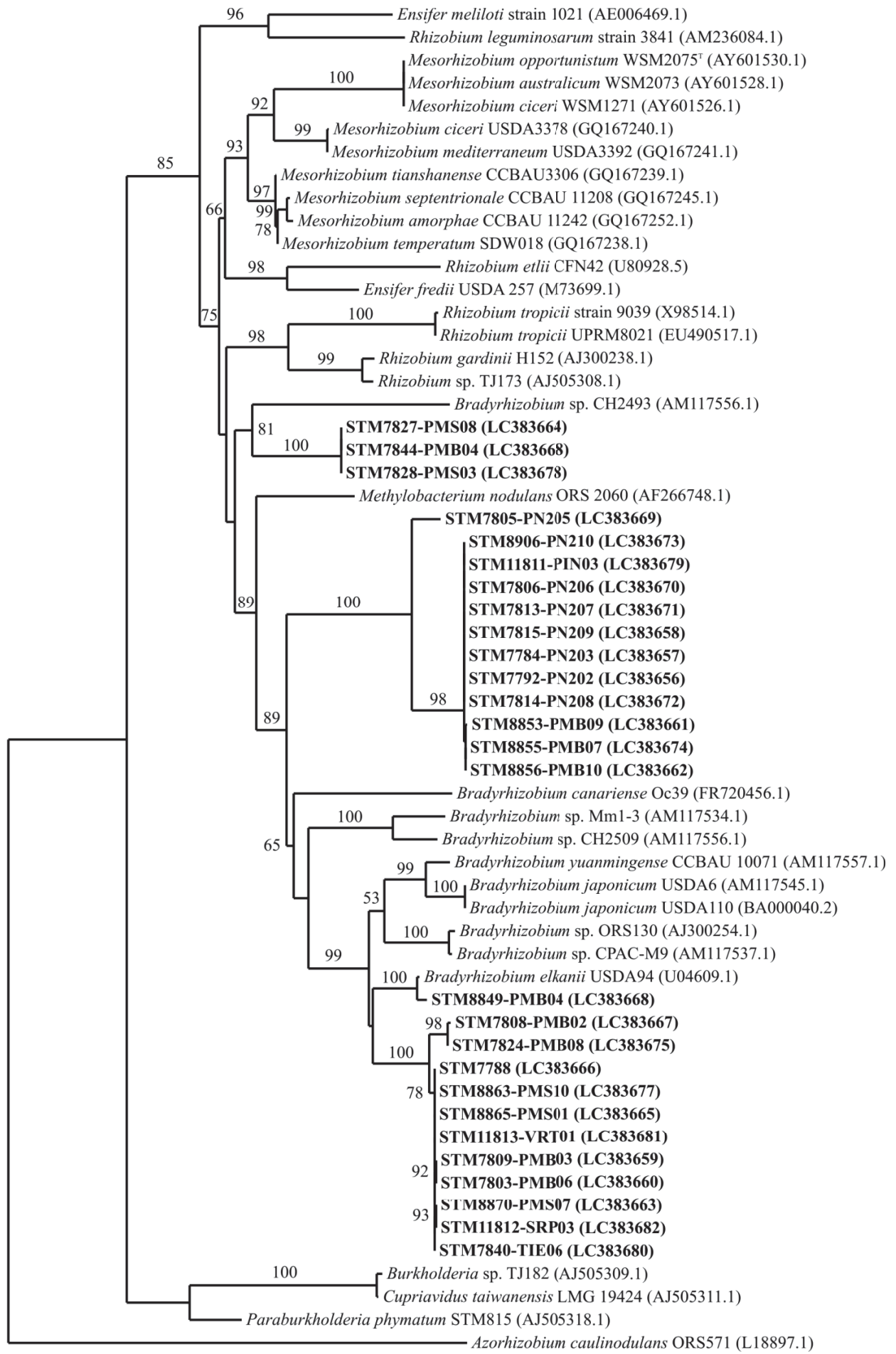


Figure 5: Rooted phylogenetic tree of *Bradyrhizobium* sp. symbionts of *Acacia spirorbis* and related species. The tree was inferred from sequences of the gene *nodA*. Numbers at node represent bootstrap percentages from 1000 replicates (shown only when > 50%). Strains isolated in this study (New Caledonia) are in bold. Scale bar indicates numbers of

193 Symbiotic efficiency of each strain was measured from *in vitro* cultures after 2 months. The
194 nitrogenase activity was assessed by using the Acetylene Reduction Assay (ARA), as described by
195 Miché *et al.* (2010). Dry biomasses of the shoots and roots of *A. spirorbis* seedlings were weighted
196 after incubation in an oven at 60°C for 48h. On each seedling, all the nodules were numbered and
197 weighted. Raw values of nitrogen fixation are expressed in μmol of ethylene formed by hour and by
198 sample ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$ per sample). In addition, the nitrogen fixation efficiency was expressed in milligrams
199 of nodules dry weight required to produce 100 mg of shoots dry weight.

200

201 4.4.2.6 Metal tolerance tests

202

203 The tolerance of each bacterial strain to Al, Co, Cr, Fe, Mn and Ni were tested to assess the
204 half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) according to Maier (2015). Bacterial strains were grown
205 in 96-well microplates filled with 200 μL per well of YM medium (Vincent, 1970). Each metal was
206 supplemented as follow: for Al, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ was added so that final concentrations of Al reach 0.1, 0.5,
207 1, 5, 10 to 39 mM; for Co, CoCl_2 was added so that final concentrations of Co reach 0.01, 0.05, 0.1,
208 0.5, 1, 5, 10 and 50 mM), for Cr, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ was added so that final concentrations of Cr reach 0.02, 0.1,
209 0.2, 1, 2, 10, 20 and 100 mM), for Ni, NiCl_2 was added so that final oncentrations of Ni reach 0.01,
210 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 and 50 mM), for Mn, MnCl_2 was added so that final concentrations of Mn reach
211 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 and 50 mM), for Fe, FeCl_3 was added so that final concentrations of Fe
212 reach 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 and 50 mM. Cultures of rhizobia were calibrated at $\text{OD}_{\lambda,600\text{nm}} = 1$
213 using an Infinite M200 microplate spectrophotometer (TECAN, Männedorf, Switzerland) and
214 incubated under agitation at 28°C up to 6 days. Bacterial growth was followed by optical density (OD)
215 measures at $\lambda = 600$ nm after 0, 1050, 1440, 2430 and 2880 min, post-inoculation. Controls
216 correspond to bacterial strains in YM medium (Vincent, 1970) without supplemented metal.

217

218 4.4.2.7 Statistical analyses

219

220 Statistical analyses were carried out with the R software (R development Core Team 2008),
221 using the “RVAideMemoire” package, version 0.9-54, available at the following link: [http://CRAN.R-](http://CRAN.R-project.org/package=RVAideMemoire)
222 [project.org/package=RVAideMemoire](http://CRAN.R-project.org/package=RVAideMemoire) and the package “agricolae”, version 1.2-3, available at
223 <http://CRAN.R-project.org/package=agricolae>. Non-parametric tests were used when data did not
224 follow a normal distribution. Correlations between numerical variables were assessed using a non-
225 parametric Spearman’s rank correlation test. Kruskal-Wallis test were used to evaluate the effect of a
226 factor on a given numerical parameter. When a factor was found to have a significant effect ($P < 0.05$)
227 on a given parameter, pairwise Wilcoxon rank sum tests were applied at a confidence level of 0.05
228 (Houlès *et al.*, 2018; Vincent *et al.*, 2018) Principal component analyses (PCA) were performed to

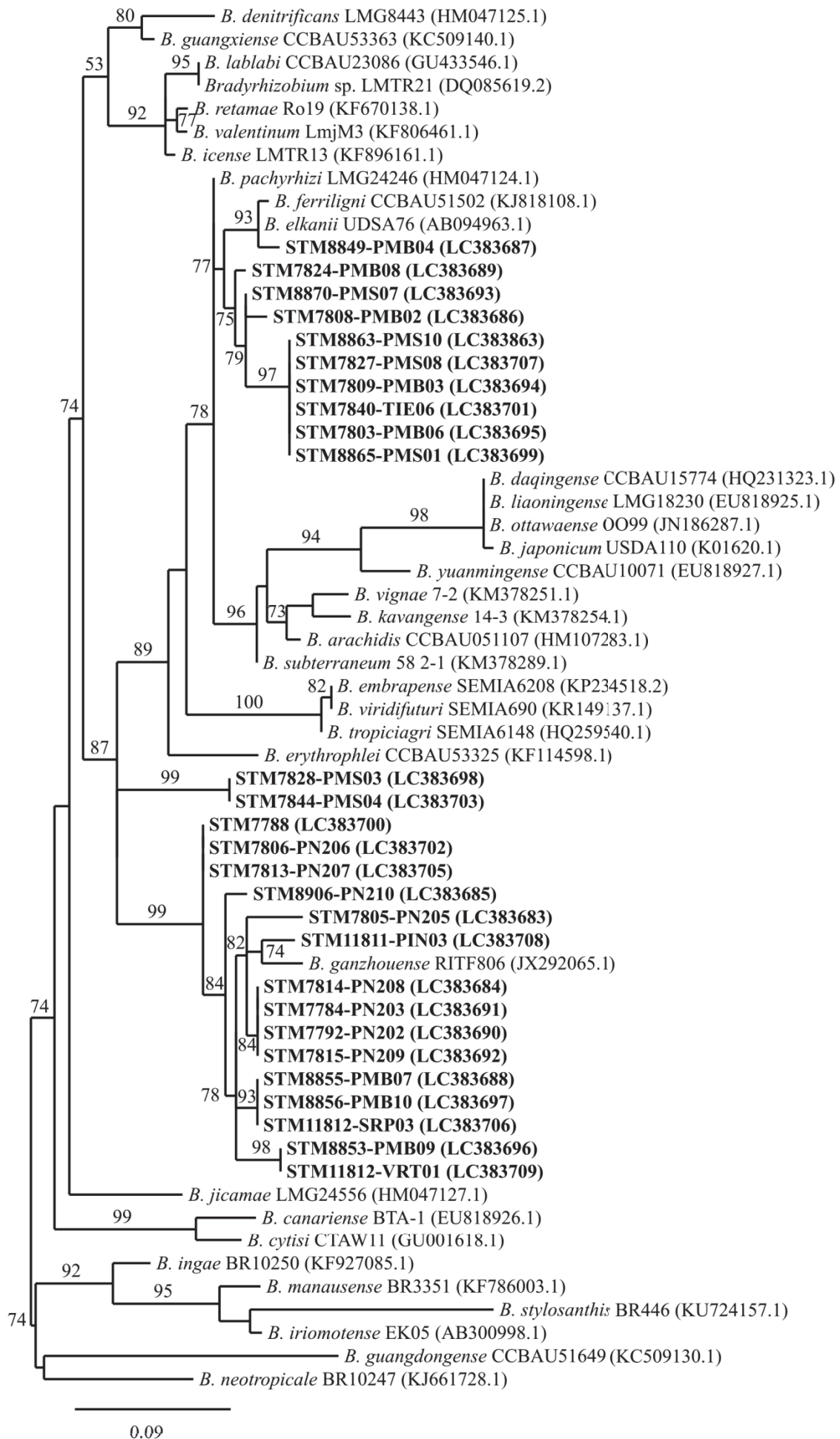


Figure 6: Unrooted phylogenetic tree of *Bradyrhizobium* sp. symbionts of *Acacia spirorbis* and related species. The tree was inferred from sequences of the gene *nifH*. Numbers at node represent bootstrap percentages from 1,000 replicates (shown only when > 50 %). Strains isolated in this study (New Caledonia) are in bold. Scale bar indicates numbers of substitutions per site.

230 analyze the distribution of the bacteria symbiotic efficiency and heavy metal tolerance according to the
231 bacterial genus, the soil type (UF or VS) and the combination between genus and soil type.
232 In the following text, the term “strains from UF or VS” is an abbreviation for rhizobial strains isolated
233 from nodules grown in UF or VS soils.

234

235 4.4.2.8 Nucleotide sequence accession numbers

236

237 Partial sequences have been deposit in the DDJB database (Supplementary Table 2 and 3).
238 Accession number for *Bradyrhizobium*: LC383474 to LC383500 for the 16S rRNA gene; LC383501
239 to LC383527 for the *atpD* gene; LC383555 to LC383581 for the *dnaK* gene; LC383528 to LC383554
240 for the *recA* gene; LC383656 to LC383682 for the *nodA* gene; LC383683 to LC383709 for the *nifH*
241 gene (Supplementary Table 2). Accession number for *Paraburkholderia*: LC383582 to LC383594 for
242 the 16S rRNA gene; LC383595 to LC383607 for the *atpD* gene; LC383608 to LC383619 for the *gyrB*
243 gene; LC383620 to LC383632 for the *recA* gene; LC387618 to LC387630 for the *nodA* gene
244 Supplementary Table 3).

245

246 4.4.3 Results

247

248 4.4.3.1 Soil properties of the studied sites

249

250 The soil properties of the eight studied sites are reported in Table 2 and Supplementary Figure
251 1. As revealed by a principal component analysis (Supplementary Figure 1), the eight studied sites can
252 be grouped in two contrasted soil types: ultramafic (UF) and volcano-sedimentary (VS) soils,
253 according to their chemical composition (Table 2).

254 The UF soils from the study sites of Pindaï, Pandanus 1, Pandanus 2 and Tiébaghi present significantly
255 higher concentrations of metallic elements than the VS soils from Poum Malabou, Poum Silice,
256 Serpent and Vertisol (Table 2).

257 Contents of cobalt ranged from 517 ± 109 to 797 ± 404 mg.kg⁻¹ on UF soils and from nil (inferior to
258 0.01 mg.kg⁻¹) to 98 ± 11 mg.kg⁻¹ on VS soils (Table 2). Chromium contents ranged from $15,047 \pm$
259 $1,035$ to $31,598 \pm 8,648$ mg.kg⁻¹ on UF soils and from 344 ± 3 to 1509 ± 116 mg.kg⁻¹ on VS soils
260 (Table 2). Iron contents ranged from $289,175 \pm 38,305$ to $508,175 \pm 2,895$ mg.kg⁻¹ on UF soils and
261 from 103 ± 69 to $89,865 \pm 1,425$ mg.kg⁻¹ on VS soils (Table 2). Manganese contents ranged from
262 $4,453 \pm 371$ to $19,238 \pm 2,118$ mg.kg⁻¹ on UF soils and from 2 ± 0.8 to $1,178 \pm 124$ mg.kg⁻¹ on VS
263 soils (Table 2). Nickel contents ranged from $2,650 \pm 28$ to $8,230 \pm 1,521$ mg.kg⁻¹ on UF soils and from
264 31 ± 11 to $1,792 \pm 105$ mg.kg⁻¹ on VS soils (Table 2). The silicium content differs between VS and
265 UF, ranging from $209,353 \pm 6,289$ to $431,537 \pm 8,276$ mg.kg⁻¹ on VS soils and from $17,695 \pm 445$ to
266 $146,415 \pm 3,025$ mg.kg⁻¹ on UF soils (Table 2).

267
268
269

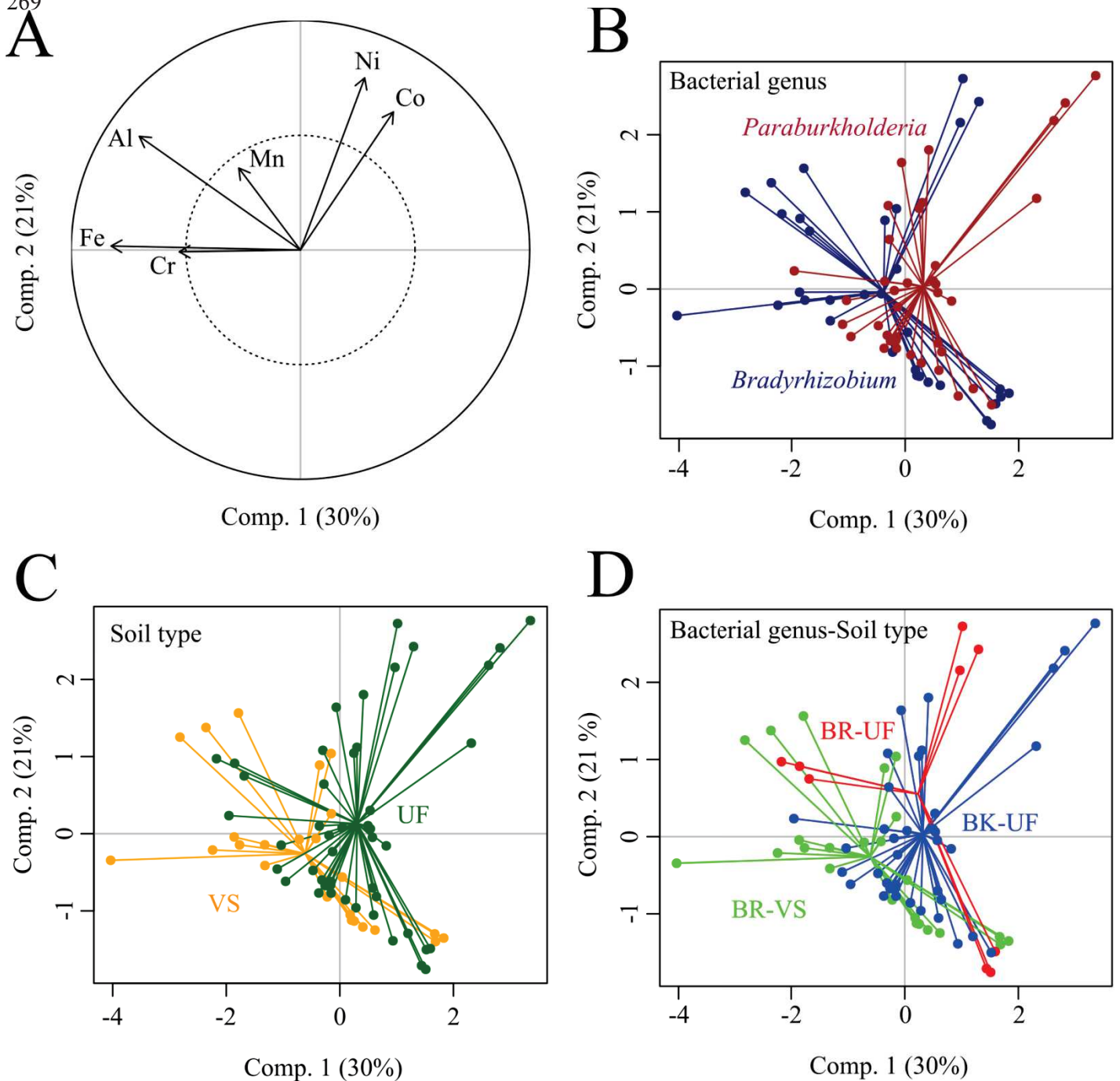


Figure 7: Principal Component Analysis (PCA) of the metal tolerance of the rhizobial strains isolated from *A. spirorbis* nodules. The Figure 7A displays the circle of correlation of the PCA and the percentage of total variation explained by each axis. Data are presented according to the bacterial genus of the rhizobia identified (Figure 7B), the soil type where rhizobia were isolated (Figure 7C) and the combination between the rhizobial genus and the soil type (Figure 7D).

Numerical parameters included in this analysis were the metal IC_{50} for six metals (Ni, Cr, Co, Fe, Mn and Al).

Abbreviations: UF: ultramafic soils; VS: volcano-sedimentary soils; BK-UF: *Paraburkholderia* from ultramafic soils; BR-UF: *Bradyrhizobium* from ultramafic soils; BR-VS: *Bradyrhizobium* from volcano-sedimentary soils.

270 4.4.3.2 Molecular characterization of the strains

271

272 A total of 40 strains were isolated from root nodules of *A. spirorbis*. Analyses of the
273 phylogenetic data based on analyses of the 16S rDNA sequences showed that these rhizobial strains
274 either belong to the genus *Bradyrhizobium* or *Paraburkholderia* (Figure 2 and Figure 3,
275 Supplementary Figures 1 and 5). On 40 strains, 67.5% belonged to the genus *Bradyrhizobium* and
276 32.5% to the genus *Paraburkholderia*. All 13 *Paraburkholderia* sp. strains were exclusively found on
277 UF soils, while 16 and 11 strains of *Bradyrhizobium* sp. strains were isolated from VS and UF soils,
278 respectively.

279 Two trees were inferred based on concatenated sequences of four molecular markers
280 according to the rhizobial genus: one phylogenetic tree for *Bradyrhizobium* sp. strains (Figure 2) and
281 one other *Paraburkholderia* sp. strains (Figure 3). All DNA sequences were deposited in the DDJB
282 (Supplementary Table 2 for *Bradyrhizobium* and Supplementary Table 3 for *Paraburkholderia*
283 strains).

284 For the *Bradyrhizobium* sp. strains, a phylogenetic tree was constructed based on the
285 concatenate sequences of the 16S rRNA gene (LC383474 to LC383500), the *atpD* gene (LC383501 to
286 LC383527), the *dnaK* gene (LC383555 to LC383581) and the *recA* gene (LC383528 to LC383554)
287 (Figure 2).

288 The multilocus analyses showed that the strains of *Bradyrhizobium* sp. clustered into 3
289 putative major groups (Figure 2). Group 1 gathers 5 strains from 2 studied sites (PMS and PN2) and
290 formed a cluster next to *Bradyrhizobium pachyrhizi*. Group 2 gathers 3 strains from PMB, next to
291 *Bradyrhizobium guangdongense*. Group 3 gathers 8 strains from 3 study sites (PMB, PN2 and TIE)
292 and formed a cluster next to *Bradyrhizobium yuanmingense*. No links were found between these
293 groups and the soil type.

294 For the *Paraburkholderia* sp. strains, a phylogenetic tree was constructed based on the
295 concatenate sequences of the 16S rRNA gene (LC383582 to LC383594), the *atpD* gene (LC383608 to
296 LC383619), the *gyrB* gene (LC383608 to LC383619) and the *recA* gene (LC383620 to LC383632).
297 The multilocus analysis (Figure 3) showed that the strains of *Paraburkholderia* sp. clustered into one
298 homogeneous putative group except for one strain. A total of 12 strains of *Paraburkholderia* sp.
299 isolated from *A. spirorbis* nodules formed a cluster next to *Paraburkholderia phenoliruptix*, while the
300 strain STM11820-TIE04 is close to *Paraburkholderia phenazinium* (Figure 3).

301

302 4.4.3.3 Symbiotic efficiency of *Bradyrhizobium* and *Paraburkholderia* strains.

303

304 *In vitro* experiments showed that *Bradyrhizobium* and *Paraburkholderia* strains presented in
305 this study were able to form nodules on *A. spirorbis* seedlings. Full data are given in Supplementary
306 Table 6 and 7, for *Bradyrhizobium* sp. and *Paraburkholderia* sp. strains, respectively). Summarized

307

308

309

Table 3: Occurrence of the metal tolerance genes: nickel and cobalt resistance gene (*cnrA*) and nickel resistance gene (*nreB*) among the rhizobial strains isolated from *A. spirorbis* root nodules in ultramafic and volcano-sedimentary soils. Results are given by a ratio (presence : absence) of the metal resistance genes *cnrA* and *nreB* among all strains. The strains were grouped according to the soil type, bacterial genus and combination between bacterial genus and soil type.

Metal resistance gene	Soil type		Bacterial genus		Bacterial genus – Soil type		
	UF	VS	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Paraburkholderia</i>	BK-UF	BR-VS	BR-UF
<i>cnrA</i>	12 : 12	4 : 12	6 : 21	10 : 3	10 : 3	4 : 12	2 : 9
<i>nreB</i>	11 : 13	3 : 13	5 : 22	9 : 4	9 : 4	3 : 13	2 : 9

Abbreviations: UF: ultramafic soils; VS: volcano-sedimentary soils; BK-UF: *Paraburkholderia* strains from ultramafic soils; BR-VS: *Bradyrhizobium* strains from non-metalliferous soils; BR-UF: *Bradyrhizobium* strains from metalliferous soils.

310 data are reported in Supplementary Table 8. An overview of the data is presented in Figure 4 with a
311 principal component analysis (PCA). This PCA includes each numerical parameter measured in the *in*
312 *vitro* experiment (N₂ fixation, efficiency, number of nodules and dry weight of shoots, roots and
313 nodules). The relationship between these parameters is presented in a circle of correlation (Figure 4A).
314 The data of the symbiotic efficiency of *Bradyrhizobium* and *Paraburkholderia* strains inoculated on *A.*
315 *spirorbis* seedlings are visualized according to the bacterial genus in Figure 4B.

316 The nodule dry weight required to form 100 mg of shoot dry weight is significantly higher (P
317 < 0.05) with *Bradyrhizobium* strains (13.6 ± 6.9 mg) than *Paraburkholderia* strains (5.9 ± 2.1 mg)
318 (Figure 4A and 4B). *Acacia spirorbis* seedlings inoculated with *Bradyrhizobium* strains presented
319 higher ($P < 0.05$) nodule dry weights and numbers (3.9 ± 1.5 mg and 8.3 ± 3.9 nodules, respectively)
320 than *Paraburkholderia* strains (1.9 ± 0.9 mg and 3.1 ± 1.6 nodules, respectively in Supplementary
321 Table 8).

322 Molecular data regarding the gene *nodA* found in *Bradyrhizobium* and *Paraburkholderia*
323 strains are reported in Figure 5 and Supplementary Table 10 and 11. *Bradyrhizobium* sp. strains
324 isolated in this study presented three major groups of the gene *nodA* (Figure 5). Group 1 of *nodA*
325 gathers 3 strains from VS soils and clustered next to *Bradyrhizobium* sp., strain CH2493 (Figure 5).
326 Group 2 of *nodA* gathers a total of 12 strains distributed between UF soils (at 75 %) and VS soils (at
327 25 %) and clustered between *Methylobacterium nodulans* and *Bradyrhizobium canariense* (Figure 5).
328 Group 3 of *nodA* gathers a total of 12 strains distributed between UF soils (at 17 %) and VS soils (at
329 83 %) and clustered next to *Bradyrhizobium elkanii* (Figure 5). *Paraburkholderia* sequences of *nodA*
330 were too dissimilar to include other references of *nodA* sequences and BLAST results for each
331 *Paraburkholderia nodA* sequence are given in Supplementary Table 11. All sequences of beta-
332 rhizobial *nodA* from this study matched with chromosome 1 sequences of *Paraburkholderia*, notably
333 with *Paraburkholderia phenolruptix* (Supplementary Table 11).

334 The nitrogen fixation assessed by the ARA test showed that every strain was also able to
335 reduce acetylene to ethylene thus confirming the nitrogen fixation capacity (Supplementary Table 6
336 and 7 for *Bradyrhizobium* and *Paraburkholderia* strains, respectively). The nitrogen fixation of
337 *Bradyrhizobium* and *Paraburkholderia* strains is equivalent, with averages of 0.13 ± 0.07 and $0.14 \pm$
338 0.08 μmol of ethylene per plant per hour, respectively (Supplementary Table 8).

339 Molecular data regarding the gene *nifH* found in *Bradyrhizobium* strains are reported in Figure
340 6. Two major putative groups were identified. Group 1 gathers 10 strains from 3 study sites (PMB,
341 PMS and TIE) and formed a cluster next to *Bradyrhizobium elkanii* (Figure 6). Group 2 gathers 17
342 strains from 5 study sites (PMB, PMS, PN2, SRP and VRT) and formed a cluster next to
343 *Bradyrhizobium ganzhouense* (Figure 6). Molecular data of *Paraburkholderia nifH* sequences are still
344 pending.

345 Plant biomass was equivalent with the inoculation of *Bradyrhizobium* or *Paraburkholderia*
346 strains, with (i) shoot dry weights of 30.6 ± 7.9 and 32.6 ± 6.2 mg, respectively and (ii) root dry

Supplementary Table 1: List of the primers used for the PCR amplifications and DNA sequencing. The upper part of the table contains primers used for molecular diversity. The middle part of the table presents the primers used for the nitrogen-fixing characterization. The bottom part of the table presents primers used for the presence of metal tolerance genes.

Gene	Primer name	Sequence	Reference
16s rRNA gene	16S-370-f	GGCAGCAGTGGGGAATATTG	Sy <i>et al.</i> , 2001
	16S-1080-r	GGGACTTAACCCAACATCT	
<i>dnaK</i> (α -rhizobia)	TSdnaK3	AAGGAGCAGCAGATCCGCATCCA	Stepkowski <i>et al.</i> , 2003
	TSdnaK2	GTACATGGCCTCGCCGAGCTTCA	
<i>gyrB</i> (β -rhizobia)	gyrBF-Spilker	ACCGGTCTGCAYCACCTCGT	Spilker <i>et al.</i> , 2009
	gyrBR-Spilker	YTCGTTGWARCTGTCGTTCCACTGC	
<i>atpD</i> (α -rhizobia)	atpD352F	GGCCGCATCATSAACGTCATC	Martens <i>et al.</i> , 2008
	atpD871R	AGAGCCGACACTTCMGARCC	
<i>atpD</i> (β -rhizobia)	atpD-BurkF	ATGAGTACTRCTGCTTTGGTAGAAGG	Payne <i>et al.</i> , 2005
	atpD-BurkR	CGTGAAACGGTAGATGTTGTCG	
<i>recA</i> (α -rhizobia)	recAf	ATCGAGCGGTCGTTCCGGCAAGGG	Gaunt <i>et al.</i> , 2001
	recAr	CGRATCTGGTTGATGAAGATCACCAT	
<i>recA</i> (β -rhizobia)	recA-BurkF	AGGACGATTCATGGAAGAWAGC	Spilker <i>et al.</i> , 2009
	recA-BurkR	GACGCACYGAYGMRTAGAACTT	
<i>nodA</i> (α -rhizobia)	NODA1F	TGCRGTGGAARNTRBVYTGGA	Ba <i>et al.</i> , 2002
	NODAB1r	GGNCCGTCRTCRAASGTCARGTA	
<i>nodA</i> (β -rhizobia)	nodA-Bf	GAGGGTGGTCGAAGTTGGG	Liu <i>et al.</i> , 2012
	nodA-Br	GCGTAGGAGGTAAGTCAAGATG	
<i>nifH</i> (α -rhizobia)	nifHrhizo1F	TACGGNAARGGSGGNATCGGCAA	Laguerre <i>et al.</i> , 2001
	nifHrhizo1R	AGCATGTCTCSAGYTCNTCCA	
<i>nifH</i> (β -rhizobia)	nifD	TC(AGT)CC(AG)CC(AG)AT(AG)TTGTA(AG)TC	Yun and Slazay, 1984
	nifH(for2)	GGITGTGAYCCNAAVGCNGA	Frey-Klett <i>et al.</i> , 2004
<i>cnrA</i>	cnrA1f	AACAAGCAGGTSCAGATCAAC	Chaintreuil <i>et al.</i> , 2007
	cnrA2r	TGATCAGGCCGAAGTCSAGCG	
<i>nreB</i>	nreB-425F	CCTTCACGCCGACTTTCCAG	Chaintreuil <i>et al.</i> , 2007
	nreB-1179R	CGGATAGGTAATCAGCCAGCA	

347

348

349 weights of 20.3 ± 3.5 and 19.6 ± 3.5 mg, respectively (Supplementary Table 8). A matrix of
350 correlation between numerical parameters is reported in Supplementary Table 9.

351

352 4.4.3.4 Symbiotic efficiency of the strains in relationship with the soil type

353

354 In addition of the symbiotic efficiency between bacterial genera, the data of the symbiotic
355 efficiency of each strains inoculated on *A. spirorbis* seedlings are visualized according to their original
356 soil type (Figure 4C) and the combination between their original soil type and their bacterial genus
357 (Figure 4D).

358 Strains of BK-UF and BR-VS presented nitrogen fixation values respectively of 0.14 ± 0.09
359 and $0.17 \pm 0.04 \mu\text{mol.h}^{-1}$ per sample, which are significantly two times higher ($P < 0.05$) than strains
360 of BR-UF with an average of $0.08 \pm 0.07 \mu\text{mol.h}^{-1}$ per sample (Figure 4D and Supplementary Table 8).
361 The shoot dry weights of *A. spirorbis* seedlings inoculated with the strains BK-UF and BR-VS
362 presented values of respectively 32.6 ± 6.2 and 33.4 ± 8.3 mg, which are significantly 24 % higher (P
363 < 0.05) than strains of BR-VS with an average of 26.1 ± 4.3 mg (Figure 4D; Supplementary Table 8).
364 Results of the nitrogen fixation and shoot dry weight are convergent and statistically confirmed by a
365 strong positive correlation ($P < 0.001$ and $r = 0.56$; Supplementary Table 9).

366 Strains of BR-VS and BR-UF formed significantly ($P < 0.05$) more nodules (7.5 ± 3.9 and 8.8
367 ± 4.3 nodules, respectively) than BK-UF strains with an average of 3.2 ± 1.5 nodules (Figure 4D;
368 Supplementary Table 8). In addition, the nodule dry weights of BR-VS and BR-UF strains are
369 significantly ($P < 0.05$) higher (3.5 ± 1.4 and 4.2 ± 1.7 mg, respectively) than BK-UF strains with 2.0
370 ± 0.8 mg (Figure 4D; Supplementary Table 8). However, the efficiency of the BR-UF, BR-VS and
371 BK-UF strains corresponds to 3 significantly distinct levels (at a confidence level of $P < 0.05$) with
372 16.9 ± 7.4 , 11.3 ± 5.6 and 5.9 ± 2.1 mg of nodules required to form 100 mg of *A. spirorbis* seedlings
373 shoots (Figure 4D; Supplementary Table 8).

374

375 4.4.3.5 Metal tolerance of *A. spirorbis* symbionts

376

377 Rhizobial trace metal tolerances were assessed in relation to metal contents found in UF and
378 VS soils: aluminum, cobalt, chromium, iron, manganese and nickel. Summarized data (means of IC_{50}
379 expressed in mM or $\mu\text{M} \pm \text{stdv}$) are given in Supplementary Table 10 and visualized by a PCA in
380 Figure 7. This PCA includes each numerical parameter measured in the *in vitro* experiment (strains
381 IC_{50} for six metals). The relationship between these parameters is presented in a circle of correlation
382 (Figure 7A). The data of the metal tolerance of *Bradyrhizobium* and *Paraburkholderia* strains are
383 visualized according to the bacterial genus in Figure 7B. In addition, a matrix of correlation between
384 metals IC_{50} is given in Supplementary Table 11 in order to check correlations between strains metal
385 IC_{50} .

386
387
388
389

Supplementary Table 2: Accession numbers of 16SrRNA, *dnaK*, *atpD*, *recA*, *nodA* and *nifH* DNA sequences of the *Bradyrhizobium* strains as deposited in the DDJB database.

Strain	16S rRNA	<i>dnaK</i>	<i>atpD</i>	<i>recA</i>	<i>nodA</i>	<i>nifH</i>
STM7792-PN202	LC383474	LC383557	LC383501	LC383530	LC383656	LC383690
STM7784-PN203	LC383475	LC383559	LC383502	LC383531	LC383657	LC383691
STM7805-PN205	LC383476	LC383562	LC383522	LC383540	LC383669	LC383683
STM7806-PN206	LC383477	LC383569	LC383518	LC383541	LC383670	LC383702
STM7808-PMB02	LC383478	LC383572	LC383510	LC383545	LC383667	LC383686
STM8849-PMB04	LC383479	LC383575	LC383511	LC383546	LC383668	LC383687
STM7824-PMB08	LC383480	LC383574	LC383521	LC383548	LC383675	LC383689
STM7815-PN209	LC383481	LC383564	LC383503	LC383537	LC383658	LC383692
STM11811-PIN03	LC383482	LC383568	LC383515	LC383554	LC383679	LC383708
STM7809-PMB03	LC383483	LC383561	LC383523	LC383532	LC383659	LC383694
STM7803-PMB06	LC383484	LC383563	LC383504	LC383533	LC383660	LC383695
STM8853-PMB09	LC383485	LC383567	LC383516	LC383551	LC383661	LC383696
STM8856-PMB10	LC383486	LC383578	LC383525	LC383552	LC383662	LC383697
STM8865-PMS01	LC383487	LC383570	LC383507	LC383534	LC383665	LC383699
STM7844-PMS04	LC383488	LC383576	LC383512	LC383549	LC383676	LC383703
STM8870-PMS07	LC383489	LC383579	LC383505	LC383535	LC383663	LC383693
STM7827-PMS08	LC383490	LC383556	LC383506	LC383528	LC383664	LC383707
STM8863-PMS10	LC383491	LC383571	LC383514	LC383550	LC383677	LC383704
STM11812-SRP03	LC383492	LC383560	LC383508	LC383529	LC383682	LC383706
STM11813-VRT01	LC383493	LC383555	LC383509	LC383536	LC383681	LC383709
STM7828-PMS03	LC383494	LC383577	LC383527	LC383553	LC383678	LC383698
STM7788	LC383495	LC383573	LC383526	LC383538	LC383666	LC383700
STM7813-PN207	LC383496	LC383580	LC383519	LC383542	LC383671	LC383705
STM7814-PN208	LC383497	LC383565	LC383520	LC383543	LC383672	LC383684
STM8855-PMB07	LC383498	LC383581	LC383524	LC383547	LC383674	LC383688
STM8906-PN210	LC383499	LC383566	LC383513	LC383544	LC383673	LC383685
STM7840-TIE06	LC383500	LC383558	LC383517	LC383539	LC383680	LC383701

390 The *Bradyrhizobium* strains presented a significantly higher metal IC₅₀ values for Cr, Co, Fe
391 and Al than the *Paraburkholderia* strains (Supplementary Table 10). Indeed the *Paraburkholderia*
392 strains from UF soils (BK-UF) tolerated Ni, Cr, Co, Fe, Mn and Al with IC₅₀ values of 449 ± 471, 110
393 ± 107, 564 ± 1065, 2123 ± 499 μM, 17.3 ± 15.0 and 12.0 ± 4.01 mM, respectively.

394
395 In addition of the metal tolerance between bacterial genera, the data of the metal tolerance of
396 each strains isolated from *A. spirorbis* nodules are presented according to their original soil type
397 (Figure 7C) and the combination between their original soil type and their bacterial genus (Figure 7D).
398 A relationship was found between the soil type and strains IC₅₀, because strains of BR-UF and BR-VS
399 presented contrasted results according to heavy metal and soil type. The *Bradyrhizobium* strains from
400 UF soils (BR-UF) tolerated Ni, Cr, Co, Fe, Mn and Al with IC₅₀ values of 711 ± 904, 100 ± 52, 247 ±
401 101, 2347 ± 642 μM, 24.2 ± 15.0 and 26.7 ± 10.7 mM, respectively (Supplementary Table 10). In
402 comparison with BR-UF, the *Bradyrhizobium* strains from VS soils (BR-VS) tolerated significantly (P
403 < 0.05) less Ni (358 ± 281 μM), more Cr and Al (468 ± 546 μM and 18.5 ± 10.1, respectively),
404 equally Co, Fe and Mn with 259 ± 163, 2533 ± 832 μM and 23.1 ± 16.5 mM, respectively
405 (Supplementary Table 10).

406
407 The occurrence of two metal resistance genes (*cnrA* and *nreB*) have been investigated and
408 reported in Table 3. The *cnrA* and *nreB* genes were detected in average 2 times more in
409 *Paraburkholderia* strains (10 and 9 times more, respectively) than *Bradyrhizobium* strains (6 and 5
410 times more, respectively) (Table 3). *Bradyrhizobium* strains from VS and UF soils presented similar
411 metal resistance gene ratio (presence : absence) with 4 : 12 and 2 : 9 for the gene *cnrA*, respectively
412 and 3 : 13 and 2 : 9 for the gene *nreB*, respectively. Metal resistance genes *cnrA* and *nreB* have been
413 detected more often in strains isolated from UF soils (12 : 12 and 11 : 13, respectively) than strains
414 isolated from VS soils (4 : 12 and 3 : 13, respectively; Table 3). Strains presented in this study showed
415 no statistical links between their IC₅₀ values and the occurrence of *cnrA* and *nreB* genes.

416
417
418
419
420
421
422
423
424

Supplementary Table 3: Accession numbers of 16SrRNA, *gyrB*, *atpD*, *recA*, *nodA* and *nifH* DNA sequences of the *Paraburkholderia* strains as deposited in the DDJB database.

Strains	16S rRNA	<i>gyrB</i>	<i>atpD</i>	<i>recA</i>	<i>nodA</i>	<i>nifH</i>
STM11814-PIN01	LC383587	LC383613	LC383596	LC383621	LC387618	pending
STM11815-PIN02	LC383588	LC383614	LC383597	LC383627	LC387627	pending
STM11816-PIN04	LC383594	LC383615	LC383598	LC383622	LC387624	pending
STM11817-PIN05	LC383584	LC383609	LC383599	LC383623	LC387625	pending
STM11818-PIN06	LC383585	LC383616	LC383600	LC383624	LC387619	pending
STM11819-TIE03	LC383586	LC384892	LC383595	LC383620	LC387621	pending
STM11820-TIE04	LC383593	LC383617	LC383606	LC383625	LC387626	pending
STM11821-TIE05	LC383589	LC383608	LC383601	LC383626	LC387622	pending
STM11822-TIE07	LC383590	LC383610	LC383604	LC383628	LC387630	pending
STM11823-TIE08	LC383591	LC383618	LC383603	LC383629	LC387623	pending
STM11824-TIE09	LC383583	LC383619	LC383602	LC383630	LC387629	pending
STM11825-TIE10	LC383592	LC383612	LC383605	LC383631	LC387620	pending
STM11826-PN101	LC383582	LC383611	LC383607	LC383632	LC387628	pending

427 4.4.4 Discussion

428

429 4.4.4.1 The broad symbiotic promiscuity of *Acacia spirorbis*

430

431 Natural populations of *Acacia spirorbis* establish nitrogen-fixing symbioses with alpha- and
432 beta-rhizobia on ultramafic and volcano-sedimentary soils. Among the diversity of *Acacia* species,
433 only a few of them are known to harbor such a broad symbiotic promiscuity.

434 *Bradyrhizobium* sp. symbionts found in *Acacia spirorbis* nodules reveal a broad range as they
435 present similarities with nine diverse *Bradyrhizobium* species (Figure 2). Ten strains clustered with *B.*
436 *yuanmingense* isolated from *Lespedeza* sp. (Yao *et al.*, 2002). Five strains clustered with *B. pachyrhizi*
437 isolated from *Pachyrhizus erosus* (Ramírez-Bahena *et al.*, 2009). Three strains clustered with *B.*
438 *guangdongense* isolated from *Arachis hypogea* (Li *et al.*, 2015). Two strains clustered with *B.*
439 *tropiciagri* isolated from *Neonotonia wightii* (Delamuta *et al.*, 2015). Two strains clustered with *B.*
440 *cytisi* isolated from *Cytisus villosus* (Chahboune *et al.*, 2011). One strain clustered with *B. embrapense*
441 isolated from *Desmodium heterocarpon* (Delamuta *et al.*, 2015). One strain clustered with *B. elkanii*
442 isolated from *Glycine max* (Kuykendall *et al.*, 1992). One strain clustered with *B. huanghuaihaiense*
443 isolated from *Glycine max* (Zhang *et al.*, 2012). Lastly, two strains (STM7828-PMS03 and STM7844-
444 PMS04) clustered far from known *Bradyrhizobium* species, indicating a putative new species of
445 *Bradyrhizobium* still to be described (Figure 2).

446 The symbiotic promiscuity of *Acacia spirorbis* shares a common pattern with Australian
447 acacias. On their native soil, these acacias establish nitrogen-fixing symbioses mostly with
448 *Bradyrhizobium* species, notably with *B. japonicum*, while other acacias in Africa and America
449 displays mostly nitrogen-fixing symbioses with strains of *Rhizobium*, *Ensifer* and *Mesorhizobium*
450 (Lafay & Burdon, 2001; Leary *et al.*, 2006). Outside Australia, introduced phyllodinous *Acacia* spp.
451 such as *A. auriculiformis* Benth., *A. dealbata* Link, *A. longifolia* (Andrews) Willd., *A. mangium* Willd.
452 and *A. mearnsii* De Wild. maintain their symbiotic promiscuity with *Bradyrhizobium* species (Joubert,
453 2003; Weir *et al.*, 2004; Roux *et al.*, 2009). The symbiotic promiscuity of *A. spirorbis* involving alpha-
454 rhizobia is convergent with these studies, thus supporting the hypothesis that *A. spirorbis* subsp.
455 *spirorbis* originates from Australia (Richardson *et al.*, 2011).

456 Besides *Bradyrhizobium* species, *A. spirorbis* symbiotic promiscuity includes two putative
457 species of *Paraburkholderia* from the beta-rhizobia. Multilocus analysis revealed that *A. spirorbis*
458 beta-rhizobial symbionts clustered into (i) one homogenous group next to *P. phenoliruptix* and (ii) a
459 putative second group represented by one strain next to *P. phenazinium* (Figure 3). These molecular
460 data could putatively lead to the description of a new species of *Paraburkholderia* and need further
461 investigations like DNA-DNA hybridization analyses, physiological and biochemical tests, as
462 described by other studies (*e.g.*: De Meyer *et al.*, 2014; Guentas *et al.*, 2016).

463

Supplementary Table 4: Accession numbers of the references 16S rRNA, *dnaK*, *atpD* and *recA* DNA sequences of the alpha-rhizobial (mostly *Bradyrhizobium*) references strains used for inferring phylogenetic trees. The upper part of the table lists the sequences used for concatenated analyses. The lower part of the table includes references strains not used for concatenated analyses. Bold sequences correspond to sequences not included in phylogenetic trees based on one gene.

Reference strain	Type strain	16S rRNA	<i>dnaK</i>	<i>atpD</i>	<i>recA</i>
<i>B. betae</i>	LMG 21987	AY372184.1	AY923046.1	FM253129.1	AB353734.1
<i>B. canariense</i>	LMG 22265	AJ558025.1	AY923047.1	AY386739.1	FM253177.1
<i>B. cytisi</i>	LMG 25866	EU561065.1	KF532219.1	GU001613.1	GU001575.1
<i>B. daqingense</i>	LMG 26137	HQ231274.1	LM994144.1	HQ231289.1	HQ231270.1
<i>B. denitrificans</i>	LMG 8443	X66025.1	KF962685.1	FM253153.1	FM253196.1
<i>B. diazoefficiens</i>	USDA 110	NC_004463.1	AP014685.1	BA000040.2	BA000040.2
<i>B. elkanii</i>	LMG 6134	U35000.1	AY328392.1	AY386758.1	AY591568.1
<i>B. embrapense</i>	LMG 2987	AY904773.1	KP234519.2	HQ634875.1	HQ634899.1
<i>B. erythrophlei</i>	LMG 28425	KF114645.1	MG811656.1	NZ_FNTH01000001.1	KF114669.1
<i>B. guangdongense</i>	LMG 28620	KC508867.1	KC508964.1	KC508916.1	KC509269.1
<i>B. huanghuaihaiense</i>	LMG 26136	HQ231463.1	KF962686.1	HQ231682.1	HQ231595.1
<i>B. icense</i>	LMTR 13	KF896156.1	KF896182.1	KF896192.1	JX943615.1
<i>B. ingae</i>	BR 10250	KF927043.1	KF927055.1	KY753593.1	KF927061.1
<i>B. iriomotense</i>	LMG 24129	AB300992.1	JF308944.1	AB300994.1	AB300996.1
<i>B. japonicum</i>	LMG 6138	U69638.1	AM168362.1	AM168320.1	AM182158.1
<i>B. jicamae</i>	LMG 24556	AY624134.1	JF308945.1	FJ428213.1	HM047133.1
<i>B. kavangense</i>	LMG 28790	KP899562.1	KR259949.1	KY753592.1	KM378399.1
<i>B. lablabi</i>	LMG 25572	GU433448.1	KF962687.1	GU433473.1	GU433522.1
<i>B. liaoningense</i>	LMG 18230	AF208513.1	AY923041.1	AY386752.1	AY591564.1
<i>B. lupini</i>	LMG 28514	KM114861.1	AMQQ01000030.1	KU738808.1	KM114866.1
<i>B. namibiense</i>	LMG 28789	KX661401.2	KP402058.1	KX661387.1	KM378377.1
<i>B. oligotrophicum</i>	LMG 10732	JQ619230.1	KF962688.1	JQ619232.1	JQ619231.1
<i>B. ottawaense</i>	LMG 26739	JN186270.1	JF308816.1	HQ455212.1	HQ587287.1
<i>B. pachyrhizi</i>	LMG 24246	AY624135.1	JF308946.1	FJ428208.1	HM047130.1
<i>B. paxllaeri</i>	LMTR 21	AY923031.1	AY923038.1	KF896186.1	JX943617.1
<i>B. retamae</i>	LMG 27393	KC247085.1	LM994150.1	LM994396.1	LM994318.1
<i>B. rifense</i>	LMG 26781	EU561074.1	KF532220.1	GU001617.1	GU001585.1
<i>B. subterraneum</i>	LMG 28792	KP308152.1	KP308157.1	KX661391.1	KM378397.1
<i>B. tropiciagri</i>	LMG 28867	AY904753.1	FJ391008.1	FJ390968.1	FJ391168.1
<i>B. viridifuturi</i>	LMG 28866	FJ025107.1	KR149128.1	LGTB01000039.1	KR149140.1
<i>B. yuanmingense</i>	CCBAU 10071	AF193818.1	FJ514049.1	AY386760.1	AM168343.1
<i>Bosea thiooxidans</i>	LMG26210	NR_041994.1	FR871240.2	FR871211.1	FR871216.1
<i>B. vignae</i>	7-2	KP899563.1	NA	NA	KM378374.1
<i>B. manauense</i>	BR 3351	HQ641226.2	KF786001.1	NA	KF785992.1
<i>B. ganzhouense</i>	CCBAU 101088	JQ796661.2	NA	JX277182.1	JX277144.1
<i>B. americanum</i>	LMG 29514	KU991833.1	NA	KC247125.1	KC247141.1
<i>B. cajani</i>	LMG 29967	KY349447.1	NA	NA	KY349440.1
<i>B. centrosematis</i>	LMG 29515	KC247115.1	NA	KC247129.1	KC247145.1
<i>B. ferriligni</i>	CCBAU 51502	KJ818096.1	MG811657.1	NA	KJ818112.1
<i>B. neotropiale</i>	BR 10247	KF927051.1	KJ661693.1	NA	KJ661714.1
<i>B. stylosanthis</i>	BR 446	KU724142.1	KU724145.1	NA	KU724163.1
<i>Rhizobium etli</i>	USDA 9032	NA	NA	AJ294404.1	NA

464

465

466 The beta-rhizobia/leguminous symbiosis were first described in 2001 by Moulin *et al.* and
467 described as widespread in nature, including *Burkholderia sensu lato* and *Cupriavidus* (formerly
468 *Ralstonia*) species (Chen *et al.*, 2003). Recent studies showed that species of *Burkholderia sensus lato*
469 included human, animal and plant pathogenic species as well as plant beneficial and environmental
470 (PBE) species. Therefore, five distinct lineages were recently introduced: *Burkholderia sensus stricto*,
471 *Caballeronia*, *Paraburkholderia rhizoxinica*, *Paraburkholderia*, and *Robbsia* (Beukes *et al.*, 2017;
472 Lopes-Santos *et al.*, 2017). *Paraburkholderia* species correspond to plant-associated strains, including
473 free-living diazotrophs and symbiotic rhizobia (Sawana *et al.*, 2014). At first, *Paraburkholderia*
474 species were found to be the major symbionts of nitrogen-fixing symbioses among *Mimosa* spp. (47
475 different species tested in Bontemps *et al.*, 2010). Moreover, *Paraburkholderia* symbiotic promiscuity
476 involves leguminous plants such as *Anadenanthera* spp., *Cyclopia* spp., *Dalbergia* spp., *Lebeckia*
477 *ambigua*, *Macroptilium atropurpureum*, *Microlobius foetidus*, *Parapiptadenia* spp., *Phaseolus*
478 *vulgaris*, *Piptadenia* spp., *Podalyria canescens* and *Pseudopiptadenia* spp. (Rasolomampianina *et al.*,
479 2005; Elliott *et al.*, 2007; Bournaud *et al.*, 2013; De Meyer *et al.*, 2014).

480 So far, only few studies reported that one leguminous species is able to form symbioses with
481 alpha- and beta-rhizobia. One study from Brazil showed that *Mimosa* species such as *Mimosa*
482 *acutistipula* Benth., *Mimosa kalunga* M. F. Simon & C. E. Hughes, *Mimosa radula* Benth. and
483 *Mimosa xanthocentra* Mart. nodulated with alpha-rhizobial (*Rhizobium*) and beta-rhizobial
484 (*Paraburkholderia*) strains (dos Reis *et al.*, 2010).

485 Another recent study argued that *Vachellia karroo* (Hayne) Banfi & Galasso (formerly *Acacia*
486 *karroo*) from southern Africa also is able to establish symbioses with alpha- and beta-rhizobia (Beukes
487 *et al.*, 2018). However, tests of nodulation for each strain were not carried out, thus the nitrogen-fixing
488 ability of these beta-rhizobial strains remains unconfirmed (Beukes *et al.*, 2018). Caution is warranted
489 because beta-rhizobia are known to naturally occur inside nodules as endophytic bacteria, notably in
490 *Mimosa pudica* L., *Glycine max* (L.) Merr. and *Vachellia seyal* (Delille) P.J.H. Hurter Mabblerley's (ex
491 *Acacia seyal*) (Pandey *et al.*, 2005; Diouf *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008).

492

493 4.4.4.2 Relying on symbiotic promiscuity for adaptation to contrasted soils

494

495 In New Caledonia, *Acacia spirorbis* naturally establish nitrogen-fixing symbioses with local
496 rhizobia in ultramafic soils (UF) and volcano-sedimentary soils (VS). The symbiotic promiscuity of *A.*
497 *spirorbis* is structured by the soil type, where *Paraburkholderia* sp. strains were exclusively found in
498 nodules sampled in UF soils, while *Bradyrhizobium* sp. strains were isolated from both UF and VS
499 soils. Molecular data reported that metal resistance genes such as the *cnrA* and the *nreB* genes were
500 more frequently found in strains from UF soils than VS soil (Table 3).

501

502

Supplementary Table 5: Accession numbers of the references 16SrRNA, *gyrB*, *atpD* and *recA* DNA sequences of the *Burkholderia sensus lato* (*Burkholderia*, *Caballeronia*, *Paraburkholderia* and *Robbsia*) references strains used for inferring the phylogenetic trees. The upper part of the table lists the sequences used for analyses based on concatenated sequences. The lower part of the table includes references strains not used for concatenated analyses.

Reference strains	Type strain	16S rRNA	<i>gyrB</i>	<i>atpD</i>	<i>recA</i>
<i>B. caryophylli</i>	LMG 2155	AB021423.	AB190573.1	HQ398420.1	HQ398562.1
<i>B. cepacia</i>	LMG 1222	U96927.	AY996867.1	HQ398421.1	FJ670559.1
<i>B. gladioli</i>	LMG 2216	EU024168.	HQ849196.1	HQ398422.1	CP009323.1
<i>B. latens</i>	LMG 24064	AM747628.	LOTQ01000020.1	HQ398424.1	HQ398566.1
<i>B. megapolitana</i>	LMG 23650	AM489502.	NZ_FOQU01000008.1	HQ398441.1	HQ398583.1
<i>B. plantarii</i>	LMG 9035	U96933.	HQ849210.1	HQ398425.1	AJ551323.1
<i>B. pyrrocinia</i>	LMG 14191	U96930.	HQ849211.1	HQ398426.1	HQ398568.1
<i>B. sabiae</i>	LMG 24235	AY773186.	LT632431.1	HQ398449.1	HQ398591.1
<i>B. sedimimicola</i>	LMG 24238	EU035613.	KU723575.1	HQ398452.1	HQ398594.1
<i>B. seminalis</i>	LMG 24067	AM747631.	LOWU01000044.1	HQ398427.1	HQ398569.1
<i>B. silvatlantica</i>	LMG 23149	AY965240.	HQ849213.1	HQ398453.1	HQ849157.1
<i>B. soli</i>	GP25-8	DQ465451.	NZ_PNYB01000045.1	HQ398455.1	HQ398597.1
<i>B. stabilis</i>	LMG 14294	AF097533.	JF295010.1	HQ398429.1	AF456031.1
<i>B. symbiotica</i>	LMG 26032	HM357233.	HF952726.1	PYUC01000003.1	PTIR01000007.1
<i>B. vietnamiensis</i>	LMG 10929	AF097534.	JQ914278.1	HQ398430.1	CP009631.1
<i>C. cordobensis</i>	LMG 27620	HG324048.	HG324055.1	NZ_FCNY02000001.1	LN995651.1
<i>C. glathei</i>	LMG 14190	U96935.	HE985172.1	HQ398423.1	HQ398565.1
<i>C. sordidicola</i>	LMG 22029	AF512827.	HE985176.1	HQ398428.1	HQ398570.1
<i>C. taiwanensis</i>	LMG 19424	AF300324.2	EU024219.1	CU633749.1	HE687278.1
<i>P. acidipaludis</i>	SA33	AB513180.	KM655753.1	KM655753.1	NZ_BAXZ01000005.1
<i>P. bryophila</i>	LMG 23644	AM489501.	HQ849188.1	HQ398432.1	HQ398574.1
<i>P. caledonica</i>	LMG 19076	AF215704.	HQ849189.1	HQ398433.1	AY619669.1
<i>P. caribiensis</i>	LMG 18531	Y17009.	HQ849190.1	HQ398434.1	CP026101.1
<i>P. endofungorum</i>	HKI 456	AM420302.	NZ_PRDW01000002.1	NZ_PRDW01000011.1	NZ_PRDW01000003.1
<i>P. ferrariae</i>	LMG 23612	DQ514537.	HQ849193.1	HQ398435.1	HQ849137.1
<i>P. fungorum</i>	LMG 16225	AF215705.	KU723574.1	HQ398436.1	AJ549505.1
<i>P. ginsengisoli</i>	KMY03	AB201286.	KU723581.1	HQ398437.1	HQ398579.1
<i>P. graminis</i>	LMG 18924	U96939.	GU144400.1	NZ_ABLD01000014.1	AJ551267.1
<i>P. hospita</i>	LMG 20598	AY040365.	GU144377.1	HQ398438.1	FJ958192.1
<i>P. kururiensis</i>	LMG 19447	AB024310.	HQ849201.1	HQ398439.1	HQ398581.1
<i>P. mimosarum</i>	LMG 23256	AY752958.	HQ849202.1	HQ398442.1	HQ849146.1
<i>P. nodosa</i>	LMG 23741	AY773189.	HQ849204.1	HQ398444.1	HQ849147.1
<i>P. phenazinium</i>	LMG 2247	U96936.	HQ849206.1	HQ398446.1	HQ398588.1
<i>P. phenoliruptix</i>	LMG 22037	AY435213.	HQ849207.1	HQ398447.1	HQ849150.1
<i>P. phymatum</i>	LMG 21445	AJ302312.	HQ849208.1	HQ398448.1	AY619667.1
<i>P. phytofirmans</i>	LMG 22146	AY497470.	NC_010681.1	NC_010681.1	HQ849152.1
<i>P. sacchari</i>	LMG 19450	AF263278.	HQ849212.1	HQ398450.1	AY644641.1
<i>P. sartisoli</i>	LMG 24000	AF061872.	NZ_FNRQ01000005.1	HQ398451.1	HQ398593.1
<i>P. terrae</i>	KMY02	AB201285.	AKAU01000079.1	HQ398456.1	HQ398598.1
<i>P. terricola</i>	LMG 20594	AY040362.	HQ849215.1	HQ398459.1	HQ398599.1
<i>P. tropica</i>	LMG 22274	AJ420332.	HQ849216.1	HQ398460.1	LT708246.1
<i>P. tuberum</i>	LMG 21444	AJ302311.	HQ849217.1	FNKX01000001.1	AY619674.1
<i>P. xenovorans</i>	LMG 21463	U86373.	HQ849219.1	HQ398465.1	HQ849164.1
<i>R. andropogonis</i>	LMG 2129	X67037.	KM083391.1	HQ398419.1	HQ849131.1
<i>B. novacaledonica</i>	STM 10272	FR872397	LC001808.1	NA	LC001797.1
<i>B. metalliresistens</i>	D414	KF601211.	NA	NA	NA
<i>B. rhizosphaerae</i>	WR43	AB365791.	LC036347	NA	LC036350.1
<i>B. rhizoxinica</i>	HKI 454	AJ938142.	FR687359.1	NA	FR687359.1
<i>B. ultramafica</i>	STM 10279	FR872407.1	LC001814.1	NA	LC001803.1
<i>B. unamae</i>	MTI-641	AY221956.	NA	HQ398463.1	DQ514539.1
<i>C. grimmiae</i>	R27	JN256678.	HG324054.1	NA	JFHE01000004.1
<i>C. jiangsuensis</i>	LMG 27927	KJ400396.	KJ535375.1	NA	KJ535369.1
<i>C. megalochromosomata</i>	JC2949	KF155693.	LRBF01000013.1	NA	NA
<i>C. zhejiangensis</i>	OP-1	HM802212.	HF547269.1	NA	JFHD01000002.1
<i>P. bannensis</i>	E25	AB561874.	NA	NA	NZ_BAYA01000012.1
<i>P. heleia</i>	SA41	AB495123.	NA	NA	NZ_BBJH01000021.1
<i>P. oxyphila</i>	OX-01	AB488693.	KU180358.1	NA	KU180357.1
<i>P. sprentiae</i>	LMG 27175	HF549035.	HE994059.1	NA	HE994077.1

505 Ultramafic soils (UF) are characterized by low concentration of major element (nitrogen,
506 phosphorus and potassium), a strong unbalanced calcium/magnesium ratio and high contents of iron
507 oxides with heavy metals, including cobalt, chromium, manganese and nickel (Brooks, 1988).
508 Ultramafic soils are pretty harsh towards plants development, thus promoting plant endemism and
509 speciation (Isnard *et al.*, 2016). Several studies reported that this plant speciation towards UF soils also
510 involves rhizobia, in particular with *Paraburkholderia* and *Bradyrhizobium* species (Chaintreuil *et al.*,
511 2007; Gonin *et al.*, 2013; Klonowska *et al.*, 2012). In New Caledonia, the rhizosphere of the naturally
512 occurring *Costularia* spp. in UF soils is dominated by *Paraburkholderia* (28 %), followed distantly by
513 *Bradyrhizobium* (9 %; Gonin *et al.*, 2013). The study of *Costularia* spp. symbionts led to the
514 description of two novel symbiotic *Paraburkholderia* species (formerly *Burkholderia*), which are
515 adapted to UF conditions (Gonin *et al.*, 2013). Another study described the biodiversity of *Mimosa*
516 *pubida* rhizobial symbionts (*Cupriavidus taiwanensis*, *Rhizobium mesoamericanum*) and their
517 adaptation to UF soils (Klonowska *et al.*, 2012). Moreover, one study reported that *Bradyrhizobium*
518 sp. symbionts have been found on *Serianthes calycina* Benth., an endemic leguminous species from
519 New Caledonia growing on UF soils and nickel-free soil (Chaintreuil *et al.*, 2007). Every rhizobial
520 symbiont isolated from nodules of *S. calycina* showed similarities with *B. elkanii* (Chaintreuil *et al.*,
521 2007). Notably, *S. calycina* rhizobial symbionts from UF soils were more tolerant to nickel and cobalt
522 toxicity than strains from nickel-free soils, thanks to the occurrence of metal resistance genes such as
523 the *cnrA* and the *nreB* genes (Chaintreuil *et al.*, 2007). The present study of *A. spirorbis* symbionts
524 reported that the *cnrA* and the *nreB* genes were more often found in rhizobia from UF soils (Table 3),
525 which is congruent with precedent research lead by Chaintreuil *et al.* (2007). *In vitro* experiment on
526 *A. spirorbis* symbionts revealed no relationships between the occurrences of these metal resistance
527 genes and the strains metal tolerance. Others known mechanisms may be involved in the metal
528 tolerance of *A. spirorbis* symbionts, such as exclusion, active removal biosorption, precipitation or
529 bioaccumulation in external and intracellular spaces, transport mechanisms, and/or chelation
530 (Haferburg & Kothe, 2007).

531 In volcano-sedimentary (VS) soils, the rhizobial symbionts of *A. spirorbis* belonged mainly to
532 *Bradyrhizobium* species adapted to acid soils where the pH range from 4.2 to 6.5 (Table 2). This result
533 presents similarities with Australian *Acacia* species naturally occurring on heavy metal-free acidic soil
534 (Ashwath *et al.*, 1995) and establishing symbioses with *Bradyrhizobium* species, mainly with *B.*
535 *japonicum* (Lafay & Burdon, 2001; Leary *et al.*, 2006). One study reported that *Bradyrhizobium*
536 bacteria are adapted to acidic soil and more tolerant than other rhizobia nodulating other *Acacia*
537 species (Marsudi *et al.*, 1999).

538
539

Supplementary Table 6: *In vitro* nodulation tests of *A. spirorbis* with *Bradyrhizobium* sp. data. The nitrogen fixation was assessed by an ARA test. Dry biomasses of shoots, roots and nodules were weighted for each seedling. Data are means +/- stdev (n = 5).

Strain	Soil type	Nitrogen fixation ¹	Shoot (mg) ²	Root (mg) ²	Nodules (mg) ²	Nodules number ²	Efficiency ³
STM11811-PIN03	UF	0.207 ± 0.014	35.4 ± 5.1	17.6 ± 1.9	2.4 ± 0.2	3.2 ± 1.0	6.8 ± 0.7
STM7808-PMB02	VS	0.135 ± 0.014	29.6 ± 6.2	18.7 ± 2.9	4.2 ± 0.7	12.4 ± 1.1	14.2 ± 1.3
STM7809-PMB03	VS	0.155 ± 0.078	30.2 ± 7.1	17.8 ± 1.2	5.0 ± 0.9	13.6 ± 1.4	16.6 ± 1.6
STM8849-PMB04	VS	0.073 ± 0.017	29.3 ± 1.5	14.2 ± 0.7	4.8 ± 0.6	11.9 ± 2.5	16.4 ± 1.4
STM7803-PMB06	VS	0.148 ± 0.025	29.9 ± 5.9	18.8 ± 4.0	4.1 ± 0.2	9.7 ± 0.5	13.7 ± 1.2
STM8855-PMB07	VS	0.138 ± 0.009	33.1 ± 2.5	24.6 ± 1.2	4.9 ± 0.1	10.8 ± 1.1	14.8 ± 1.4
STM7784-PMB08	VS	0.144 ± 0.021	25.6 ± 1.8	20.3 ± 0.7	4.8 ± 0.8	10.6 ± 1.3	18.8 ± 1.3
STM8853-PMB09	VS	0.129 ± 0.029	29.0 ± 3.8	21.9 ± 2.0	5.4 ± 0.2	10.3 ± 1.4	18.6 ± 1.5
STM8856-PMB10	VS	0.156 ± 0.015	27.5 ± 7.5	20.0 ± 2.2	5.4 ± 0.1	9.1 ± 0.3	19.6 ± 1.6
STM8865-PMS01	VS	0.197 ± 0.028	41.4 ± 4.2	20.0 ± 1.4	2.4 ± 0.5	6.0 ± 0.5	5.8 ± 0.6
STM7828-PMS03	VS	0.211 ± 0.015	36 ± 3.2	20.4 ± 2.1	2.2 ± 0.6	2.4 ± 0.3	6.1 ± 0.4
STM7844-PMS04	VS	0.166 ± 0.041	45.4 ± 4.3	19.6 ± 1.8	2.0 ± 0.3	2.2 ± 0.2	4.4 ± 0.5
STM8870-PMS07	VS	0.157 ± 0.010	45.8 ± 3.9	30.4 ± 2.8	2.6 ± 0.4	4.4 ± 0.3	5.7 ± 0.5
STM7827-PMS08	VS	0.200 ± 0.016	49.8 ± 6.8	29 ± 3.3	2.8 ± 0.5	5.4 ± 0.6	5.6 ± 0.6
STM8863-PMS10	VS	0.254 ± 0.030	31 ± 3.0	19.6 ± 0.9	2.6 ± 0.5	3 ± 0.6	8.4 ± 0.4
STM7788-PN2	UF	0.173 ± 0.029	21.4 ± 3.9	17.4 ± 0.8	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	2.8 ± 0.3
STM7792-PN202	UF	0.007 ± 0.001	22.5 ± 2.6	21.7 ± 3.0	5.1 ± 0.5	9.8 ± 1.1	22.7 ± 2.2
STM7824-PN203	UF	0.007 ± 0.002	22.1 ± 4.3	17.3 ± 2.9	4.9 ± 0.3	10.2 ± 1.1	22.2 ± 3.6
STM7805-PN205	UF	0.017 ± 0.002	27.0 ± 2.2	18.8 ± 1.3	6.4 ± 0.5	10.9 ± 1.4	23.7 ± 2.4
STM7806-PN206	UF	0.126 ± 0.018	22.0 ± 2.7	16.7 ± 2.2	5.0 ± 0.5	12.3 ± 2.4	22.7 ± 2.8
STM7813-PN207	UF	0.006 ± 0.003	27.3 ± 4.4	19.0 ± 3.2	7.0 ± 1.3	12.4 ± 2.4	25.6 ± 3.5
STM7814-PN208	UF	0.027 ± 0.006	24.4 ± 3.0	17.0 ± 2.6	4.3 ± 0.3	13.4 ± 1.1	17.6 ± 3.1
STM7815-PN209	UF	0.060 ± 0.018	24.3 ± 3.5	19.0 ± 2.4	3.5 ± 0.5	11.4 ± 1.7	14.4 ± 1.6
STM8906-PN210	UF	0.093 ± 0.016	23.7 ± 1.0	20.9 ± 0.3	4.4 ± 0.9	10.0 ± 1.7	18.6 ± 0.2
STM11812-SRP03	VS	0.193 ± 0.010	16.2 ± 4.4	20 ± 5.7	0.8 ± 0.1	1.6 ± 0.3	4.9 ± 0.6
STM7840-TIE06	UF	0.147 ± 0.009	32.3 ± 5.1	25 ± 3.3	2.8 ± 0.2	2.5 ± 0.2	8.7 ± 0.8
STM11813-VRT01	VS	0.187 ± 0.012	33.8 ± 3.6	18.2 ± 1.7	2.2 ± 0.3	5.8 ± 0.4	6.5 ± 0.6

¹The nitrogen fixation is expressed in µmol of ethylene formed by hour per seedlings.

² Values correspond to means per seedlings

³The efficiency corresponds to the dry weights of nodules (in mg) required to form 100 mg of dry shoot weight.

Abbreviations: UF: ultramafic soils; VS: volcano-sedimentary soils.

540

541

542 4.4.5 Conclusions

543

544 To the best of our knowledge, this study regarding *A. spirorbis* symbionts is the first to report
545 such a broad symbiotic promiscuity of an endemic legume inside its natural ecosystems with
546 confirmation of (i) the presence in nodules of bacteria belonging to two genus i.e. *Bradyrhizobium* and
547 *Paraburkholderia*, (ii) their symbiotic efficiency in nodulating and nitrogen fixing capacities with *A.*
548 *spirorbis*, and (iii) a taxonomic and symbiotic efficiency structured by the soil type, where
549 *Paraburkholderia* strains are exclusively found in ultramafic soils and the symbiotic efficiency of
550 *Bradyrhizobium* strains differed between ultramafic and volcano-sedimentary soils. The broad
551 symbiotic promiscuity of rhizobia is complementary to the one observed in ectomycorrhizal fungi
552 symbiosis in *A. spirorbis* (Houlès *et al.*, 2018), which could be one of main keys to success for *Acacia*
553 *spirorbis* adaptation towards contrasted soils.

554

555 4.4.6 Acknowledgements

556

557 This work was supported by (i) the French National Agency for Research (ANR) financial
558 support through the BIOADAPT Program 2012 [grant number ANR-12-ADAP-0017 ADASPIR] and
559 (ii) the project CNRT-BIOINDIC. A part of this work was conducted in the ISO 9002 certified
560 *Laboratoire des Moyens Analytiques* (LAMA) of the IRD Center in Noumea (New Caledonia). We are
561 thankful to S. Mouah and S. Acherar, two students that participated to the initial work of strain
562 isolation.

Supplementary Table 7: *In vitro* nodulation tests of *A. spirorbis* with *Paraburkholderia* sp. data. The nitrogen fixation was assessed by an ARA test. Dry biomasses of shoots, roots and nodules were weighted for each seedling. Data are means \pm standard deviation (n = 5).

Strain	Soil type	Nitrogen fixation ¹	Shoot (mg) ²	Root (mg) ²	Nodules (mg) ²	Nodules number ²	Efficiency ³
STM11815-PIN02	UF	0.017 \pm 0.004	27.6 \pm 2.5	14.6 \pm 1.3	2.2 \pm 0.3	6.0 \pm 1.1	8.0 \pm 0.8
STM11816-PIN04	UF	0.014 \pm 0.005	32.4 \pm 3.6	13.8 \pm 1.8	2.2 \pm 0.6	2.8 \pm 0.5	6.8 \pm 0.7
STM11817-PIN05	UF	0.114 \pm 0.006	36 \pm 4.5	22.4 \pm 2.4	3.6 \pm 0.6	4.4 \pm 0.6	10 \pm 1.2
STM11814-PIN01	UF	0.097 \pm 0.007	27.8 \pm 2.3	20.2 \pm 0.7	2.2 \pm 0.4	3.8 \pm 0.3	7.9 \pm 0.7
STM11818-PIN06	UF	0.207 \pm 0.014	31.4 \pm 2.3	19.4 \pm 1.6	2.2 \pm 0.7	5.6 \pm 0.6	7.0 \pm 0.9
STM11826-PN101	UF	0.075 \pm 0.001	39.2 \pm 4.3	16.6 \pm 5.3	1.4 \pm 0.2	2.2 \pm 0.3	3.6 \pm 0.4
STM11819-TIE03	UF	0.274 \pm 0.009	48 \pm 3.5	28 \pm 6.0	3.2 \pm 0.4	3.2 \pm 0.3	6.7 \pm 0.8
STM11820-TIE04	UF	0.264 \pm 0.001	36.6 \pm 2.4	21.8 \pm 9.8	2.6 \pm 1.6	2.6 \pm 0.2	7.1 \pm 0.5
STM11821-TIE05	UF	0.201 \pm 0.002	33.5 \pm 2.6	21.5 \pm 4.5	1.3 \pm 0.4	2.0 \pm 0.2	3.9 \pm 0.3
STM11822-TIE07	UF	0.198 \pm 0.003	31.4 \pm 2.3	20.6 \pm 2.0	0.8 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	2.5 \pm 0.3
STM11823-TIE08	UF	0.172 \pm 0.019	34.6 \pm 1.9	20 \pm 4.9	1.8 \pm 0.2	4.4 \pm 0.4	5.2 \pm 0.4
STM11824-TIE09	UF	0.140 \pm 0.031	30.8 \pm 3.3	21.6 \pm 3.4	1.2 \pm 0.2	1.4 \pm 0.1	3.9 \pm 0.3
STM11825-TIE10	UF	0.033 \pm 0.004	25.4 \pm 2.8	16.4 \pm 1.9	1.0 \pm 0.3	2.6 \pm 0.2	3.9 \pm 0.5

¹The nitrogen fixation is expressed in μ mol of ethylene formed by hour per seedling.

² Values correspond to means per samples.

³The efficiency corresponds to the dry weights of nodules (mg) required to form 100 mg of dry shoot weight.

Abbreviations: UF: ultramafic soils; VS: volcano-sedimentary soils.

4.5 Résumé des résultats majeurs du deuxième chapitre

4.5.1 Un large degré d'intimité symbiotique chez *A. spirorbis*

Dans ses écosystèmes naturels, *A. spirorbis* présente un large degré d'intimité symbiotique en s'associant avec des rhizobia appartenant aux genres *Bradyrhizobium* et *Paraburkholderia*. Un total de 40 souches a été isolé de nodules d'*Acacia spirorbis* se développant naturellement sur des sols métallifères et volcano-sédimentaires. Les analyses des phylogénies basées sur le gène ARNr 16S indiquent que les souches isolées appartiennent aux groupes des alpha- et des bêta-protéobactéries, plus précisément aux genres *Bradyrhizobium* et *Paraburkholderia* respectivement (Figures 2 et 3, Figures Supplémentaires 2 et 6 du deuxième article Vincent *et al.*). Sur 40 souches, 67,5 % appartiennent au genre *Bradyrhizobium* et 32,5 % au genre *Paraburkholderia*. Les 13 souches de *Paraburkholderia* sp. proviennent de sols métallifères, tandis que 16 et 11 souches de *Bradyrhizobium* sp. ont été isolées respectivement sur des sols métallifères et volcano-sédimentaires. Deux analyses multilocus regroupant les gènes marqueurs de la diversité ont été menées pour chacun des genres (Figures 2 et 3 du deuxième article Vincent *et al.*). L'ensemble des séquences ADN a été déposé dans la banque de données ADN du Japon (DDJB) (Tableaux Supplémentaires 2 et 3 du deuxième article Vincent *et al.* pour les séquences de *Bradyrhizobium* sp. et de *Paraburkholderia* sp., respectivement).

L'analyse multilocus des souches de *Bradyrhizobium* isolées chez *A. spirorbis* permet de les classer dans 3 groupes majeurs. Un groupe n°1 rassemblant 5 souches de deux sites d'études (PMS and PN2), formant un cluster proche de *Bradyrhizobium pachyrhizi* (Figure 2 du deuxième article Vincent *et al.*). Un groupe n°2 rassemblant 3 souches isolées de PMB, formant un cluster proche de *Bradyrhizobium guangdongense* (Figure 2 du deuxième article Vincent *et al.*). Un groupe n°3 rassemblant 8 souches isolées de 3 sites d'études (PMB, PN2 et TIE) formant un cluster proche de *Bradyrhizobium yuanmingense* (Figure 2 du deuxième article Vincent *et al.*). Six autres groupes formés de 1 à 2 souches de *Bradyrhizobium* sp. isolées des nodules d'*A. spirorbis* sont présentes dans l'analyse multi-locus, groupant avec différentes espèces de références (Figure 2). Aucun lien apparent n'a été relevé entre les groupes majeurs de *Bradyrhizobium* sp. identifiés et le type de sol d'origine de ces souches.

Sur les 13 souches de *Paraburkholderia* sp., l'analyse multilocus présentent un groupe majeur composé de 12 souches proches de *Paraburkholderia phenoliruptix* (Figure 3 du deuxième article Vincent *et al.*). En dehors de ce groupe, la souche STM11820-TIE04 est proche de *Paraburkholderia phenazinium* (Figure 3 du deuxième article Vincent *et al.*).

Supplementary Table 8: Data collected from the nodulation test on *A. spirorbis* seedlings: Data are grouped regarding (i): the soil type: UF versus VS, (ii): the bacterial genus: *Bradyrhizobium* versus *Paraburkholderia*; and (iii): the bacterial genus and their soil type of origin.

	Soil type		Bacterial genus		Bacterial genus-Soil type		
	UF	VS	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Paraburkholderia</i>	BK-UF	BR-VS	BR-UF
N ₂ fixation ¹	0.11 ± 0.08	0.17 ± 0.04	0.13 ± 0.07	0.14 ± 0.09	0.14 ± 0.09 a	0.17 ± 0.04 a	0.08 ± 0.07 b
Shoot dw ²	29.8 ± 6.4	33.4 ± 8.3	30.2 ± 7.9	33.4 ± 5.6	33.4 ± 5.6 a	33.4 ± 8.3 a	25.7 ± 4.3 b
Root dw ²	19.5 ± 3.1	20.8 ± 3.9	20.1 ± 3.5	19.8 ± 3.6	19.8 ± 3.6	20.8 ± 3.9	19.1 ± 2.4
Nodule dw ²	3.0 ± 1.7	3.5 ± 1.4	3.8 ± 1.6 a	2.0 ± 0.8 b	2.0 ± 0.8 b	3.5 ± 1.4 a	4.2 ± 1.7 a
Nodule nb ³	5.8 ± 4.1	7.5 ± 3.9	8.0 ± 4.1 a	3.2 ± 1.5 b	3.2 ± 1.5 b	7.5 ± 3.9 a	8.8 ± 4.3 a
Efficiency ⁴	10.9 ± 7.6 b	11.3 ± 5.6 a	13.6 ± 6.9 a	5.9 ± 2.1 b	5.9 ± 2.1 c	11.3 ± 5.6 b	16.9 ± 7.4 a

Notes: The letters “a” and “b” correspond to two significantly different levels of mean according to pairwise Wilcoxon rank sum tests. Statistical tests were applied independently for each modality (Soil type, Bacterial genus and Bacterial genus-Soil type) and parameter (by rows). Tests results must be read according to each row.

¹ The N₂ fixation is expressed in μmol of ethylene formed per hour and per seedling.

² Dry weights of shoots (shoot dw), roots (roots dw) and nodules (nodules dw) are expressed in mg.

³ The number of nodules (nodules nb) corresponds to the mean number of nodules per seedlings.

⁴ The efficiency of the N₂ fixation corresponds to the dry biomass of nodules required to form 100 mg of *A. spirorbis* shoot.

Abbreviations: UF: ultramafic soils; VS: volcano-sedimentary soils; BK-UF: *Paraburkholderia* strains from ultramafic soils; BR-VS: *Bradyrhizobium* strains from volcano-sedimentary soils; BR-UF: *Bradyrhizobium* strains from ultramafic soils.

Supplementary Table 9: Correlation matrix of the parameters measured in the *in vitro* nodulation tests. The upper right part of the matrix corresponds to the correlation coefficients values (r). The bottom left part of the matrix corresponds to the significance of the correlation.

	N ₂ fixation	Shoot dw	Root dw	Nodules dw	Nodules nb	Efficiency
N ₂ fixation		r = 0.56	r = 0.41	r = - 0.42	r = - 0.50	r = - 0.53
Shoot dw	***		r = 0.40	r = - 0.30	r = - 0.37	r = - 0.50
Root dw	**	*		r = 0.07	r = - 0.23	r = - 0.09
Nodules dw	**	NS	NS		r = 0.85	r = 0.94
Nodules nb	**	*	NS	***		r = 0.84
Efficiency	***	**	NS	***	***	

Abbreviations: NS: no statistical correlation; **: P < 0.01; ***: P < 0.001.

4.5.2 Les spécificités de la fixation d'azote entre *Bradyrhizobium* et *Paraburkholderia*

La capacité nodulante et fixatrice d'azote de chacune des 40 souches isolées a été vérifiée sur des jeunes plants d'*A. spirorbis* et mesurée en utilisant le test ARA (Tableaux Supplémentaires 6, 7 et 8 du deuxième article Vincent *et al.*). Une analyse en composantes principales (ACP) des données obtenues a été effectuée sur la capacité fixatrice d'azote des souches, la biomasse de nodules requise pour former 100 mg de partie aériennes, le nombre de nodules et les biomasses aériennes, racinaires et de nodules chez des jeunes plants d'*A. spirorbis* (Figure 4A du deuxième article Vincent *et al.*). Les données de cette ACP sont analysées en fonction du genre bactérien (Figure 4B du deuxième article Vincent *et al.*).

Les plants inoculés avec des souches de *Bradyrhizobium* demandent en moyenne significativement plus de biomasse de nodules ($13,6 \pm 6,9$ mg) pour former 100 mg de parties aériennes, comparé aux souches de *Paraburkholderia* ($5,9 \pm 2,1$ mg). De même, la biomasse et le nombre de nodules formés par des souches de *Bradyrhizobium* (respectivement de $3,9 \pm 1,5$ mg et $8,3 \pm 3,9$ nodules) est significativement ($P < 0,05$) plus importante par rapport aux souches de *Paraburkholderia* avec des moyennes de $1,9 \pm 0,9$ mg et $3,1 \pm 1,6$ nodules, respectivement (Figure 4B et Tableau Supplémentaire 8 du deuxième article Vincent *et al.*).

Le gène *nodA* a été amplifié et séquencé chez toutes les souches isolées de *Bradyrhizobium* sp. et *Paraburkholderia* sp. Les données moléculaires du gène *nodA* appartenant aux genres *Bradyrhizobium* et *Paraburkholderia* sont reportées dans la Figure 5 et le Tableau Supplémentaire 11 du deuxième article Vincent *et al.* Le gène *nodA* des souches d'alpha-rhizobia isolées dans cette étude est structuré en 3 groupes majeurs (Figure 5). Un groupe n°1 réunissant 3 souches isolées de sols VS, proches de *Bradyrhizobium* sp., souche CH2493 (Figure 5 du deuxième article Vincent *et al.*). Un groupe n°2 rassemblant 12 souches distribuées entre des sols UF (à 75 %) et VS (à 25 %), proches de *Methylobacterium nodulans* et *Bradyrhizobium canariense* (Figure 5 du deuxième article Vincent *et al.*). Un groupe n°3 composé de 12 souches réparties entre des sols UF (à 17 %) et VS (à 83 %), proches de *Bradyrhizobium elkanii* (Figure 5 du deuxième article Vincent *et al.*). Les séquences du gène *nodA* des souches de *Paraburkholderia* sp. isolées ne présentent pas de similarité avec des séquences déjà répertoriées (Table 4 du deuxième article Vincent *et al.*). Toutes les analyses de BlastN menées sur ces séquences convergent vers le même résultat : le gène *nodA* de ces souches correspond à une séquence du chromosome 1 de plusieurs bêta-rhizobia, dont *Paraburkholderia phenoliruptix* (Tableau Supplémentaire 11 du deuxième article Vincent *et al.*).

Supplementary Table 10: Accession number of the references *nodA* DNA sequences of the alpha- and beta-rhizobial bacteria used in this study to infer the phylogenetic tree based on the *nodA* gene.

Reference species	Strain	<i>nodA</i>	Reference
<i>Azorhizobium caulinodulans</i>	ORS 571	L18897.1	Goethals <i>et al.</i> , 1989
<i>Bradyrhizobium canariense</i>	Oc39	FR720456	Stepkowski <i>et al.</i> , 2011
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	USDA 94	U04609.1	Dobert <i>et al.</i> , 1994
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	USDA110	BA000040.2	Kaneko <i>et al.</i> , 2002
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	USDA6	AM117545.1	Stepkowski <i>et al.</i> , 2007
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	CH2493	AM117562.1	Stepkowski <i>et al.</i> , 2007
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	CH2509	AM117556.1	Stepkowski <i>et al.</i> , 2007
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	CPAC-M9	AM117537.1	Stepkowski <i>et al.</i> , 2007
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	ORS130	AJ300254.1	Moulin L. (direct submission)
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Mm1-3	AM117534	Stepkowski <i>et al.</i> , 2007
<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	CCBAU 10071	AM117557.1	Stepkowski <i>et al.</i> , 2007
<i>Burkholderia</i> sp.	TJ 182	AJ505309.1	Chen <i>et al.</i> , 2003
<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	LMG 19424	AJ505311.1	Chen <i>et al.</i> , 2003
<i>Ensifer fredii</i>	USDA 257	M73699.1	Krishnan & Pueppke, 1991
<i>Ensifer meliloti</i>	1021	AE006469.1	Barnett <i>et al.</i> , 2001
<i>Mesorhizobium amorphae</i>	CCBAU 11242	GQ167252.1	Guan S. (direct submission)
<i>Mesorhizobium australicum</i>	WSM2073	AY601528.1	Nandasena <i>et al.</i> , 2006
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	USDA3378	GQ167240.1	Guan S. (direct submission)
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	WSM1271	AY601526.1	Nandasena <i>et al.</i> , 2006
<i>Mesorhizobium loti</i>	NZP2037	L06241.1	Scott <i>et al.</i> , 1996
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	USDA 3392	GQ167241.1	Guan S. (direct submission)
<i>Mesorhizobium opportunistum</i>	WSM2075	AY601530.1	Nandasena <i>et al.</i> , 2006
<i>Mesorhizobium temperatum</i>	SDW018	GQ167238.1	Guan S. (direct submission)
<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	CCBAU 3306	GQ167239.1	Guan S. (direct submission)
<i>Mesorhizobium septentrionale</i>	CCBAU 11208	GQ167245.1	Guan S. (direct submission)
<i>Methylobacterium nodulans</i>	ORS 2060	AF266748.1	Jourand <i>et al.</i> , 2004
<i>Paraburkholderia phymatum</i>	STM815	AJ505318.2	Chen <i>et al.</i> , 2003
<i>Paraburkholderia tuberum</i>	STM 678	AJ302321.1	Moulin <i>et al.</i> , 2001
<i>Paraburkholderia</i> sp.	Br 3461	AY533871.1	Chen <i>et al.</i> , 2005
<i>Rhizobium etlii</i>	CFN42	U80928.5	Girard <i>et al.</i> , 1991
<i>Rhizobium giardinii</i>	H152	AJ300238.1	Moulin L. (direct submission)
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	3841	AM236084.1	Young <i>et al.</i> , 2006
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	NA	M58625.1	Vázquez <i>et al.</i> , 1991
<i>Rhizobium</i> sp.	TJ 173	AJ505308.1	Chen <i>et al.</i> , 2003
<i>Rhizobium tropicii</i>	9039	X98514.1	Debellé <i>et al.</i> , 1996
<i>Rhizobium tropicii</i>	UPRM 8021	EU490517.1	Elliott <i>et al.</i> , 2009

Les souches de *Bradyrhizobium* sp. et de *Paraburkholderia* sp. isolées présentent des valeurs similaires de fixation d'azote avec des moyennes respectives de $0,13 \pm 0,07$ et $0,14 \pm 0,08$ μmol d'éthylène par plant et par heure (Figure 4B et Tableau Supplémentaire 11 du deuxième article Vincent *et al.*). De plus, le genre de rhizobia (*Bradyrhizobium* ou *Paraburkholderia*) n'affecte pas la biomasse des jeunes plants d'*A. spirorbis*, avec (i) des moyennes respectives de biomasses aériennes de $30,6 \pm 7,9$ et $32,6 \pm 6,2$ mg et (ii) de biomasses racinaires avec $20,3 \pm 3,5$ et $19,6 \pm 3,5$ mg, respectivement (Figure 4B et Tableau Supplémentaire 11 du deuxième article Vincent *et al.*).

Le gène *nifH* a été amplifié et séquencé chez toutes les souches isolées de *Bradyrhizobium* sp. et *Paraburkholderia* sp. Les données moléculaires du gène *nifH* sont présentées en Figure 6 du deuxième article Vincent *et al.* Deux groupes majeurs ont été identifiés : (i) un groupe n°1 réunissant 10 souches de *Bradyrhizobium* sp. provenant de 3 sites d'études (PMB, PMS et TIE) proches de *Bradyrhizobium elkanii* et (ii) un groupe n°2 incluant 17 souches de *Bradyrhizobium* sp. isolées de 5 sites d'études (PMB, PMS, PN2, SRP and VRT), apparentées à l'espèce *Bradyrhizobium ganzhouense* (Figure 6 du deuxième article Vincent *et al.*). Les données moléculaires du gène *nifH* chez les beta-rhizobia sont en cours d'acquisition au moment de la rédaction du manuscrit.

4.5.3 Relation entre l'origine du sol et le fonctionnement de la symbiose fixatrice d'azote

Afin d'apporter un complément à l'ACP sur la symbiose fixatrice d'azote, les données de l'efficacité de fixation des souches sont présentées en fonction du type de sol (Figure 4C du deuxième article Vincent *et al.*) et de la combinaison entre le type de sol et le genre bactérien (Figure 4D du deuxième article Vincent *et al.*). Les données sont disponibles dans le Tableau Supplémentaire 8 du deuxième article Vincent *et al.*

Nos résultats indiquent une relation entre le type de sol et le fonctionnement de la symbiose fixatrice d'azote, notamment en comparant les données liées aux souches de *Bradyrhizobium* sp. isolées de sols UF (BR-UF) par rapport aux souches de *Bradyrhizobium* sp. isolées de sols VS (BR-VS ; Figure 4C et Tableau Supplémentaire 8 du deuxième article Vincent *et al.*). Les souches BK-UF et BR-VS présentent de manière remarquable des valeurs moyennes de fixation d'azote de $0,14 \pm 0,09$ et $0,17 \pm 0,04$ $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{plant}^{-1}$, significativement deux fois plus élevées ($P < 0,05$) que les souches BR-UF avec une moyenne de $0,08 \pm 0,07$ $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{plant}^{-1}$ (Figure 4C et Tableau Supplémentaire 8 du deuxième article Vincent *et al.*). De la même manière, les plants inoculés avec les souches BK-UF et BR-VS présentent des biomasses aériennes de $32,6 \pm 6,2$ et $33,4 \pm 8,3$ mg, significativement plus élevées ($P < 0,05$) de 24 % par rapport aux souches BR-UF avec une moyenne de $26,1 \pm 4,3$ mg (Figure 4C et Tableau Supplémentaire 8 du deuxième article Vincent *et al.*). Les résultats de la fixation d'azote et de la biomasse aérienne sont statistiquement corrélés ($P < 0,001$ et $r = 0,56$; Tableau Supplémentaire 10). La quantité de nodules requise pour former 100 mg de biomasse aérienne

Supplementary Table 11: Nucleotidic BLASTN results of *nodA* sequences sequence data of the *Paraburkholderia* sp. strain isolated from *A. spirorbis* nodules. The BLAST was carried out with the nucleotide collection of the NCBI database using the program optimized for highly similar sequences (megablast).

Strain	BLAST results of <i>nodA</i> sequences ¹	Score	Query cover	Identity
STM11814-PIN01 (LC387618)	<i>Burkholderia</i> sp. HB1 chromosome 1, complete sequence	686	97%	93%
	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1003 chromosome 1, complete sequence	686	97%	93%
	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i> BR3459a chromosome 1, complete sequence	686	97%	93%
STM11818-PIN06 (LC387619)	<i>Burkholderia</i> sp. HB1 chromosome 1, complete sequence	686	97%	93%
	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1003 chromosome 1, complete sequence	686	97%	93%
	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i> BR3459a chromosome 1	686	97%	93%
STM11825-TIE10 (LC387620)	<i>Burkholderia</i> sp. HB1 chromosome 1, complete sequence	767	99%	93%
	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1003 chromosome 1, complete sequence	761	98%	93%
	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1001 chromosome 1, complete sequence	747	99%	92%
STM11819-TIE03 (LC387621)	<i>Burkholderia</i> sp. HB1 chromosome 1, complete sequence	558	97%	92%
	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i> BR3459a chromosome 1, complete sequence	574	97%	90%
	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1001 chromosome 1, complete sequence	283	45%	94%
STM11821-TIE05 (LC387622)	<i>Burkholderia</i> sp. HB1 chromosome 1, complete sequence	760	99%	93%
	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1003 chromosome 1, complete sequence	750	97%	93%
	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1001 chromosome 1, complete sequence	736	98%	92%
STM11823-TIE08 (LC387623)	<i>Burkholderia</i> sp. HB1 chromosome 1, complete sequence	765	99%	93%
	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1003 chromosome 1, complete sequence	761	98%	93%
	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1001 chromosome 1, complete sequence	747	99%	93%
STM11816-PIN04 (LC387624)	<i>Burkholderia</i> sp. HB1 chromosome 1, complete sequence	680	99%	93%
	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1003 chromosome 1, complete sequence	978	99%	93%
	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i> BR3459a chromosome 1, complete sequence	662	99%	92%
STM11817-PIN05 (LC387625)	<i>Burkholderia</i> sp. HB1 chromosome 1, complete sequence	682	98%	93%
	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1003 chromosome 1, complete sequence	680	98%	93%
	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i> BR3459a chromosome 1, complete sequence	664	98%	92%
STM11820-TIE04 (LC387626)	<i>Burkholderia</i> sp. HB1 chromosome 1, complete sequence	749	97%	93%
	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1003 chromosome 1, complete sequence	749	97%	93%
	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1001 chromosome 1, complete sequence	732	97%	93%
STM11815-PIN02 (LC387627)	<i>Burkholderia</i> sp. HB1 chromosome 1, complete sequence	682	99%	92%
	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1003 chromosome 1, complete sequence	682	99%	93%
	<i>Paraburkholderia phenoliruptrix</i> BR3459a chromosome 1, complete sequence	665	99%	92%
STM11826-PN101 (LC387618)	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1003 chromosome 1, complete sequence	706	93%	94%
	<i>Burkholderia</i> sp. HB1 chromosome 1, complete sequence	682	92%	93%
	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1001 chromosome 1, complete sequence	675	92%	93%
STM11824-TIE09 (LC387629)	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1003 chromosome 1, complete sequence	717	100%	94%
	<i>Burkholderia</i> sp. HB1 chromosome 1, complete sequence	691	99%	94%
	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1001 chromosome 1, complete sequence	686	99%	93%
STM11822-TIE07 (LC387630)	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1003 chromosome 1, complete sequence	658	100%	94%
	<i>Burkholderia</i> sp. HB1 chromosome 1, complete sequence	636	100%	93%
	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1001 chromosome 1, complete sequence	621	99%	92%

¹Only the top 3 BLAST results are presented for each strain

présente 3 niveaux distincts ($P < 0,05$) entre des souches BR-UF, BR-VS et BK-UF avec des moyennes respectives de $16,9 \pm 7,4$; $11,3 \pm 5,6$ et $5,9 \pm 2,1$ mg (Figure 4C et Tableau Supplémentaire 8 du deuxième article Vincent *et al.*).

4.5.4 Tolérance aux éléments traces métalliques

La tolérance à six éléments traces métalliques (Al, Co, Cr, Fe, Mn et Ni) retrouvés dans les sols en Nouvelle-Calédonie a été déterminée chez les souches de *Bradyrhizobium* sp. et de *Paraburkholderia* sp. via la concentration inhibant 50 % de la croissance bactérienne (CI_{50}) pour chacun des éléments traces métalliques. Les valeurs des CI_{50} sont exprimées en μM ou $\text{mM} \pm$ écart-type (Tableau Supplémentaire 14 du deuxième article Vincent *et al.*) et représentées sous la forme d'une ACP (Figure 7 du deuxième article Vincent *et al.*). Dans cette ACP, les IC_{50} des six métaux étudiés pour chacune des souches sont présentées sous la forme d'un cercle de corrélation (Figure 7A du deuxième article Vincent *et al.*). Dans cette même ACP, les données de tolérance aux métaux sont présentées en fonction du genre bactérien (Figure 7B du deuxième article Vincent *et al.*), du type de sol (Figure 7C du deuxième article Vincent *et al.*) et en fonction de la combinaison entre le genre bactérien et le type de sol (Figure 7D du deuxième article Vincent *et al.*).

De manière générale, les souches de *Bradyrhizobium* sp. présentent des CI_{50} significativement ($P < 0,05$) plus élevées concernant l'aluminium, le cobalt, le chrome et le fer (Figure 7B et Tableau Supplémentaire 9 du deuxième article Vincent *et al.*). En effet, les souches de *Bradyrhizobium* sp. présentent des CI_{50} moyennes respectives concernant l'aluminium, le chrome, le cobalt et le fer de $21,8 \pm 11,1$ mM, 367 ± 495 , 254 ± 141 et de 2482 ± 789 μM (Figure 7B et Tableau Supplémentaire 9 du deuxième article Vincent *et al.*). Les souches de *Paraburkholderia* sp. présentent des CI_{50} moyennes respectives concernant l'aluminium, le chrome, le cobalt et le fer de $12,0 \pm 4,01$ mM, 110 ± 107 , 564 ± 1065 et de 2123 ± 499 mM (Figure 7B et Supplementary Table 9 du deuxième article Vincent *et al.*).

Les souches de *Bradyrhizobium* isolées de sols métallifères (BR-UF) et les souches de *Bradyrhizobium* isolées de sols volcano-sédimentaires (BR-VS) répondent de manière différente selon les éléments traces métalliques et le type de sol (Figure 7D et Supplementary Table 9 du deuxième article Vincent *et al.*). Les souches BR-UF tolèrent le Ni, Cr, Co, Fe, Mn et Al avec des valeurs respectives de CI_{50} de 711 ± 904 , 100 ± 52 , 247 ± 101 , 2347 ± 642 μM , $24,2 \pm 15,0$ et $26,7 \pm 10,7$ mM (Figure 7D et Supplementary Table 9 du deuxième article Vincent *et al.*). Par rapport à ces souches BR-UF, les souches BR-VS tolèrent significativement ($P < 0,05$) moins le nickel (358 ± 281 μM), plus le chrome et l'aluminium (468 ± 546 μM and $18,5 \pm 10,1$, respectivement), de manière égale le cobalt, le fer et le manganèse avec des moyennes respectives de 259 ± 163 , 2533 ± 832 μM et $23,1 \pm 16,5$ mM (Figure 7D et Tableau Supplémentaire 9 du deuxième article Vincent *et al.*).

Supplementary Table 12: Accession number of the references *nifH* DNA sequences of the alpha-rhizobial bacteria used in this study to infer the phylogenetic tree based on the *nifH* gene.

Reference strain	Type strain	<i>nifH</i>	Reference
<i>B. liaoningense</i>	LMG18230	EU818925.1	Appunu <i>et al.</i> , 2008
<i>B. yuanmingensis</i>	CCBAU 10071	EU818927.1	Appunu <i>et al.</i> , 2008
<i>B. japonicum</i>	USDA 110	K01620.1	Fuhrmann & Hennecke, 1984
<i>B. elkanii</i>	USDA 76	AB094963.1	H. Kawasaki (direct submission)
<i>B. canariense</i>	BTA-1	EU818926.1	Appunu <i>et al.</i> , 2008
<i>B. ferriligni</i>	CCBAU 51502	KJ818108.1	Yao <i>et al.</i> , 2015
<i>B. pachyrhizi</i>	LMG 24246	HM047124.1	Y. L. Chang (direct submission)
<i>B. ottawaense</i>	OO99	JN186287.1	Yu <i>et al.</i> , 2014
<i>B. daqingense</i>	CCBAU 15774	HQ231323.1	Wang <i>et al.</i> , 2013b
<i>B. subterraneum</i>	58 2-1	KM378289.1	Grönemeyer <i>et al.</i> , 2015
<i>B. arachidis</i>	CCBAU 051107	HM107283.1	Wang <i>et al.</i> , 2013a
<i>B. vignae</i>	7-2	KM378251.1	Grönemeyer <i>et al.</i> , 2016
<i>B. kavangense</i>	14-3	KM378254.1	Grönemeyer <i>et al.</i> , 2014
<i>B. tropiciagri</i>	SEMIA 6148	HQ259540.1	Menna & Hungria, 2011
<i>B. embrapense</i>	SEMIA 6208	KP234518.2	Delamuta <i>et al.</i> , 2015
<i>B. viridifuturi</i>	SEMIA 690	KR149137.1	Helene <i>et al.</i> , 2015
<i>B. erythrophlei</i>	CCBAU 53325	KF114598.1	Yao <i>et al.</i> , 2015
<i>B. ganzhouense</i>	RITF806	JX292065.1	Lu <i>et al.</i> , 2014
<i>B. retamae</i>	Ro19	KF670138.1	M. H. Ramirez-Behana (direct submission)
<i>B. valentinum</i>	LmjM3	KF806461.1	Durán <i>et al.</i> , 2014b
<i>B. icense</i>	LMTR 13	KF896161.1	Durán <i>et al.</i> , 2014a
<i>B. lablabi</i>	CCBAU 23086	GU433546.1	Chang <i>et al.</i> , 2011
<i>B. paxllaeri</i>	LMTR 21	DQ085619.2	Durán <i>et al.</i> , 2014a
<i>B. jicamae</i>	LMG 24556	HM047127.1	Ramírez-Bahena <i>et al.</i> , 2009
<i>B. cytisi</i>	CTAW 11	GU001618.1	Chahboune <i>et al.</i> , 2011
<i>B. denitrificans</i>	LMG 8443	HM047125.1	Y. L. Chang (direct submission)
<i>B. guangxiense</i>	CCBAU 53363	KC509140.1	Li <i>et al.</i> , 2015
<i>B. neotropicae</i>	BR 10247	KJ661728.1	Zilli <i>et al.</i> , 2014
<i>B. guangdongense</i>	CCBAU 51649	KC509130.1	Li <i>et al.</i> , 2015
<i>B. ingae</i>	BR 10250	KF927085.1	da Silva <i>et al.</i> , 2014
<i>B. iriomotense</i>	EK 05	AB300998.1	Islam <i>et al.</i> , 2008
<i>B. manausensis</i>	BR 3351	KF786003.1	Silva <i>et al.</i> , 2014
<i>B. stylosanthi</i>	BR 446	KU724157.1	Delamuta <i>et al.</i> , 2016

La présence de gènes marqueurs de la résistance aux métaux lourds (*cnrA* et *nreB*) est exprimé sous la forme d'un ratio présence : absence et synthétisée dans le Tableau 3 du deuxième article Vincent *et al.* Sur l'ensemble des souches, les *Paraburkholderia* sp. possèdent 2 fois plus souvent les gènes *cnrA* et *nreB*, détectés respectivement 10 et 9 fois, par rapport aux souches de *Bradyrhizobium* où ces gènes ont été détectés 6 et 5 fois, respectivement (Tableau 3 du deuxième article Vincent *et al.*). Les souches BR-VS et BR-UF sont caractérisées par une présence : absence similaire (i) du gène *cnrA* avec des ratios respectifs de 4 : 12 et 2 : 9, de même pour (ii) le gène *nreB* avec des ratios respectifs de 3 : 13 et 2 : 9 (Table 3 du deuxième article Vincent *et al.*). De manière remarquable, les souches isolées des sols UF présentent une proportion trois à quatre fois plus importante des gènes *cnrA* et *nreB* (12 : 12 et 11 : 13, respectivement), comparée aux souches isolées de sols VS avec des ratios respectifs de 4 : 12 et 3 : 13 (Table 3 du deuxième article Vincent *et al.*).

4.6 Discussion

4.6.1 Le large degré « d'intimité » symbiotique chez *Acacia spirorbis*

Les populations naturelles d'*A. spirorbis* établissent des symbioses fixatrices d'azote avec des *Bradyrhizobium* sp. et des *Paraburkholderia* sp. sur des sols métallifères et volcano-sédimentaires. Parmi la diversité des espèces d'*Acacia*, rares sont les espèces connues présentant un aussi large degré « d'intimité » symbiotique.

Les souches de *Bradyrhizobium* sp. caractérisées chez *A. spirorbis* révèlent une proximité phylogénétique avec un total de neuf espèces différentes de *Bradyrhizobium* déjà décrites (Figure 2 du deuxième article Vincent *et al.*). Ces neuf espèces de *Bradyrhizobium* sp. phylogénétiquement proches de celles associées à *A. spirorbis* développent des symbioses nodulantes et fixatrice d'azote avec un large spectre de plantes hôtes appartenant à des genres, voire des familles de légumineuses très différentes, mettant en valeur le large degré d'intimité symbiotique chez *A. spirorbis*. En résumé, les espèces de *Bradyrhizobium* isolés à partir des nodules d'*A. spirorbis* sont proches de (i) *B. yuanmingense*, isolé pour la première fois à partir de nodules de *Lespedeza* spp. (Yao *et al.*, 2002), (ii) *B. pachyrhizi*, isolé à partir de *Pachyrhizus erosus* (Ramírez-Bahena *et al.*, 2009), (iii) *B. guangdongense*, isolés de l'arachide (Li *et al.*, 2015), (iv) *B. tropiciagri*, isolé de *Neonotonia wightii* (Delamuta *et al.*, 2015), (v) *B. cytisi*, isolé de *Cytisus villosus* (Chahboune *et al.*, 2011), (vi) *B. embrapense* isolé de *Desmodium heterocarpon* (Delamuta *et al.*, 2015) et (vii) *B. elkanii* et *B. huanghuaihaiense*, isolés de *Glycine max* (Kuykendall *et al.*, 1992 ; Zhang *et al.*, 2012). Pour finir, deux souches de *Bradyrhizobium* sp. (STM7828-PMS03 et STM7844-PMS04) présentent une dissimilarité par rapport aux autres espèces de *Bradyrhizobium* déjà décrites (Figure 2 du deuxième

Supplementary Table 13: Bacterial metal tolerance inhibiting concentration (IC₅₀) for aluminum, chromium, cobalt, iron, nickel, and manganese, expressed in μM or mM. Data are grouped regarding (i): the soil type: UF *versus* VS, (ii): the bacterial genus: *Bradyrhizobium* *versus* *Paraburkholderia*; and (iii): the bacterial genus and their soil type.

Metal IC ₅₀	Soil type		Genus		Genus-soil		
	UF	VS	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Paraburkholderia</i>	BK-UF	BR-VS	BR-UF
Ni (μM)	569 \pm 715	358 \pm 281	502 \pm 640	449 \pm 471	449 \pm 471 b	358 \pm 281 b	711 \pm 904 a
Cr (μM)	108 \pm 100 b	468 \pm 546 a	367 \pm 495 a	110 \pm 107 b	110 \pm 107 b	468 \pm 546 a	100 \pm 52 b
Co (μM)	419 \pm 802	259 \pm 163	254 \pm 141 a	564 \pm 1065 b	564 \pm 1065 b	259 \pm 163 a	247 \pm 101 ab
Fe (μM)	2165 \pm 536 b	2533 \pm 832 a	2482 \pm 789 a	2123 \pm 499 b	2123 \pm 499 b	2533 \pm 832 a	2347 \pm 642 ab
Mn (mM)	20.4 \pm 15.3	23.1 \pm 16.5	23.6 \pm 15.9	17.3 \pm 15.0	17.3 \pm 15.0	23.1 \pm 16.5	24.2 \pm 15.0
Al (mM)	18.7 \pm 10.7	18.5 \pm 10.0	21.8 \pm 11.1 a	12.0 \pm 4.01 b	12.0 \pm 4.01 c	18.5 \pm 10.1 b	26.7 \pm 10.7 a

Notes: The letters “a” and “b” correspond to two significantly different levels of mean according to pairwise Wilcoxon rank sum tests. Statistical tests were applied independently for each modality (Soil type, Bacterial genus and Bacterial genus-Soil type) and parameter (by rows). Tests results must be read according to each row.

Abbreviation: UF: ultramafic soils; VS: volcano-sedimentary soils; BK-UF: *Paraburkholderia* strains from ultramafic soils; BR-VS: *Bradyrhizobium* strains from non-metalliferous soils; BR-UF: *Bradyrhizobium* strains from metalliferous soils.

Supplementary Table 14: Correlation matrix of the rhizobial metal IC₅₀ according to the metal tested. The upper right part of the matrix corresponds to the correlation coefficients values (r). The bottom left part of the matrix corresponds to the significance of the correlation.

	Ni	Cr	Co	Fe	Mn	Al
Ni		r = - 0.02	r = 0.43	r = - 0.13	r = 0.31	r = 0.33
Cr	NS		r = 0.12	r = 0.12	r = - 0.04	r = 0.12
Co	***	NS		r = - 0.12	r = 0.24	r = 0.16
Fe	NS	NS	NS		r = 0.18	r = 0.48
Mn	***	NS	**	NS		r = 0.45
Al	***	NS	NS	***	***	

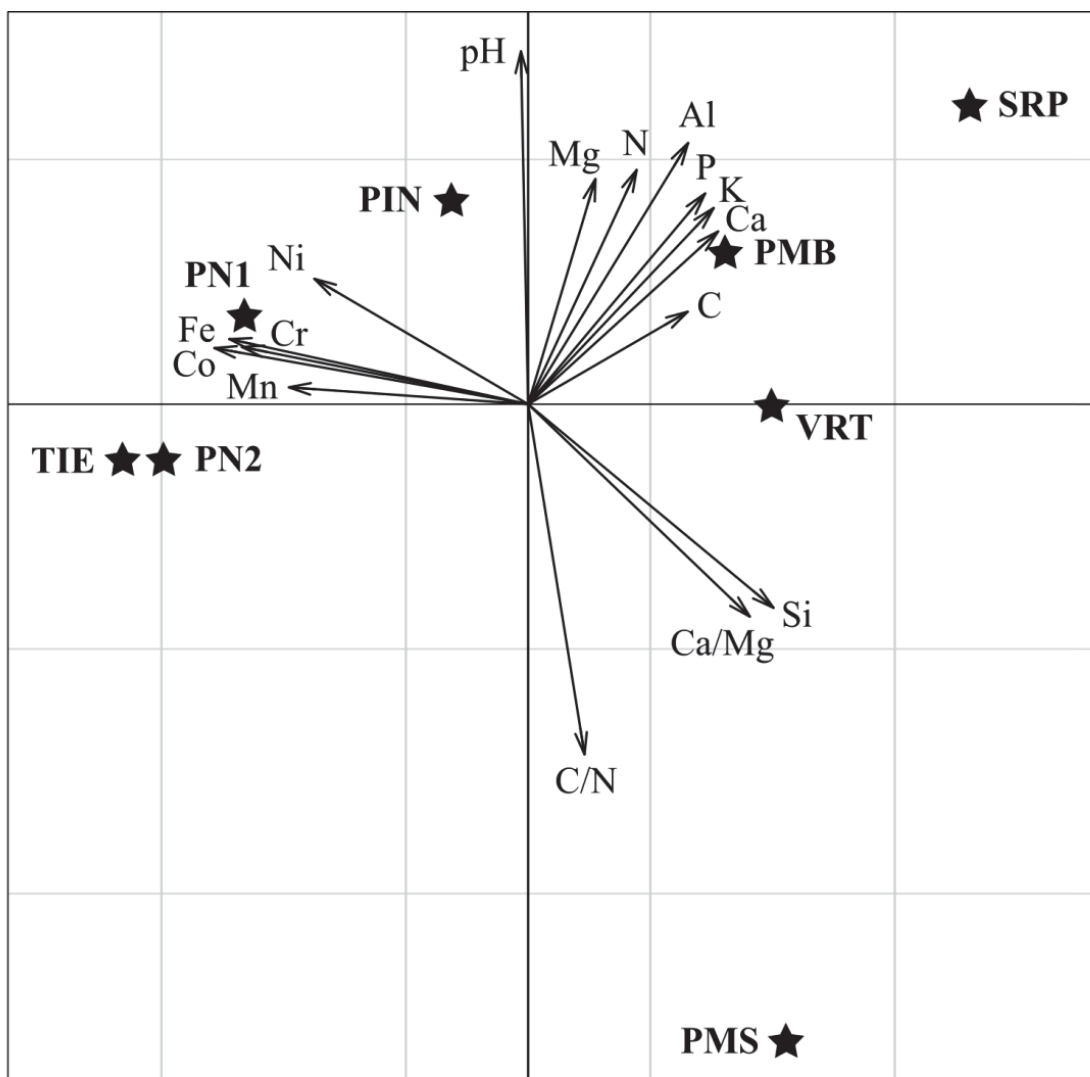
Abbreviation: NS: no statistical correlation; **: P < 0.01; ***: P < 0.001.

article Vincent *et al.*), indiquant une potentielle nouvelle espèce à décrire.

Le degré « d'intimité » symbiotique chez *A. spirorbis* est en partie commun avec celui des *Acacias* australiens *sensus stricto*. En effet, les acacias en Afrique et en Amérique s'associent préférentiellement avec des souches de *Rhizobium* sp., d'*Ensifer* sp. et de *Mesorhizobium* sp., tandis que les acacias australiens établissent principalement des symbioses fixatrices d'azote avec des espèces de *Bradyrhizobium*, plus particulièrement avec *B. japonicum* sur leur sol d'origine (Lafay & Burdon, 2001 ; Leary *et al.*, 2006). De plus, en dehors de l'Australie (Afrique du Sud, Malaisie et Nouvelle Zélande), les espèces *A. auriculiformis* Benth., *A. dealbata* Link, *A. longifolia* (Andrews) Willd., *A. mangium* Willd. and *A. mearnsii* De Wild. maintiennent leur degré d'intimité symbiotique avec des espèces du genre *Bradyrhizobium* (Joubert, 2003 ; Weir *et al.*, 2004 ; Roux *et al.*, 2009). De ce fait, les *Bradyrhizobium* sp. associés à *A. spirorbis* supporte la théorie que cet *Acacia* est originaire d'Australie (Richardson *et al.*, 2011).

En plus des espèces de *Bradyrhizobium*, le degré d'intimité symbiotique chez *A. spirorbis* inclue des beta-rhizobia appartenant au genre *Paraburkholderia*. Les analyses multilocus rapportent que les *Paraburkholderia* associés à *A. spirorbis* appartiennent (i) majoritairement à un clade homogène proche de *Paraburkholderia phenoliruptix* et (ii) un second groupe putatif représenté par une souche proche de *Paraburkholderia phenazinium* (Figure 3 du deuxième article Vincent *et al.*). Ces deux clades se situent sur deux nœuds statistiquement distincts des espèces de références (valeurs de *bootstraps* supérieures à 94 %), indiquant deux potentielles nouvelles espèces de *Paraburkholderia* à décrire.

La symbiose fixatrice d'azote d'une légumineuse avec des bactéries appartenant au groupe des bêta-protéobactéries a été découverte en 2001 par Moulin *et al.* chez la légumineuse *Aspalathus carnosa* en Afrique du Sud. Par la suite, ces associations ont été décrites comme étant largement répandues dans la nature, notamment à Taiwan chez *Mimosa pudica* et *M. diplotricha* avec des espèces de bactéries nodulantes et fixatrices d'azote appartenant aux genres *Paraburkholderia* (ex *Burkholderia*) et *Cupriavidus* (ex *Ralstonia* ; Chen *et al.*, 2003). Des études récentes ont démontré que les bactéries du genre *Burkholderia* au sens large incluaient à la fois des pathogènes humains, animaux et végétaux mais également des espèces environnementales et bénéfiques pour les plantes (EBP). De ce fait, cinq lignées ont été récemment re-définies taxonomiquement: *Burkholderia sensus stricto*, *Caballeronia*, *Paraburkholderia rhizoxinica*, *Paraburkholderia*, and *Robbsia* (Beukes *et al.*, 2017 ; Lopes-Santos *et al.*, 2017). Les espèces appartenant au genre *Paraburkholderia* correspondent aux espèces EBP incluant des fixateurs libres de diazote et des rhizobia (Sawana *et al.*, 2014).



Supplementary Figure 1: Principal Component Analysis of the soil properties of the eight study sites. Soil geochemical properties are represented by arrows. Sites are represented by a black star. Abbreviations: PIN: Pindaï; PMB: Poum Malabou; PMS: Poum Silice; PN1: Pandanus 1; PN2: Pandanus 2; TIE: Tiebaghi; VRT: Vertisol

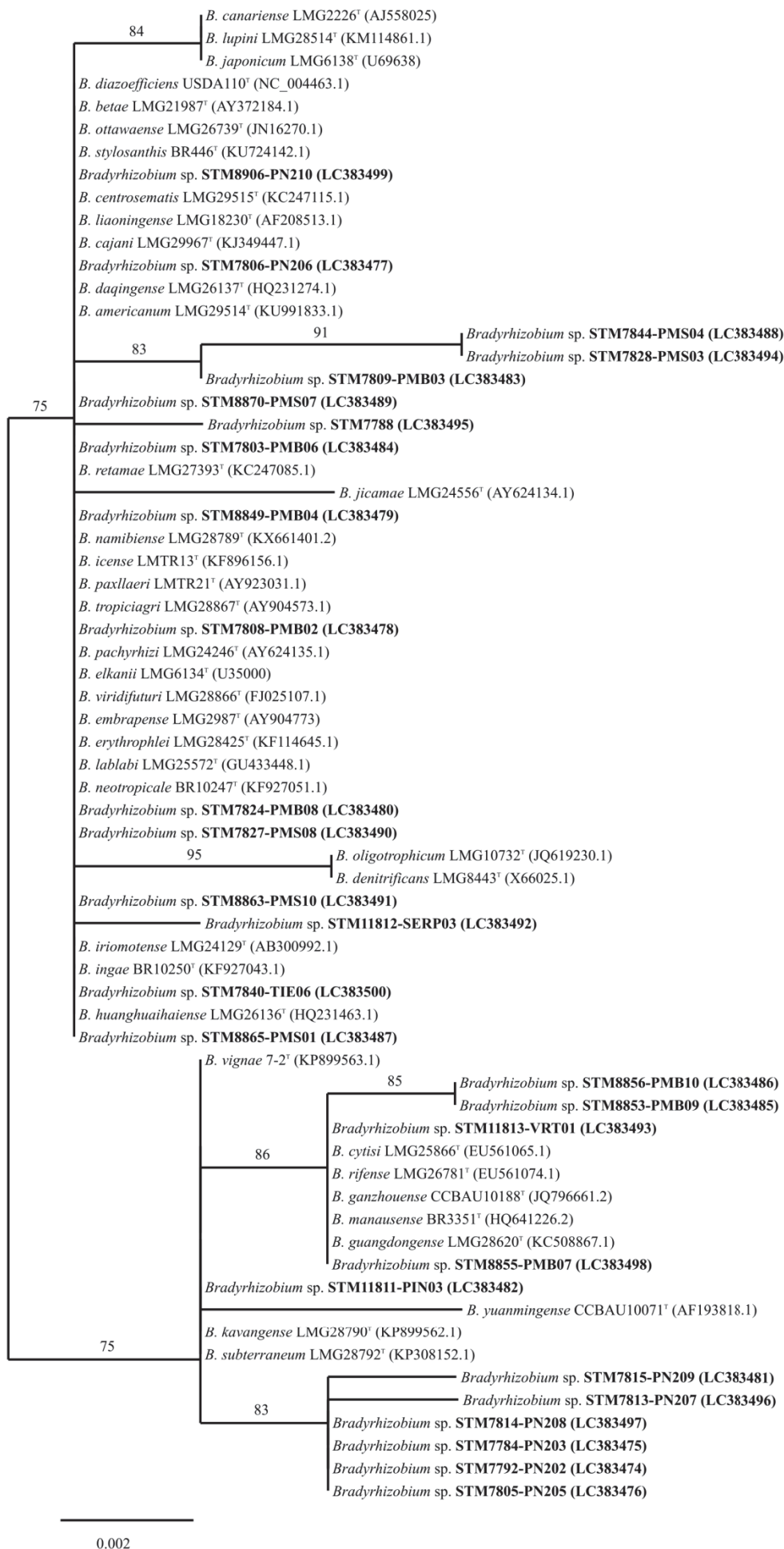
Les *Paraburkholderia* sp. sont caractérisées comme principaux symbiontes chez 47 espèces de *Mimosa* spp. (Bontemps *et al.*, 2010). De manière plus large, ces bactéries sont retrouvées associées à des légumineuses appartenant aux genres *Anadenanthera* spp., *Cyclopia* spp., *Dalbergia* spp., *Lebeckia ambigua*, *Macroptilium atropurpureum*, *Microlobius foetidus*, *Parapiptadenia* spp., *Phaseolus vulgaris*, *Piptadenia* spp., *Podalyria canescens* and *Pseudopiptadenia* spp. (Rasolomampianina *et al.*, 2005 ; Elliott *et al.*, 2007 ; Bournaud *et al.*, 2013 ; De Meyer *et al.*, 2014).

Les bactéries appartenant aux genres *Bradyrhizobium* et les *Paraburkholderia* sont donc très répandues dans les associations symbiotiques fixatrices d'azote. En revanche, peu de légumineuses sont capables d'établir une symbiose fixatrice d'azote simultanément avec ces 2 groupes de bactéries. Une étude du Brésil rapporte que des espèces de *Mimosa* (*Mimosa acutistipula* Benth., *Mimosa kalunga* M. F. Simon & C. E. Hughes, *Mimosa radula* Benth. et *Mimosa xanthocentra* Mart.) établissent des symbioses fixatrices d'azote avec des alpha- et beta-rhizobia appartenant respectivement aux genres *Rhizobium* et *Paraburkholderia* (dos Reis *et al.*, 2010).

Une étude encore plus récente rapporte que le degré d'intimité symbiotique chez *Vachellia karroo* (Hayne) Banfi & Galasso (ex *Acacia karroo*) inclut à la fois des *Rhizobium* et *Paraburkholderia* (Beukes *et al.*, 2018). Cependant, aucun test permettant de confirmer la nodulation et la capacité fixatrice d'azote de chacune des souches en conditions symbiotiques n'est mentionné dans cette étude (Beukes *et al.*, 2018). De ce fait, la capacité fixatrice d'azote des *Bradyrhizobium* et les *Paraburkholderia* reste à confirmer (Beukes *et al.*, 2018). La prudence est de mise puisque les *Burkholderia* au sens large sont naturellement présents en tant que bactéries endophytes dans les tissus internes des nodules de *Mimosa pudica* L., *Glycine max* (L.) Merr. et *Acacia seyal* Delile (Pandey *et al.*, 2005 ; Diouf *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2008).

4.6.2 L'utilité de posséder un large degré « d'intimité » symbiotique chez *A. spirorbis* pour pouvoir s'adapter à des sols métallifères et volcano-sédimentaires.

Acacia spirorbis établit naturellement des symbioses fixatrices d'azote avec des bactéries locales dans des sols métallifères (UF) et volcano-sédimentaires (VS). Ses rhizobia sont structurés par le type de sol, où les souches de *Paraburkholderia* isolées proviennent exclusivement de nodules développés dans des sols UF, tandis que les souches de *Bradyrhizobium* proviennent de nodules développés dans des sols UF et VS. Les données moléculaires rapportent que les gènes marqueurs de la résistance aux nickel et cobalt (gènes *cnrA* et *nreB*) ont été détectés trois fois plus fréquemment chez des souches (*Bradyrhizobium* sp. et *Paraburkholderia* sp. confondus) provenant de sols UF (Table 3 du deuxième article Vincent *et al.*, 2018).

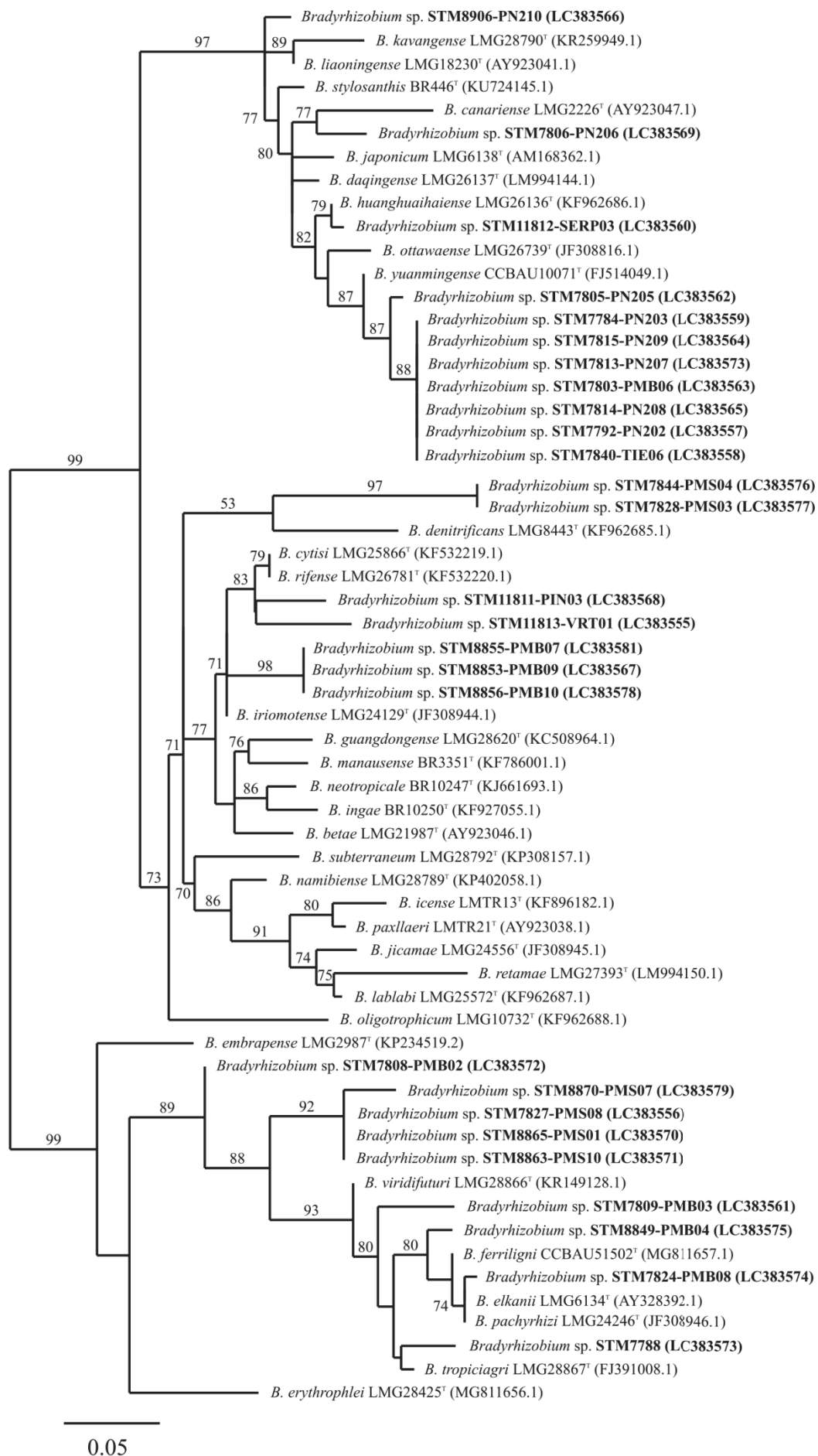


Supplementary Figure 2: Unrooted phylogenetic tree of *Bradyrhizobium* sp. symbionts of *A. spirorbis* and related species. The tree was inferred from sequences of the gene 16S rRNA. Numbers at node represent bootstrap percentages from 1,000 replicates (shown only when > 50%). Strains isolated in this study (New Caledonia) are in bold. Scale bar indicates numbers of substitutions per site.

Les sols ultramafiques (UF) sont caractérisés par une faible concentration en éléments majeurs (azote, phosphore et potassium), un fort déséquilibre du ratio calcium/magnésium et une forte concentration en oxydes de fer et éléments traces métalliques tels que le cobalt, le chrome, le manganèse et le nickel (Brooks, 1988). Les sols UF sont contraignants pour le développement des plantes et favorisent la spéciation et l'endémisme des espèces végétales terrestres (Isnard *et al.*, 2016).

Plusieurs études rapportent que la spéciation des plantes aux sols UF est également observée chez les rhizobia (Chaintreuil *et al.*, 2007 ; Gonin *et al.*, 2013 ; Klonowska *et al.*, 2012). En Nouvelle-Calédonie, la rhizosphère de *Costularia* spp., une espèce végétale se développant naturellement dans les sols UF, est dominée par le genre *Paraburkholderia* (28 %), suivi par les *Bradyrhizobium* (9 % ; Gonin *et al.*, 2013). L'étude des symbiotes de *Costularia* spp. a conduit à la description de deux nouvelles espèces de *Paraburkholderia* symbiotiques (ex *Burkholderia*) adaptées aux sols UF (Gonin *et al.*, 2013). Une étude supplémentaire a montré que la biodiversité des symbiotes rhizobiens de *Mimosa pudica* (*Cupriavidus taiwanensis*, *Rhizobium mesoamericanum*) est adaptée à des sols UF (Klonowska *et al.*, 2012). De plus, une étude rapporte que chez *Serianthes calycina* Benth., une légumineuse endémique de Nouvelle-Calédonie se développant sur des sols UF et VS, ses symbiotes appartiennent au genre *Bradyrhizobium* sp., et sont proches phylogénétiquement de l'espèce *B. elkanii* (Chaintreuil *et al.*, 2007). De manière intéressante, les auteurs rapportent que les symbiotes isolés à partir de sols UF étaient plus tolérants à la toxicité au nickel et au cobalt comparé à des souches isolées de sols VS (sans nickel ni cobalt) (Chaintreuil *et al.*, 2007). Cette résistance à la toxicité au nickel et au cobalt seraient attribuée à la présence des gènes *cnrA* et *nreB* (Chaintreuil *et al.*, 2007).

Chez *A. spirorbis*, les gènes *cnrA* et *nreB* sont plus fréquents chez des souches isolées dans des sols UF par rapport à des souches isolées de sols VS (Table 3 du deuxième article Vincent *et al.*, 2018), similaire à des résultats observés chez *S. calycina* dans les travaux de Chaintreuil *et al.*, (2007). Dans ce travail de thèse, les expériences *in vitro* menées sur la tolérance aux métaux des souches d'*A. spirorbis* (Figure 7 et Tableaux Supplémentaires 13 et 14 du deuxième article Vincent *et al.*, 2018) n'ont pas montré de corrélation significative avec la présence des gènes marqueurs de la tolérance aux métaux *cnrA* et *nreB*. Les symbiotes chez *A. spirorbis* pourraient utiliser d'autres mécanismes afin de tolérer les métaux, tels que l'exclusion, la précipitation, la bioaccumulation dans des compartiments intra- ou extra-celulaires, l'utilisation de transporteurs et/ou de chélateurs (Hafeburg & Kothe, 2007).



Supplementary Figure 3: Unrooted phylogenetic tree of *Bradyrhizobium* sp. symbionts of *A. spirorbis* and related species. The tree was inferred from sequences of the gene *dnaK*. Numbers at node represent bootstrap percentages from 1,000 replicates (shown only when > 50 %). Strains isolated in this study (New Caledonia) are in bold. Scale bar indicates numbers of substitutions per site.

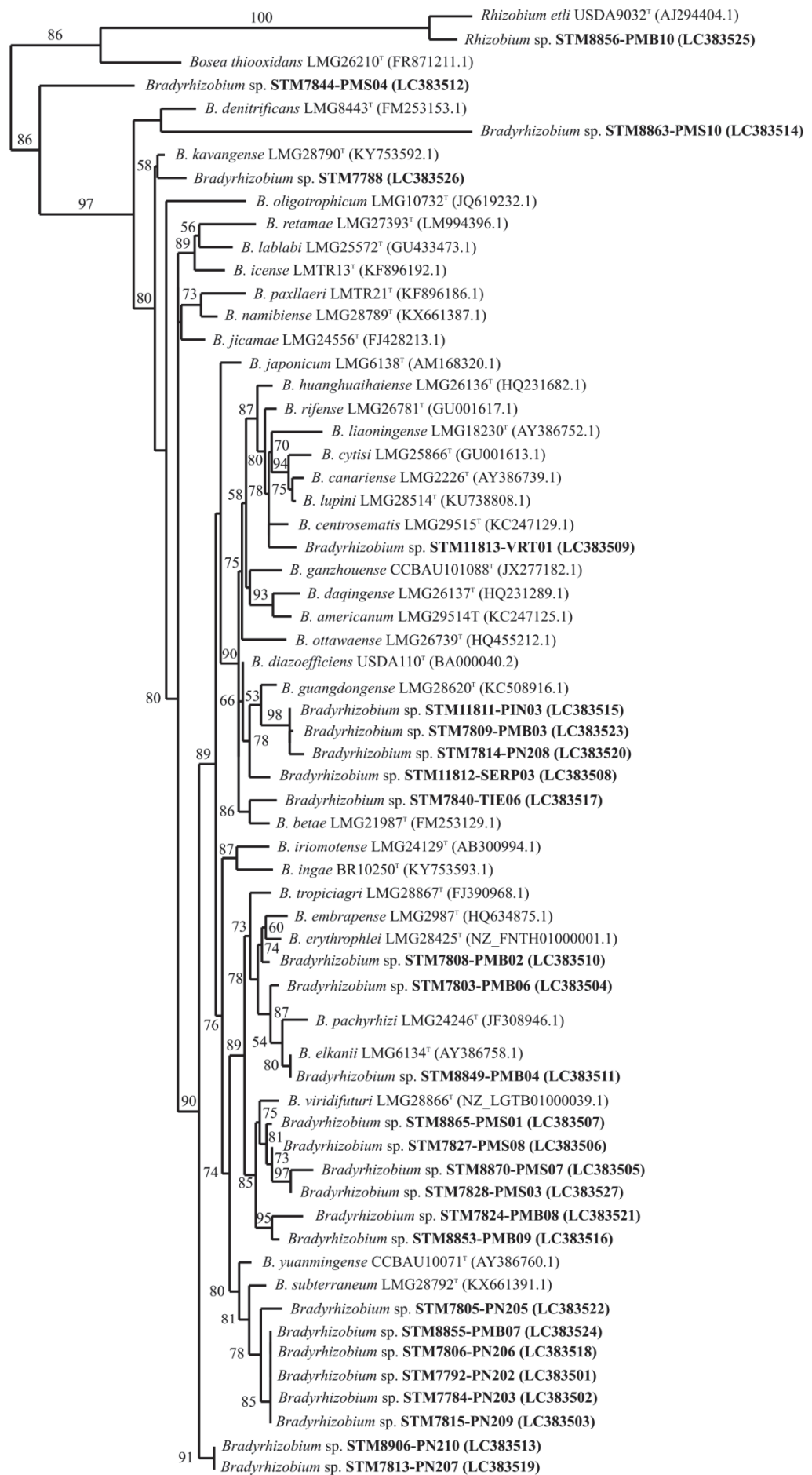
Dans les sols volcano-sédimentaires (VS), les symbiontes associés à *A. spirorbis* appartiennent au genre *Bradyrhizobium* et sont adaptés aux sols acides où le pH varie de 4,2 à 6,5 (Table 2 du deuxième article Vincent *et al.*, 2018). Ce résultat présente des similarités avec les espèces d'*Acacia* australiens se développant naturellement sur des sols acides sans métaux lourds (Ashwath *et al.*, 1995). De manière intéressante, ces espèces d'*Acacia* australiennes établissent des symbioses fixatrices d'azote avec des bactéries proches phylogénétiquement de l'espèce *Bradyrhizobium japonicum* (Lafay & Burdon, 2001 ; Leary *et al.*, 2006). Une étude rapporte que les bactéries du genre *Bradyrhizobium* sont mieux adaptées aux sols acides par rapport aux autres rhizobia retrouvés chez les espèces d'*Acacia* (Marsudi *et al.*, 1999).

4.7 Conclusion sur les caractéristiques des rhizobia associés à *A. spirorbis*

A notre connaissance, cette étude des symbiontes associés à *A. spirorbis* est la première à rapporter un degré d'intimité aussi large chez une légumineuse endémique en conditions naturelles avec (i) la présence dans les nodules de bactéries appartenant aux genres *Bradyrhizobium* et *Paraburkholderia*, (ii) la confirmation fonctionnelle et génomique de leur capacité à fixer l'azote en symbiose avec *A. spirorbis* et (iii) une diversité taxonomique et fonctionnelle de la fixation d'azote structurée par le type de sol, où les souches de *Paraburkholderia* sont exclusivement retrouvées dans des sols métallifères et où les souches de *Bradyrhizobium* sp. présentent un fonctionnement de la fixation d'azote différent en fonction du type de sol où elles ont été prélevées (métallifère ou volcano-sédimentaire). Chez *A. spirorbis* ce large degré d'intimité avec des rhizobia est complémentaire à celui déjà observé chez ses champignons ectomycorhiziens (Houlès *et al.*, 2018), ce qui pourrait être l'un des éléments clés expliquant la réussite de l'adaptation d'*A. spirorbis* à des sols contrastés.

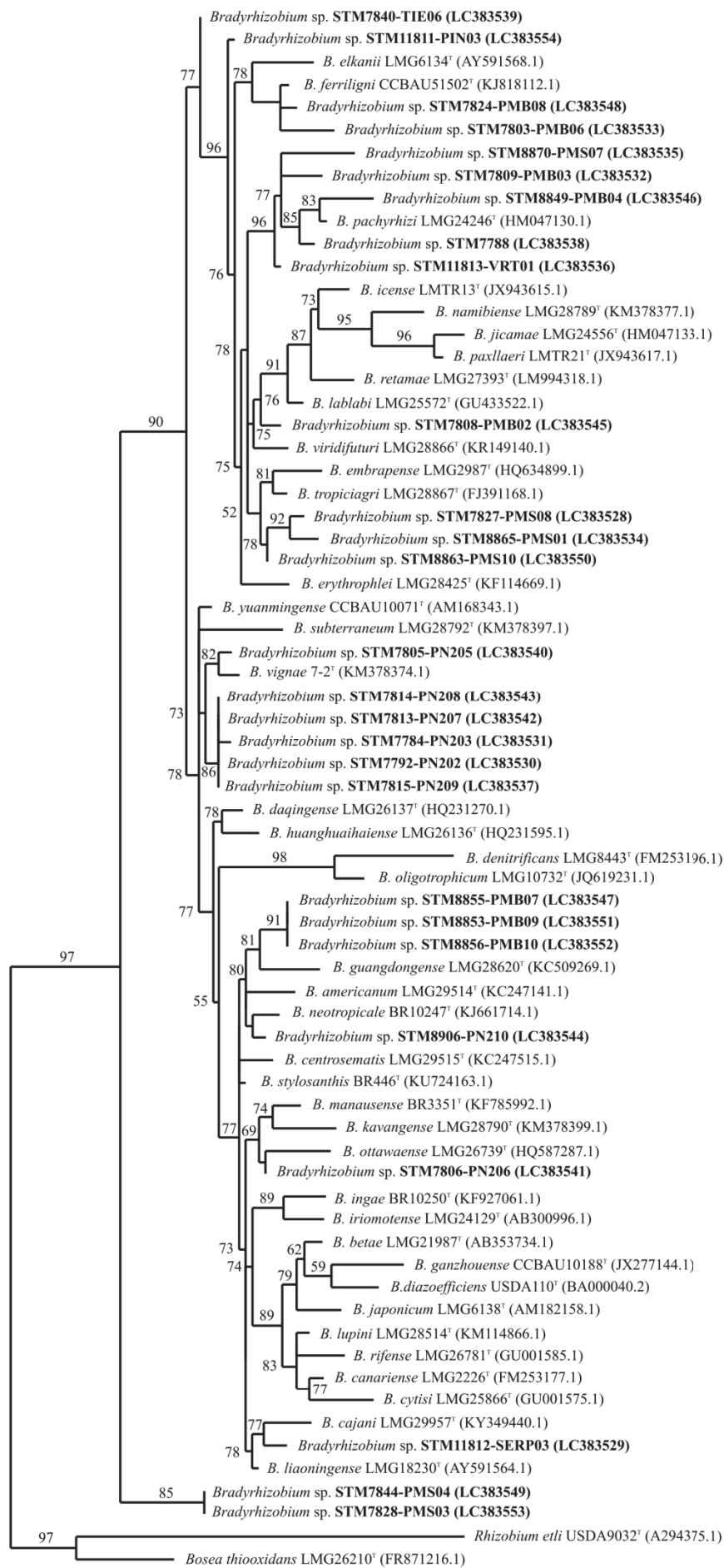
4.8 Figures Supplémentaires du deuxième article Vincent *et al.*, 2018

Cette partie présente les figures supplémentaires du deuxième article Vincent *et al.*, 2018 qui n'ont pas pu être présentées en vis-à-vis du texte de ce deuxième chapitre. Ces figures correspondent aux analyses phylogénétiques supplémentaires de gènes marqueurs de la diversité (ARNr 16S, *dnaK*, *gyrB*, *atpD* et *recA*) des souches de rhizobia isolées de nodules d'*A. spirorbis*.



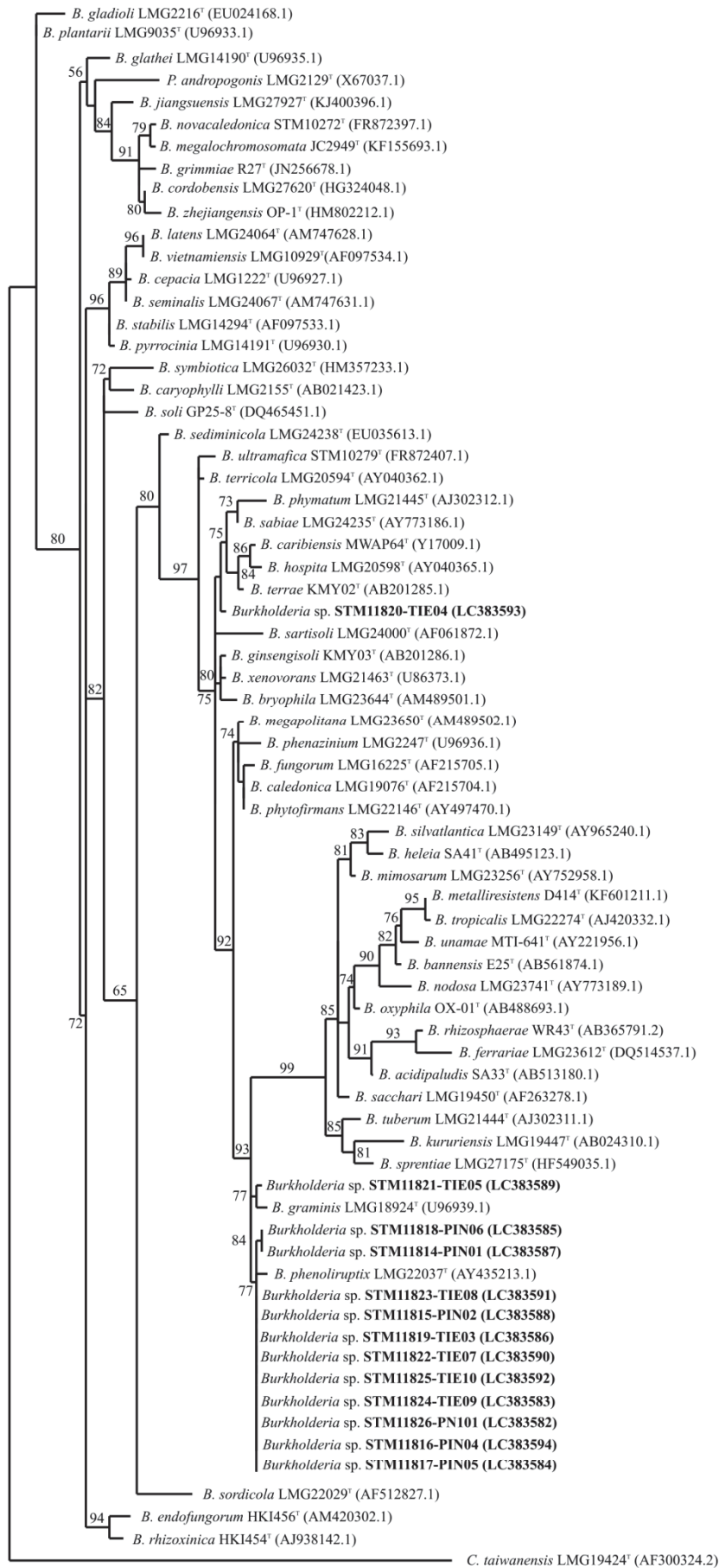
0.2

Supplementary Figure 4: Unrooted phylogenetic tree *Bradyrhizobium* sp. symbionts of *A. spirorbis* and related species. The tree was inferred from sequences of the gene *atpD*. Numbers at node represent bootstrap percentages from 1,000 replicates (shown only when > 50 %). Strains isolated in this study (New Caledonia) are in bold. Scale bar indicates numbers of substitutions per site.



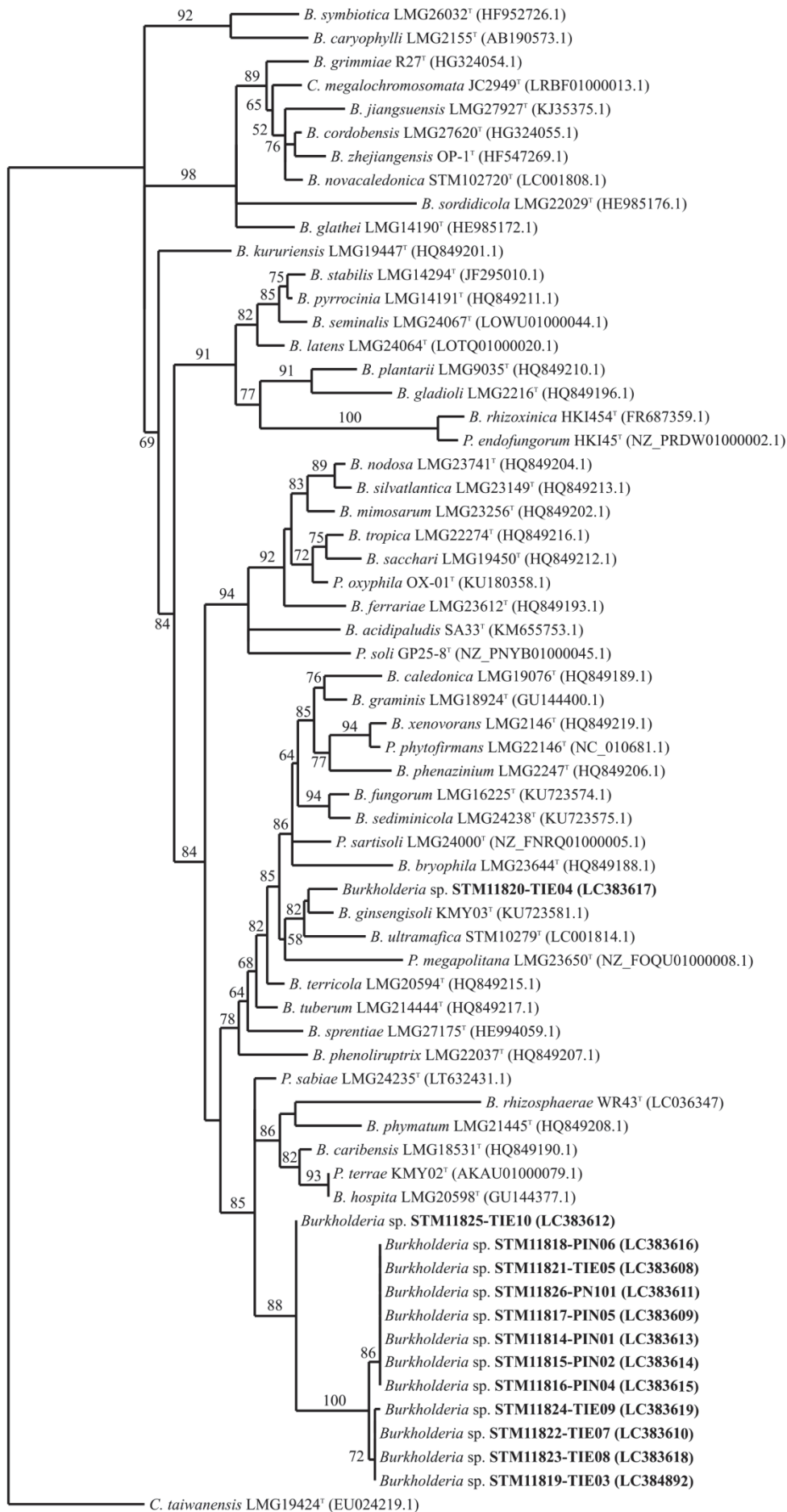
0.1

Supplementary Figure 5: Unrooted phylogenetic tree of *Bradyrhizobium* sp. symbionts of *A. spirorbis* and related species. The tree was inferred from sequences of the gene *recA*. Numbers at node represent bootstrap percentages from 1,000 replicates (shown only when > 50 %). Strains isolated in this study (New Caledonia) are in bold. Scale bar indicates numbers of substitutions per site.



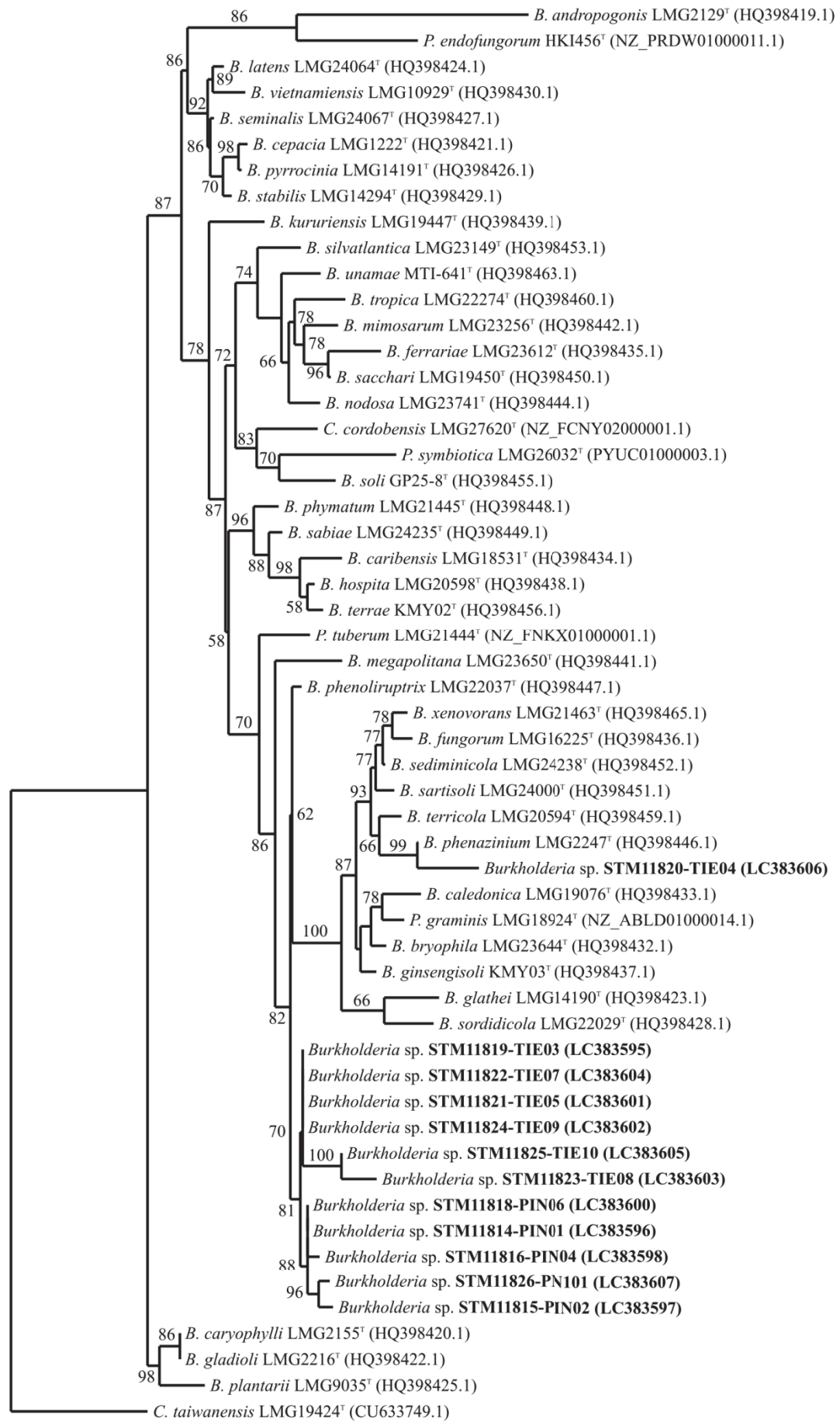
0.1

Supplementary Figure 6: Rooted phylogenetic tree of *Burkholderia sensu lato* symbionts of *A. spirorbis* and related species. The tree was inferred from sequences of the gene 16S rRNA. Numbers at node represent bootstrap percentages from 1,000 replicates (shown only when > 50 %). Strains isolated in this study (New Caledonia) are in bold. Scale bar indicates numbers of substitutions per site.



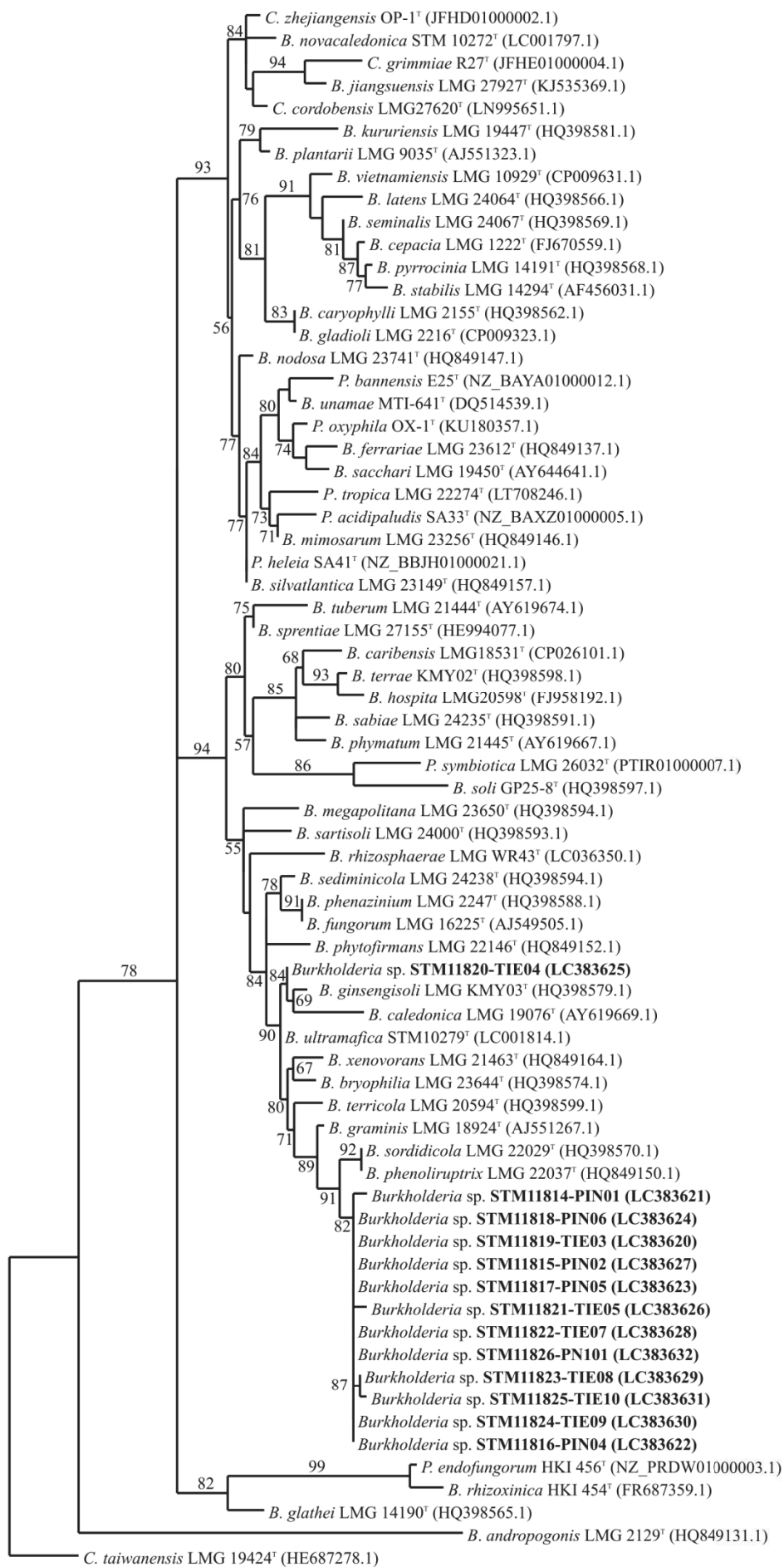
0.1

Supplementary Figure 7: Rooted phylogenetic tree of *Burkholderia sensu lato* symbionts of *A. spirorbis* and related species. The tree was inferred from sequences of the gene *gyrB*. Numbers at node represent bootstrap percentages from 1,000 replicates (shown only when > 50 %). Strains isolated in this study (New Caledonia) are in bold. Scale bar indicates numbers of substitutions per site.



0.1

Supplementary Figure 8: Rooted phylogenetic tree of *Burkholderia sensu lato* symbionts of *A. spirorbis* and related species. The tree was inferred from sequences of the gene *atpD*. Numbers at node represent bootstrap percentages from 1,000 replicates (shown only when > 50 %). Strains isolated in this study (New Caledonia) are in bold. Scale bar indicates numbers of substitutions per site.



Supplementary Figure 9: Rooted phylogenetic tree of *Burkholderia sensu lato* symbionts of *A. spirorbis* and related species. The tree was inferred from sequences of the gene *recA*. Numbers at node represent bootstrap percentages from 1,000 replicates (shown only when > 50 %). Strains isolated in this study (New Caledonia) are in bold. Scale bar indicates numbers of substitutions per site.

Chapitre 3

Gestion des éléments traces métalliques
dans les organes fixateurs d'azote chez
A. spirorbis

5.1 Introduction

5.1.1. Contexte de l'étude

Une des contraintes majeures rencontrées par les organismes (végétaux, animaux, et microorganismes) dans les sols est attribuée à la présence d'éléments traces métalliques (ETM) en fortes concentrations souvent toxiques (Zahran, 1999 ; Emamverdian *et al.*, 2015). La toxicité des ETM se traduit par l'induction d'un stress oxydatif, favorisant la production de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) dans les tissus des organismes. Les DRO induisent un déséquilibre de l'homéostasie cellulaire, brisent les brins d'ADN, endommagent les protéines, la paroi cellulaire, les pigments photosynthétiques et entraînent la mort de la cellule (Schützendübel & Polle, 2002). Dans les écosystèmes, des études rapportent que les ETM affectent le développement des plantes, dont les légumineuses, mais aussi des microorganismes, dont les rhizobia. De plus, les ETM affectent également le fonctionnement de la symbiose fixatrice d'azote (Zahran, 1999 ; Emamverdian *et al.*, 2015). Certains de ces ETM, notamment le nickel sont particulièrement mobiles et peuvent entrer dans les tissus internes des végétaux au niveau de leurs racines, puis circuler dans l'intégralité de la plante *via* les vaisseaux du xylème et du phloème (Ishtiaq & Mahmood, 2011).

Acacia spirorbis est une légumineuse capable de se développer naturellement sur des sols contrastés et parfois extrême, notamment sur des sols riches en ETM (Ducouso *et al.*, 2014 ; Houlès *et al.*, 2018 ; Vincent *et al.*, 2018). Dans le chapitre précédent nous avons démontré que le cortège de rhizobia associé à *A. spirorbis* présentait des caractéristiques taxonomiques et fonctionnelles se structurant en fonction des sols métallifères et volcano-sédimentaires. L'étude de ces rhizobia s'est uniquement concentrée sur des microorganismes présents dans une même île sur des sols UF et VS, afin d'éviter des erreurs d'interprétation liées à la biogéographie. De ce fait, les rhizobia des sols calcaires n'ont pas été caractérisés. Néanmoins, les résultats précédents rapportent que la symbiose fixatrice d'azote est fonctionnelle sur des sols calcaires (CA), métallifères (UF) et volcano-sédimentaires (VS), apportant en moyenne plus de 80% de l'azote total chez *A. spirorbis* (Vincent *et al.*, 2018). Ces trois types de sol présentent des teneurs variables en ETM, où (i) les sols calcaires sont riches en aluminium, (ii) les sols métallifères riches en chrome, cobalt, fer, manganèse et nickel et (iii) les sols volcano-sédimentaires possèdent des valeurs intermédiaires en ETM par rapport aux sols calcaires et métallifères.

Chez *Acacia spirorbis*, le fait que la symbiose fixatrice d'azote soit fonctionnelle sur des sols CA, UF et VS riches en ETM soulève la question de savoir comment cette légumineuse gère les éléments traces métalliques au niveau de ses tissus racinaires et plus particulièrement, au niveau des nodules afin de caractériser la contribution de ses symbiontes à la gestion de ces ETM. Pour répondre à cette question, des nodules et des racines d'*A. spirorbis* ont été récoltés dans les sols CA, UF et VS afin de (i) doser les éléments chimiques dans ces tissus, (ii) localiser les métaux dans ces tissus par

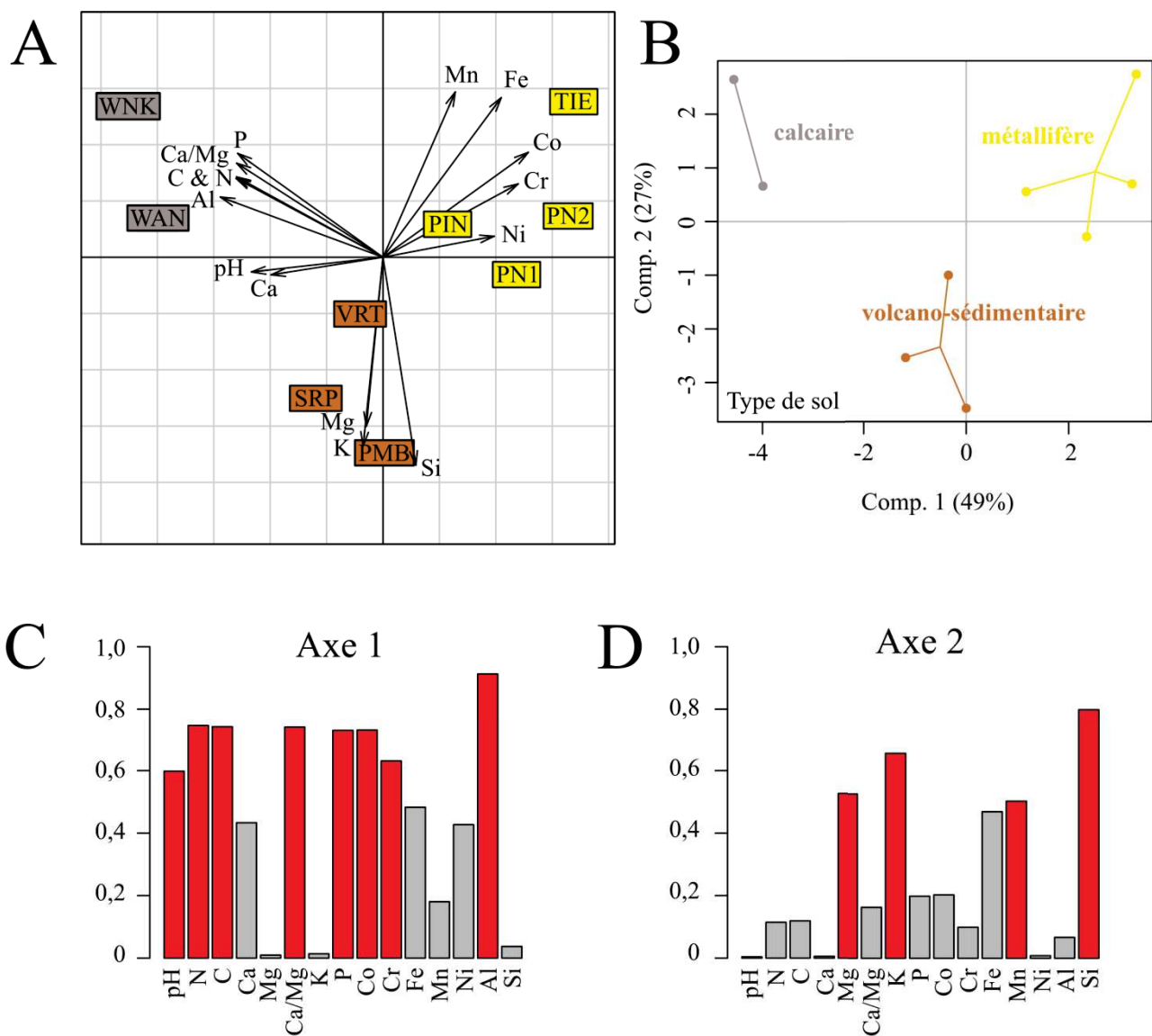


Figure 42 : Analyse en composantes principales (ACP) des propriétés géochimiques des sols de neuf sites d'étude où se développe naturellement *A. spirorbis*. Le panel A) présente les propriétés géochimiques (sous forme de vecteurs) des sites d'étude. Le panel B) présente les sites d'étude en fonction de leur type de sol. Les panels C) et D) correspondent aux corrélations des paramètres numériques inclus dans l'ACP par rapport aux axes 1 et 2, respectivement. Les corrélations supérieures à $r = 0,5$ sont symbolisées en rouge afin de visualiser les variables qui contribuent le plus à la structuration des axes de l'ACP.

Code couleur : gris : sols calcaires ; jaune : sols métallifères ; marron : sols volcano-sédimentaires.

Abréviations : PN1 : Pandanus 1 ; PN2 ; Pandanus 2 ; PIN ; Pindaï ; PMB ; Poum Malabou ; SRP ; Serpent ; TIE ; Tiébaghi ; VRT ; Vertisol ; WAN ; Wanaham ; WNK ; Wanek.

microscopie électronique à balayage (MEB) et (iii) comparer les données récoltées par rapport aux teneurs des éléments dans les sols afin de d'étudier la gestion des ETM chez la plante.

5.1.2 Méthodologie

Neuf sites d'étude ont été définis afin d'être représentatifs des trois types de sol où se développe naturellement *A. spirorbis* : deux sites d'étude sur sols calcaire (Wanaham et Wanek) ; quatre sites d'étude sur sols métallifères (Pandanus 1, Pandanus 2, Pindaï et Tiébaghi) ; trois sites sur sols volcano-sédimentaires (Poum Malabou ; Serpent et Vertisol) (Figure 42 et Tableau 6). Les propriétés géochimiques des sols des sites d'études incluent le pH, des teneurs en éléments majeurs pour la nutrition des plantes (azote, carbone, calcium, magnésium et phosphore), des teneurs en ETM (aluminium, cobalt, chrome, fer, manganèse et nickel), des teneurs en silicium et le ratio Ca/Mg (Tableau 6). Ces analyses sont présentées en Figure 42 sous la forme d'une analyse en composantes principales (ACP), où les sites d'étude sont placés les uns par rapport aux autres en fonction de leur propriétés géochimiques (Figure 42A) et présentées en fonction de leur type de sol (Figure 42B). De plus, les corrélations des propriétés géochimiques par rapport aux axes 1 et 2 de l'ACP sont disponibles en Figure 42C et 42D.

Les sols calcaires (CA) sont caractérisés par de fortes teneurs en éléments majeurs tels que l'azote, le carbone, le phosphore (3618 ± 958 ; 8333 ± 2167 et 7916 ± 367 mg.kg⁻¹, respectivement) (Figure 42 et Tableau 6). De plus, ces sols présentent une forte teneur en aluminium avec une moyenne de 183799 ± 13326 mg.kg⁻¹ et un pH neutre ($7,0 \pm 0,4$) (Figure 42 et Tableau 6).

Les sols métallifères (UF) présentent des teneurs moyennes en cobalt, chrome, fer, manganèse et nickel plus élevées (649 ± 127 ; $21\ 987 \pm 6022$; $341\ 383 \pm 99\ 680$; 8324 ± 6354 et 5692 ± 2455 mg.kg⁻¹, respectivement) par rapport aux sols CA (58 ± 5 ; 570 ± 9 ; $137\ 364 \pm 19\ 771$; 4435 ± 1227 et 49 ± 10 mg.kg⁻¹, respectivement) et aux sols VS (66 ± 23 ; 737 ± 546 ; $71\ 558 \pm 12\ 931$; 1001 ± 147 et 694 ± 780 mg.kg⁻¹, respectivement) (Figure 42 et Tableau 6).

Les sols volcano-sédimentaires (VS) possèdent de fortes teneurs moyennes en magnésium, en potassium et en silicium ($29\ 136 \pm 15\ 539$; 3757 ± 2535 et $233\ 597 \pm 23\ 367$ mg.kg⁻¹, respectivement) par rapport aux sols CA ($19\ 225 \pm 16\ 776$; 299 ± 110 et $19\ 899 \pm 12\ 666$ mg.kg⁻¹, respectivement) et également aux sols UF ($16\ 543 \pm 14\ 585$; 359 ± 458 et $104\ 515 \pm 52\ 066$ mg.kg⁻¹, respectivement) (Figure 42 et Tableau 6).

5.1.3 Approches effectuées pour décrire la gestion de métaux chez *A. spirorbis*

Ce troisième chapitre se découpe en quatre approches différentes en fonction des questions scientifiques posées. Chaque approche présente d'abord la question scientifique abordée, la

Tableau 6 : Propriétés géochimiques des sols des neuf sites d'étude où pousse naturellement *A. spirorbis*. Les teneurs en éléments sont des moyennes \pm écarts types exprimées en mg.kg^{-1} ($n = 3$). Les parties 1 et 2 du tableau présentent le pH, le ratio Ca/Mg et les teneurs en éléments majeurs. La partie 3 du tableau présente les teneurs en éléments traces métalliques.

(partie 1)						
Type de sol	Site	pH	C	N	P	K
Calcaire	WNK	7,0 \pm 0,3	10500 \pm 3960	4575 \pm 1676	8284 \pm 2130	409 \pm 34
	WAN	7,8 \pm 0,1	6167 \pm 1621	2660 \pm 553	7549 \pm 1650	189 \pm 34
Métallifère	PN1	6,4 \pm 0,1	2567 \pm 350	1010 \pm 20	35 \pm 15	49 \pm 8
	PN2	5,9 \pm 0,1	800 \pm 141	380 \pm 57	54 \pm 76	149 \pm 82
	TIE	5,4 \pm 0,2	1350 \pm 354	470 \pm 85	129 \pm 6	89 \pm 21
	PIN	6,8 \pm 0,2	4900 \pm 2687	2175 \pm 742	141 \pm 25	1151 \pm 191
Volcano-sédimentaire	PMB	6,5 \pm 0,3	2267 \pm 1097	1027 \pm 277	100 \pm 19	6104 \pm 2771
	VRT	5,8 \pm 0,6	4550 \pm 3323	1695 \pm 1096	162 \pm 48	236 \pm 97
	SRP	6,5 \pm 0,1	3300 \pm 4424	1427 \pm 1522	431 \pm 160	4930 \pm 2063

(partie 2)					
Type de sol	Site	Ca	Mg	ratio Ca/Mg	Si
Calcaire	WNK	12610 \pm 2729	2449 \pm 490	5,14 \pm 0,09	32565 \pm 1747
	WAN	83760 \pm 36098	36001 \pm 15727	2,33 \pm 0,01	7233 \pm 309
Métallifère	PN1	1107 \pm 310	40668 \pm 14216	0,03 \pm 0,01	143427 \pm 28770
	PN2	150 \pm 28	14297 \pm 6478	0,01 \pm 0,01	110525 \pm 70788
	TIE	225 \pm 21	2107 \pm 103	0,11 \pm 0,02	17695 \pm 629
	PIN	4635 \pm 1605	9099 \pm 1990	0,50 \pm 0,07	146415 \pm 4278
Volcano-sédimentaire	PMB	1020 \pm 53	44445 \pm 4357	0,02 \pm 0,01	265167 \pm 17347
	VRT	6095 \pm 403	8171 \pm 703	0,75 \pm 0,11	226270 \pm 750
	SRP	46780 \pm 10284	34792 \pm 5732	1,34 \pm 0,11	209353 \pm 7702

(partie 3)							
Type de sol	Site	Al	Co	Cr	Fe	Mn	Ni
Calcaire	WNK	197125 \pm 11561	64 \pm 3	561 \pm 31	157135 \pm 10359	5662 \pm 83	39 \pm 4
	WAN	170473 \pm 34078	53 \pm 11	579 \pm 118	117593 \pm 24394	3208 \pm 699	59 \pm 18
Métallifère	PN1	15647 \pm 2640	528 \pm 39	21339 \pm 4276	267937 \pm 38305	4733 \pm 937	8593 \pm 1521
	PN2	13805 \pm 4193	797 \pm 571	31598 \pm 12231	327680 \pm 112982	4783 \pm 3212	3970 \pm 973
	TIE	45875 \pm 2638	753 \pm 55	15047 \pm 1464	508175 \pm 4094	19328 \pm 2996	2650 \pm 39
	PIN	52405 \pm 3005	517 \pm 154	19965 \pm 957	261740 \pm 16207	4452 \pm 525	7556 \pm 3463
Volcano-sédimentaire	PMB	67287 \pm 11740	98 \pm 14	1509 \pm 142	61920 \pm 2414	818 \pm 114	1792 \pm 129
	VRT	76800 \pm 3168	48 \pm 3	344 \pm 5	89865 \pm 2015	1008 \pm 108	49 \pm 2
	SRP	81020 \pm 2959	52 \pm 3	359 \pm 64	62980 \pm 1666	1178 \pm 151	241 \pm 72

Abréviations : PIN : Pindaï ; PN1 : Pandanus 1 ; PN2 : Pandanus 2 ; PMB : Poum Malabou ; TIE : Tiébaghi ; SRP : Serpent ; VRT : Vertisol ; WAN : Wanaham ; WNK : Wanek

méthodologie utilisée, les résultats obtenus et les conclusions tirées avant de passer à la partie suivante.

La première approche a consisté à caractériser la signature en éléments chimiques des nodules chez *A. spirorbis* en fonction de leur type de sol d'origine. Pour cela, des dosages en éléments majeurs pour la nutrition des plantes et en ETM ont été effectués à partir de nodules par spectrométrie à émission optique (OES) couplée à une technique analytique à plasma induit (ICP). Les teneurs en éléments des nodules sont analysées en fonction des propriétés géochimiques des sols et permettent de vérifier si un lien entre les nodules et les éléments du sol existe.

La seconde approche concerne la localisation cellulaire (histolocalisation) des éléments chimiques dans des nodules et des racines. Pour cela, des dosages en éléments majeurs et en ETM ont été effectués par microscopie électronique à balayage (MEB) sur des échantillons de racines et de nodules. Les images et les dosages obtenus sont analysés en fonction du type de tissus. Ces données permettent de détecter la présence des ETM dans les racines et/ou les nodules chez *A. spirorbis* au regard du type de sol dans lesquels ces tissus se sont développés.

La troisième approche est une quantification des éléments au niveau des tissus internes et des parois des nodules. Les éléments majeurs et les ETM ont été dosés par une ICP couplée à une ablation au laser (AL) sur des échantillons de nodules, soit au niveau de leurs tissus internes, soit au niveau de leurs parois. Ces données sont analysées en fonctions de la localisation cellulaire (tissu interne ou paroi) et du type de sol, afin de détecter des signatures en éléments chimiques caractéristiques des propriétés géochimiques du sol.

La quatrième et dernière approche cherche à établir des corrélations entre la présence des ETM dans le compartiment du sol, et celle dans les parois des nodules, des tissus internes et des racines de la plante. Pour cela, des calculs de corrélations ont été effectués sur les données obtenues avec les approches précédentes. Les résultats sont présentés sous la forme d'une analyse en composantes principales et un tableau synthétisant les résultats des tests de corrélations. Ces analyses permettent de détecter si *A. spirorbis* gère potentiellement certains ETM au niveau de ses nodules.

5.2 Première approche : dosage des ETM dans les nodules et analyse en fonction du type de sol

5.2.1 Problématique et méthodologie

La première approche cherche à (i) évaluer la présence ou non des ETM dans les nodules d'*A. spirorbis* et (ii) de vérifier si les nodules présentent une signature en éléments chimiques qui reflète le type de sol dans lequel il se sont développés.

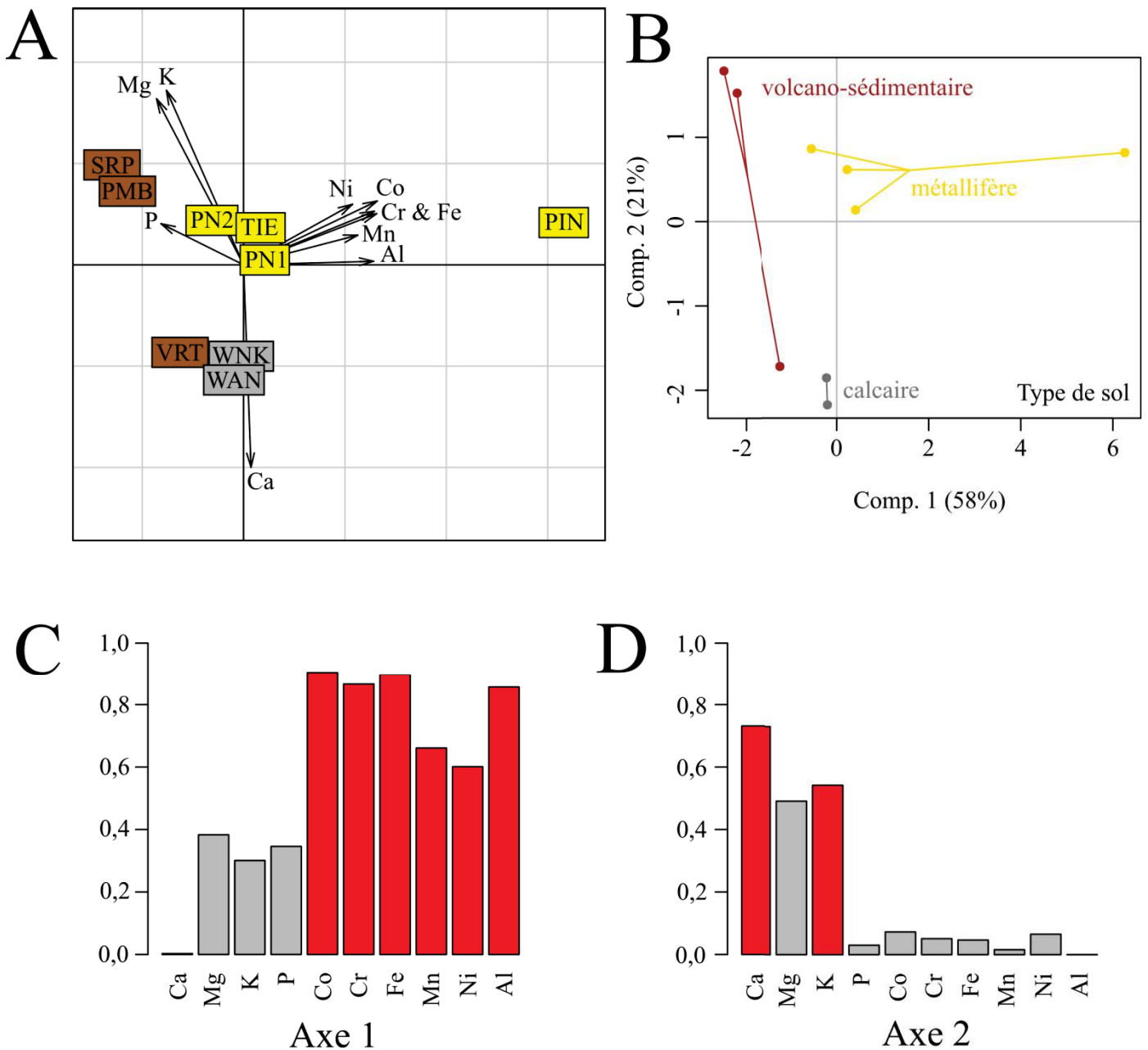


Figure 43 : Analyse en composantes principales (ACP) des teneurs des éléments totaux des nodules d'*A. spirorbis* prélevés sur neuf sites d'études présentant des sols contrastés. Le panel A) présente la distribution des nodules les uns par rapport aux autres en fonction de leurs propriétés chimiques et des sites d'études. Le panel B) présente les teneurs en éléments chimiques des nodules en fonction de leurs types de sol d'origine. Les panels C) et D) présentent les corrélations des éléments chimiques par rapport aux axes 1 et 2 de l'ACP, respectivement. Les corrélations supérieures à $r = 0,5$, sont symbolisées en rouge afin de visualiser les variables qui contribuent le plus à la structuration des axes de l'ACP. Code couleur : orange : sols métallifères ; marron : sols volcano-sédimentaires ; gris : sols calcaires. Abréviations des sites d'études : PN1 : Pandanus 1 ; PN2 : Pandanus 2 ; PIN : Pindaï ; PMB : Poum Malabou ; SRP : Serpent ; TIE : Tiébaghi ; VRT : Vertisol ; WAN : Wanaham ; WNK : Wanek

Pour vérifier cette hypothèse, des nodules ont été récoltés sur un total de neuf sites d'études, caractérisés par des sols calcaires (sites Wanaham et Wanek), des sols métallifères (sites Pandanus 1, Pandanus 2, Pindaï et Tiébaghi) et des sols volcano-sédimentaires (sites Poum Malabou, Serpent et Vertisol). L'objectif étant de doser les éléments uniquement présents dans les nodules (et non ceux du sol), il faut prendre en compte le fait que les nodules prélevés directement sur le terrain peuvent potentiellement présenter des particules de sol et des éléments chimiques adsorbés sur la surface des nodules. Pour remédier à cela, les surfaces des nodules ont été lavées à l'EDTA durant 24 h à une concentration de 10 mM, puis rincés 3 fois à l'eau milli-Q. Les nodules ont ensuite été placés dans une étuve à 60°C pendant 48 h. Les teneurs de dix éléments chimiques ont été dosées par ICP-OES, incluant des éléments majeurs (calcium, manganèse, potassium et phosphore) et des éléments traces métalliques (aluminium, chrome, cobalt, fer, manganèse, nickel) (Tableau 7). Pour chacun des sites d'étude, les teneurs en éléments présentées correspondent à un échantillon regroupant plusieurs nodules prélevés sur les racines d'*A. spirorbis*, afin d'avoir une quantité suffisante de matière sèche (au minimum de 10 mg) pour doser les éléments par ICP-OES. Les résultats sont exprimés en mg.kg^{-1} (Tableau 7).

Une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée sur les teneurs en éléments chimiques des nodules d'*A. spirorbis*. Cette analyse permet de visualiser la répartition des échantillons de nodules les uns par rapport aux autres (i) en fonction de leurs teneurs en éléments chimiques relatives à l'origine des sites de prélèvement (Figure 43A) et (ii) en fonction du type de sol d'origine de prélèvement des nodules (Figure 43B). De plus, cette analyse présente les corrélations des teneurs en éléments par rapport aux axes 1 et 2 de l'ACP, (Figures 43C et 43D, respectivement). Les teneurs brutes des éléments qui ont servis à réaliser cette ACP sont présentées dans le Tableau 7. Afin de détecter une relation potentielle entre les éléments du sol et ceux dans les nodules d'*A. spirorbis*, des tests non-paramétriques de corrélation de rang de Spearman ont été effectués sur les teneurs en éléments chimique dosés dans les nodules par rapport aux teneurs en éléments chimiques dosés dans les sols (Tableau 8).

5.2.2 Résultats de la première approche

De manière générale, les résultats des analyses ICP-OES menées sur des nodules entiers d'*A. spirorbis* présentent des valeurs contrastées en éléments majeurs et en ETM en fonction des sites d'étude et du type de sol (Figure 43 et Tableau 7). Ces résultats sont visualisés sous la forme d'une ACP où les axes 1 et 2 expliquent 77% de la variation totale des données Figure 43.

Concernant les éléments majeurs, les teneurs en calcium et phosphore séparent les nodules développés dans des sols UF par rapport à des nodules développés dans des sols CA et VS (Figure 43A). En effet, les teneurs en éléments majeurs des nodules développés sur sols UF présentent des teneurs en calcium respectivement 2 et 3 fois moins élevées ($1,45 \pm 0,81 \text{ g.kg}^{-1}$) par rapport aux sols

Tableau 7 : Résultats des analyses ICP-OES¹ des teneurs en éléments chimiques des nodules d'*A. spirorbis* prélevés sur neuf sites d'étude aux sols contrastés (calcaire, métallifères et volcano-sédimentaire). Les éléments majeurs (calcium, potassium, magnésium et phosphore) sont exprimés en g.kg⁻¹. Les éléments traces métalliques (aluminium, cobalt, chrome, fer, manganèse et nickel) sont exprimés en mg.kg⁻¹.

Type de sol	Site d'étude	Ca	K	Mg	P	Al	Co	Cr	Fe	Mn	Ni
Calcaire	WNK	4,02	0,36	1,43	0,07	2972	3	10	4803	241	4
	WAN	4,96	0,56	1,19	0,08	7650	4	31	7416	101	20
Métallifère	PN1	1,19	0,19	5,31	0,01	357	22	111	9229	62	1739
	PN2	0,82	3,62	5,38	0,06	198	27	311	10 184	156	434
	TIE	0,97	3,80	3,17	0,08	3450	21	255	33 578	557	223
	PIN	2,83	0,91	1,32	0,05	26 191	119	4344	17 5781	665	1893
Volcano-sédimentaire	PMB	1,28	7,47	6,45	1,07	854	1	1	571	14	27
	VRT	5,87	1,76	3,73	0,94	1065	1	4	1639	25	13
	SRP	1,59	7,09	8,22	1,22	237	1	7	741	16	62

Notes : ¹ICP-OES : technique analytique à plasma induit couplée à spectrométrie à émission optique
 Abréviations de sites d'études : PN1 ; Pandanus 1 ; PN2 ; Pandanus 2 ; PIN ; Pindaï ; PMB ; Poum Malabou ; SRP ; Serpentine ; TIE ; Tiébaghi ; VRT ; Vertisol ; WAN ; Wanaham ; WNK ; Wanek

Tableau 8 : Résultats des tests de corrélations non-paramétriques de Spearman entre les teneurs en éléments des nodules dosés par ICP-OES¹ et les éléments du sol dosés par ICP-MS².

	Ca	K	Mg	P	Al	Co	Cr	Fe	Mn	Ni
Significativité de la corrélation	*	NS	NS	NS	NS	*	*	**	*	***
Valeur de <i>rho</i>	0,82	0,17	0,40	0,35	0,35	0,76	0,75	0,88	0,78	0,97

Notes : Significativité des tests de corrélations : NS : P > 0,05 ; * : P < 0,05 ; ** : P < 0,01 ; *** : P < 0,001

¹ICP-OES : technique analytique à plasma induit couplée à spectrométrie à émission optique

²ICP-MS : technique analytique à plasma induit couplée à une spectrométrie de masse

VS ($2,91 \pm 2,09 \text{ g.kg}^{-1}$) et CA ($4,49 \pm 0,47 \text{ g.kg}^{-1}$). De plus, les nodules développés sur sols UF présentent des teneurs en phosphore ($491 \pm 232 \text{ mg.kg}^{-1}$) respectivement 1,4 et 2,2 fois moins élevées par rapport aux sols CA ($713 \pm 42 \text{ mg.kg}^{-1}$) et VS ($1076 \pm 115 \text{ mg.kg}^{-1}$). De manière notable, une corrélation significative a été détecté entre les teneurs en calcium des nodules et les teneurs en calcium dans les sols ($P < 0,05$; $r = 0,82$; Tableau 8).

Concernant les ETM, les nodules développés dans des sols UF (symbolisés par un rectangle jaune) se séparent horizontalement des nodules développés dans des sols CA et VS, respectivement symbolisés en gris et marron (Figure 4A). Cette séparation horizontale est principalement représentée par des teneurs en ETM, représentées par des vecteurs incluant : le cobalt, le chrome, le fer, le manganèse et le nickel (Figure 43A). Les teneurs en aluminium sont respectivement 1,4 et 10 fois plus concentrées dans des nodules provenant de sols UF ($7549 \pm 10840 \text{ mg.kg}^{-1}$) par rapport aux sols CA ($5310 \pm 2339 \text{ mg.kg}^{-1}$) et aux sols VS ($719 \pm 351 \text{ mg.kg}^{-1}$) (Tableau 7). Les nodules développés dans des sols UF sont en moyenne 61 et 332 fois plus concentrés en chrome ($1255 \pm 1749 \text{ mg.kg}^{-1}$) par rapport aux sols CA ($20,5 \pm 10,6 \text{ mg.kg}^{-1}$) et VS ($3,8 \pm 2,1 \text{ mg.kg}^{-1}$) (Tableau 7). Il en va de même pour les teneurs en cobalt, où les nodules développés sur sols UF sont en moyenne 12 et 64 fois plus concentrés en cobalt ($47,2 \pm 41,4 \text{ mg.kg}^{-1}$) par rapport aux sols CA ($3,80 \pm 0,40 \text{ mg.kg}^{-1}$) et aux sols VS ($0,73 \pm 0,79 \text{ mg.kg}^{-1}$) (Tableau 7). Le fer est respectivement 9 et 58 fois plus concentré dans les nodules développés sur sol UF ($57193 \pm 69157 \text{ mg.kg}^{-1}$) rapport aux sols CA ($6109 \pm 1307 \text{ mg.kg}^{-1}$) et aux sols VS ($983 \pm 468 \text{ mg.kg}^{-1}$) (Tableau 7). Les teneurs en manganèse sont respectivement 2 et 20 fois plus élevées dans les nodules prélevés sur sols UF ($360 \pm 256 \text{ mg.kg}^{-1}$) comparé aux sols CA ($171 \pm 70 \text{ mg.kg}^{-1}$) et VS ($18 \pm 5 \text{ mg.kg}^{-1}$) (Tableau 7). Le nickel est respectivement 89 et 31 fois plus concentré dans des nodules provenant de sols UF ($1072 \pm 750 \text{ mg.kg}^{-1}$) par rapport aux sols CA ($12 \pm 8,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) et aux sols VS ($34 \pm 21 \text{ mg.kg}^{-1}$) (Tableau 7). Pour finir, plusieurs corrélations significatives ont été détectées entre les teneurs en ETM dans les nodules et celles dans les sols, incluant le chrome ($P < 0,05$; $r = 0,75$), le cobalt ($P < 0,05$; $r = 0,76$), le fer ($P < 0,01$; $r = 0,88$), le manganèse ($P < 0,05$; $r = 0,78$) et le nickel ($P < 0,001$; $r = 0,97$) (Tableau 8).

5.2.3 Discussion

L'ensemble de ces données indique que plusieurs ETM (aluminium, cobalt, chrome, manganèse et nickel) sont présents dans les nodules d'*A. spirorbis* (Tableau 7). Leurs teneurs sont corrélés avec les teneurs en ETM dans les sols (Tableau 8). Les nodules d'*A. spirorbis* présentent donc des signatures chimiques caractéristiques de leur type de sol d'origine (Figure 43). Cette première approche permet de valider le fait que les organes fixateurs d'azote chez *A. spirorbis* sont concentrés en ETM. De plus, le premier chapitre de ce travail de thèse rapporte que la fixation d'azote est effective sur les sols CA, UF et VS (Vincent *et al.*, 2018).

Tableau 9 : Synthèse de l’histolocalisation des éléments chimiques retrouvés au niveau de la paroi du nodule et de la racine chez *A. spirorbis*. Les échantillons sont organisés en fonction du type de sol et du site d’étude. Les informations présentées renseignent la nature des éléments chimiques concentrés dans la paroi du nodule et de la racine. La présence de cristaux est également précisée, en ajoutant le type d’élément chimique composant ces cristaux.

Type de sol	Site	Éléments concentré dans la paroi du nodule ¹	Cristaux dans le nodule ²	Éléments concentré dans la paroi racinaire ¹	Cristaux dans la racine ²
Calcaire	EAS	aucun	non	ND	ND
	WAN	Al et Fe	oui (Al)	ND	ND
	WNK	Al et Fe	non	Al	oui (Al et Ca)
Métallifère	PN1	Co, Cr, Fe et Si	oui (indéterminé)	aucun	oui (Ca)
	PN2	Al, Fe, Mg et Si	non	Al, Co, Cr, Fe et Mn	oui (Ca)
	TIE	Al, C, Fe, Mg, O, S et Si	oui (Fe)	Al et Fe	oui (Fe)
Volcano-sédimentaire	PMB	Al, Ca, Mg, O, S et Si	non	Ca	oui (Ca)
	SRP	Al, Fe, Mn et Si	oui (Mg et Si)	Mg	oui (Ca)
	VRT	Al	non	aucun	oui (Ca)

Notes : ND : Non Déterminé

¹ Correspond à une concentration plus élevée d’un élément dans la paroi du nodule ou de la racine par rapport à des tissus plus internes.

² La nature chimique des cristaux observés dans les tissus de racines et de nodules est spécifiée entre parenthèses.

Abréviations des sites d’études : EAS : Easo ; PN1 ; Pandanus 1 ; PN2 ; Pandanus 2 ; PMB ; Poum Malabou ; SRP ; Serpentine ; TIE ; Tiébaghi ; VRT ; Vertisol ; WAN ; Wanaham ; WNK ; Wanek.

Ces observations sont en contradiction avec la littérature scientifique stipulant que les ETM peuvent inhiber la fixation d'azote de la plante (Zahran, 1999 ; Emamverdian *et al.*, 2015). De ce fait, une hypothèse proposée serait qu'*Acacia spirorbis* est capable de gérer les métaux dans ses tissus internes, en utilisant potentiellement un ou plusieurs mécanismes afin de neutraliser la toxicité des ETM au sein des nodules. Pour valider cette hypothèse, une deuxième approche a été effectuée afin de localiser à l'échelle cellulaire (histolocalisation) les ETM dans les tissus des nodules, et de vérifier si cette histolocalisation tissulaire (si elle existe) est spécifique au nodule ou si cette histolocalisation se retrouve aussi dans les tissus racinaires puis dans les racines.

5.3 Deuxième approche : histolocalisation des ETM dans les nodules et racines

5.3.1 Problématique et méthodologie de la deuxième approche

Les premières analyses rapportent que les nodules chez *A. spirorbis* contiennent des ETM lorsqu'ils se sont développés sur des sols calcaires (CA), metallifères (UF) et volcano-sédimentaire (VS) (Tableau 7 et Figure 43). La deuxième approche a pour objectif de localiser les ETM dans les nodules et les racines en utilisant la microscopie électronique à balayage (MEB). Les données obtenues permettront de conclure si la gestion des métaux chez *A. spirorbis* est spécifique au type de tissu. Des nouveaux échantillons de racines et de nodules ont été prélevés sur neuf sites d'étude présentant des sols calcaires (sites Easo, Wanaham et Wanek), des sols ferrallitiques (sites Pandanus 1, Pandanus 2, Tiébaghi) et des sols volcano-sédimentaires (site Poum malabou, Serpent et Vertisol). Les échantillons récoltés ont été lavés à l'EDTA durant 24 h à une concentration de 10 mM, puis rincés 3 fois à l'eau milli-Q. Les nodules ont ensuite été placés dans une étuve à 60°C pendant 48 h. Les échantillons sont ensuite découpés avec un scalpel stérile (environ 500 µm d'épaisseur en moyenne) puis montés à l'aide d'une résine sur un plot en métal individuel pour être analysés par MEB.

Les expérimentations effectuées avec le MEB se basent sur l'envoi d'un faisceau d'électrons sur les échantillons. L'envoi de ce faisceau permet de produire deux types de résultats : (i) l'obtention d'une image de l'échantillon en analysant les électrons éjectés des atomes (électrons secondaires) produits par l'envoi du faisceau d'électrons et (ii) une cartographie des éléments chimiques à l'échelle cellulaire en analysant la réémission des électrons du faisceau après leur rencontre avec les noyaux des atomes (électrons retro-diffusés). La cartographie des éléments chimiques est réalisée sur un transect de tissu pour chaque échantillon avec une histolocalisation et un dosage de seize éléments chimiques: l'aluminium, le baryum, le carbone, le calcium, le cobalt, le chrome, le cuivre, le fer, le potassium, le magnésium, le manganèse, le nickel, l'oxygène, le soufre, le silicium et le zinc. Les résultats obtenus incluent des images de racines et de nodules d'*A. spirorbis* développé sur des sols calcaires, metallifères et volcano-sédimentaires (Figures 44, 45 et 46).

A) Coupe d'une racine sur sol calcaire (site Wanek)

B) Coupe d'un nodule sur sol calcaire (site Easo)

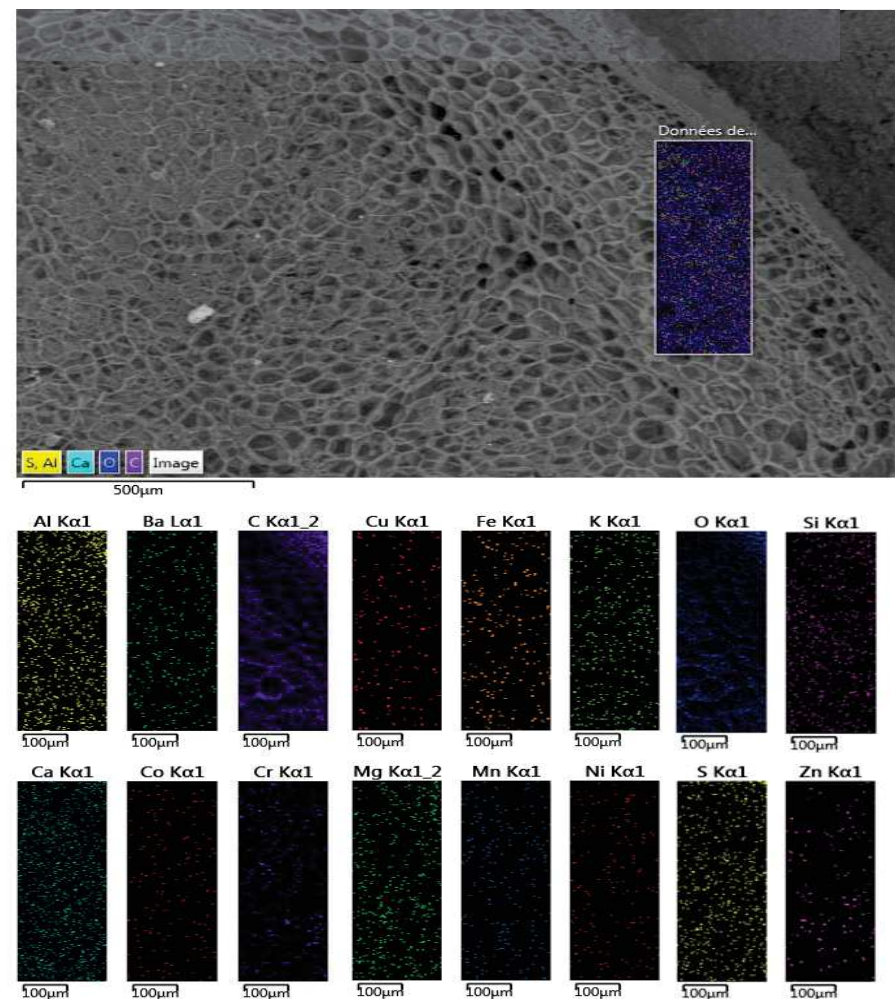
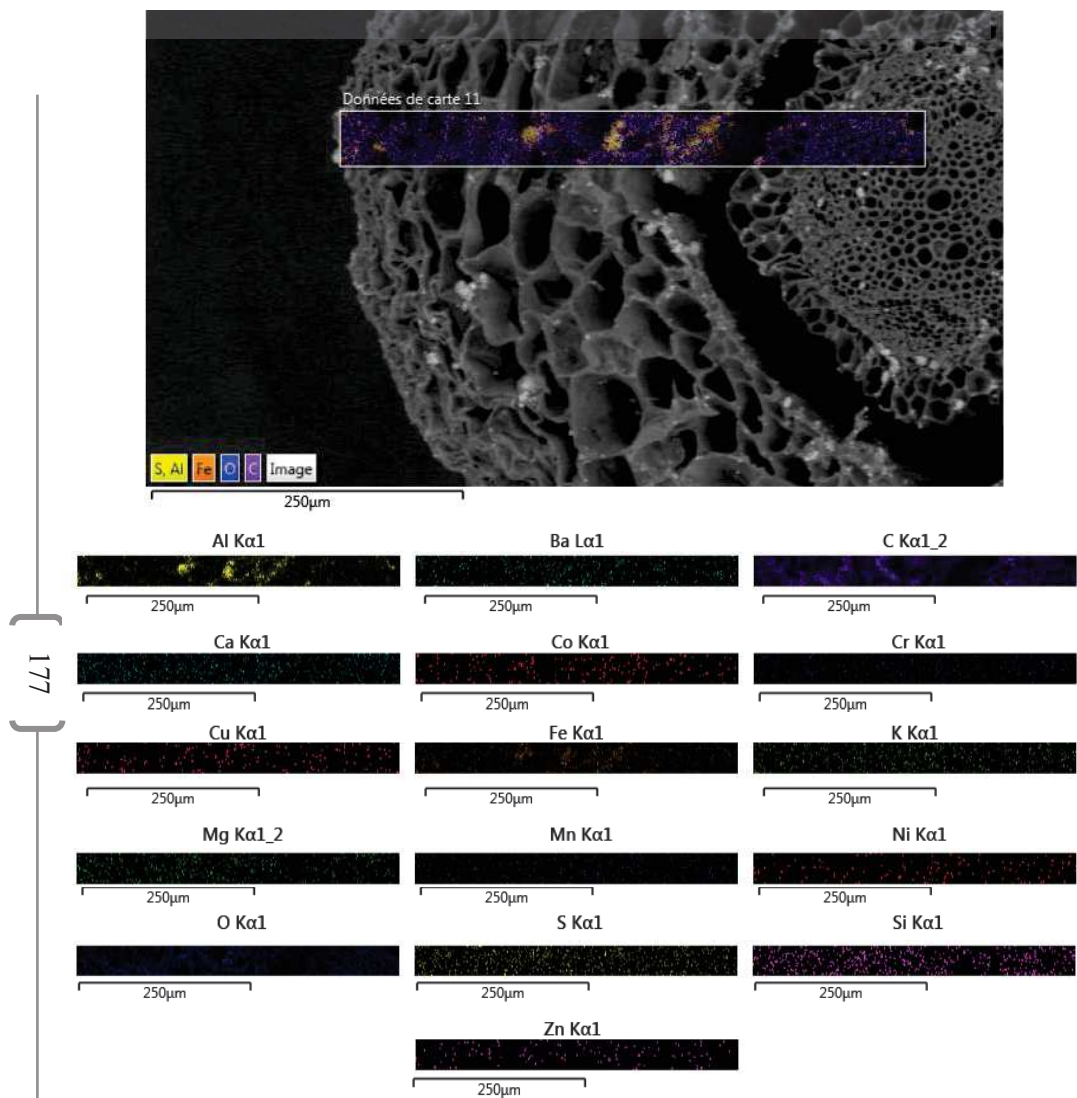


Figure 44 : Images de coupes de nodules et de racines d'*A. spirorbis* sur sols calcaires réalisées par microscopie électronique à balayage (à partir des électrons secondaires) avec histolocalisation des éléments chimiques (à partir des électrons rétro-diffusés). Éléments chimiques extraits : aluminium, baryum, carbone, calcium, cobalt, chrome, cuivre, fer, magnésium, manganèse, nickel, oxygène, potassium, soufre, silicium et zinc. Le panel A présente une coupe de racine d'*A. spirorbis* développé sur sol calcaire, où la fenêtre d'analyse correspond de gauche à droite à un transect allant de la paroi racinaire au centre de la racine. Le panel B correspond à une coupe de nodule d'*A. spirorbis* développé sur sol calcaire, où la fenêtre d'analyse correspond à un transect allant de haut en bas de la paroi du nodule jusqu'à ses tissus internes.

5.3.2 Résultats de la deuxième approche

5.3.2.1 Histolocalisation des ETM dans les racines et nodules

La synthèse des analyses des images prises au MEB (26 images au total) est présentée dans le Tableau 9. Des exemples d'histolocalisation des éléments chimiques dans les nodules et racines développés sur sols calcaires (CA), métallifère (UF) et volcano-sédimentaires (VS) sont présentés en Figures 44, 45 et 46, respectivement.

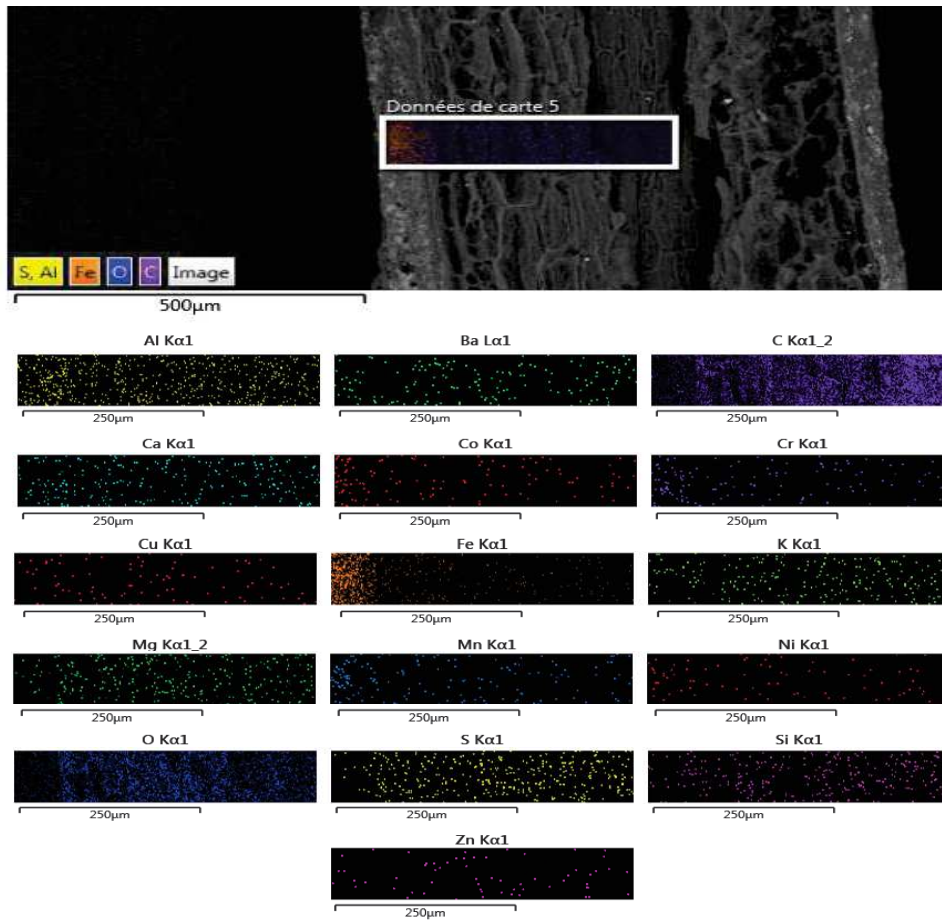
De manière globale, plusieurs ETM sont présents dans les tissus de la plante mais ne sont pas répartis de manière homogène en fonction de leur nature et de leur localisation dans les tissus de la plante. En effet, certains éléments chimiques sont concentrés au niveau des parois cellulaires et diffèrent selon le type de sol d'origine de l'échantillon (Tableau 9).

Sur les sols CA, les analyses des échantillons venant de sols calcaires (sites Wanaham et Wanek) révèlent que l'aluminium et le fer sont concentrés dans la paroi des nodules mais pas dans celle des racines (Tableau 9 ; Figures 44A et 44B). Sur le site Easo, aucun élément n'a été repéré comme étant concentré dans la paroi du nodule (Tableau 9 ; Figure 44B).

Sur les sols UF, les images prises au MEB révèlent que la majorité des atomes de fer sont retrouvés au niveau de la paroi racinaire (Tableau 9 ; Figure 45A) et de la paroi du nodule (Tableau 9 ; Figure 45B). Ces observations sont également valables pour les éléments du cobalt, du chrome et du manganèse (Tableau 9 ; Figures 45A et 45B). En revanche, le nickel est un élément réparti de manière homogène dans les tissus de racines et de nodules (Tableau 9 ; Figures 45A et 45B). Sur les sites Pandanus 2 et Tiébaghi (sols UF), l'aluminium et le fer sont systématiquement retrouvés en forte concentration au niveau de la paroi des racines et des nodules (Tableau 9 et Figure 45B).

Sur les sols VS, les échantillons de nodules et racines sont caractérisés par des concentrations de plusieurs éléments chimiques au niveau des parois cellulaires, avec notamment (i) de l'aluminium, calcium, magnésium, oxygène, soufre et silice dans un nodule venant du site Poum Malabou (Tableau 9 ; Figure 46B), (ii) de l'aluminium, du fer, du manganèse et de la silice pour un nodule provenant du site Serpent (Tableau 9) et (iii) de l'aluminium pour un nodule issu du site Vertisol (Tableau 9). En revanche, les parois des racines venant de ces sites présentent seulement une accumulation de calcium (site Poum Malabou) et de magnésium (site Serpent) (Tableau 9).

A) Coupe d'une racine sur sol ferrallitique (site Pandanus 2)



B) Coupe de nodule sur sol ferrallitique (site Pandanus 1)

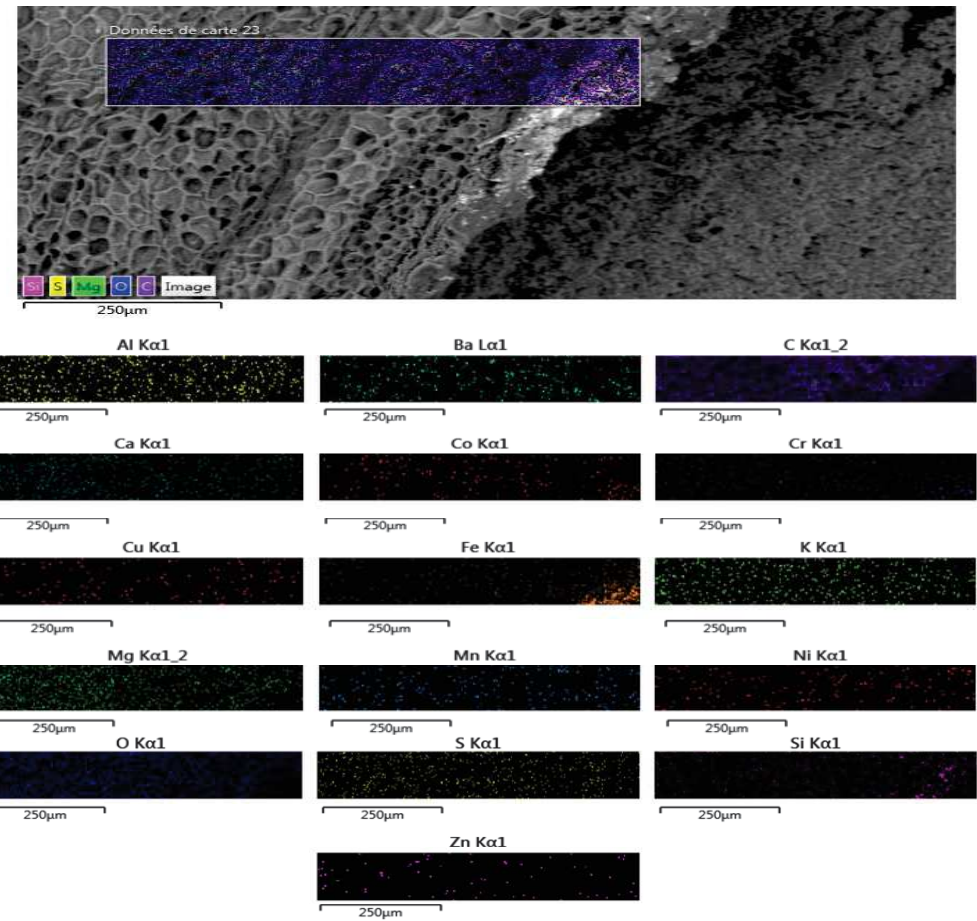


Figure 45 : Images de coupes de nodules et de racines d'*A. spirorbis* sur sols UF réalisées par microscopie électronique à balayage (à partir des électrons secondaires) avec histolocalisation des éléments chimiques (à partir des électrons rétro-diffusés). Éléments chimiques extraits : aluminium, baryum, carbone, calcium, cobalt, chrome, cuivre, fer, magnésium, manganèse, nickel, oxygène, potassium, soufre, silicium et zinc. Le panel A présente une coupe de racine d'*A. spirorbis* développé sur sol métallifère, où la fenêtre d'analyse correspond de gauche à droite à un transect allant de la paroi racinaire au centre de la racine. Le panel B correspond à une coupe de nodule d'*A. spirorbis* développé sur sol métallifère, où la fenêtre d'analyse correspond à un transect allant de gauche à droite des tissus internes du nodule jusqu'à sa paroi.

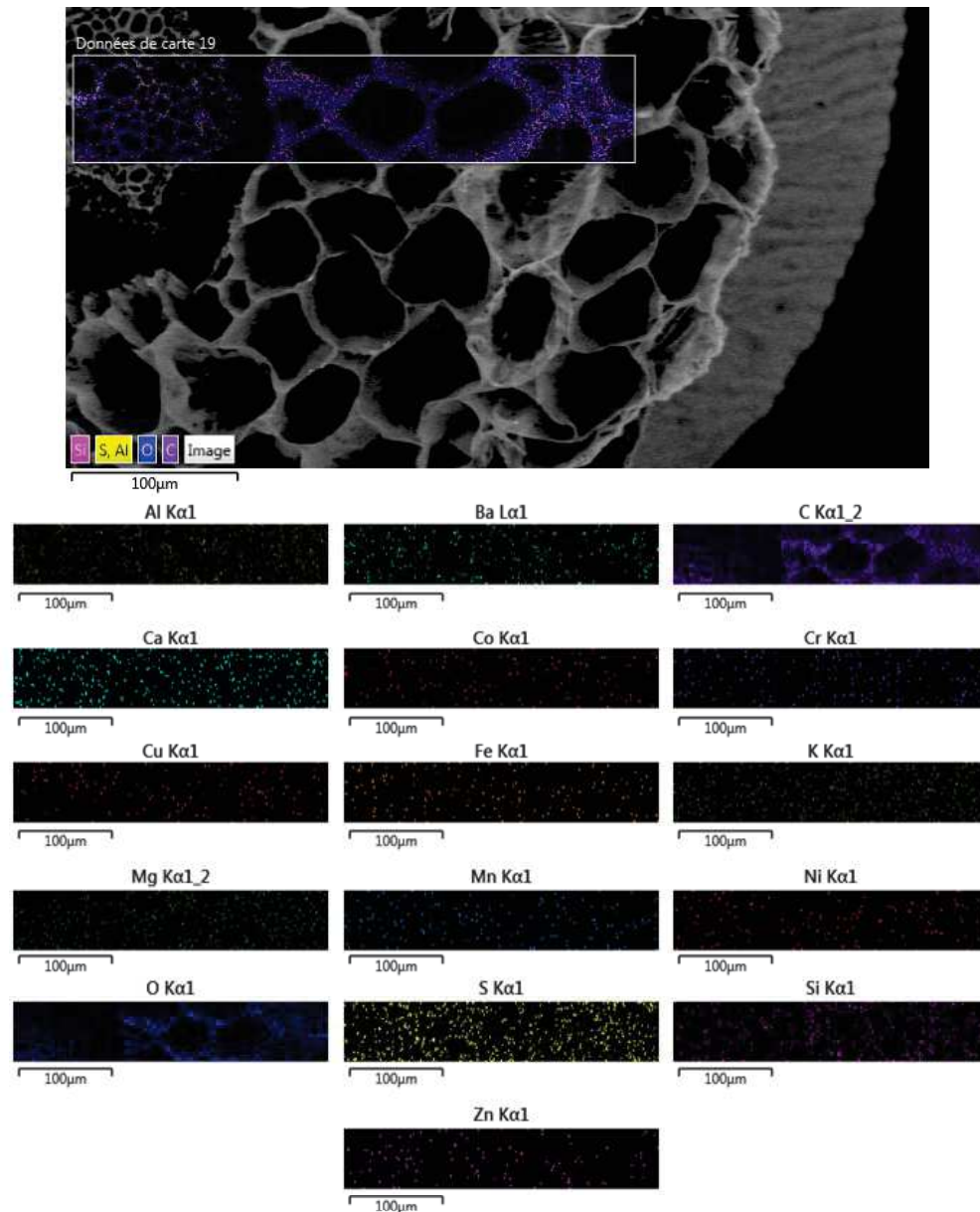
5.3.2.2 Détection de structures minérales dans les tissus végétaux chez *A. spirorbis*

Les analyses des images prises au MEB des tissus de racines et de nodules d'*Acacia spirorbis* ont permis d'observer que certaines cellules végétales contenaient des amas minéraux présentées sous la forme de cristaux (Tableau 9 ; Figures 47A et 47B). Deux exemples d'images de cellules racinaires contenant des cristaux est disponible en Figure 47A et 47B. Ces cristaux sont détectés dans des tissus de nodules et de racines développés dans des sols calcaires (CA), métallifères (UF) et volcano-sédimentaires (VS) (Tableau 9 ; Figures 47A et 47B). Ces cristaux apparaissent sous la forme de polyèdres irréguliers (Figure 47) et leur répartition dans les tissus de la plante est structurée puisque les cellules qui contiennent ces cristaux sont juxtaposées les unes à côté des autres et forment une rangée ordonnée dans le sens longitudinal de la racine en suivant son sens d'élongation (Figure 47). La nature chimique de ces cristaux diffère en fonction des types de sols (Tableau 9). Les analyses MEB des échantillons ont permis d'identifier la nature chimique de ces cristaux, composées essentiellement de calcium (Figure 47 et Tableau 9). Ces amas de calcium ont été retrouvés dans les deux tiers des coupes de racines chez *A. spirorbis* (Tableau 9 ; Figures 48A et 48B). D'autres amas minéraux présentant des natures chimiques différentes ont été observés. En effet, l'analyse d'un nodule venant du site Wanaham et d'une coupe de racine prélevée sur le site Wanek (Figure 47B) révèle la présence d'amas minéraux essentiellement composés d'aluminium (Tableau 9). Des amas composés majoritairement de fer ont été observés dans des racines et nodules provenant du site Tiébaghi (Tableau 9). Pour finir, une analyse MEB des nodules développés sur le site Serpent indique la présence d'amas de magnésium et de silicium (Tableau 9).

5.3.3 Discussion

Le premier résultat majeur des analyses effectuées au MEB indiquent que certains ETM sont concentrés au niveau des parois cellulaires : ceci est observé pour les tissus de nodules comme pour ceux des racines. Les ETM observés au niveau des parois sont l'aluminium, le chrome, le cobalt, le fer, le manganèse et le nickel (Tableau 7 ; Figures 44, 45 et 46). De ce fait, les interprétations des résultats d'analyses issus des dosages ICP-OES réalisés lors de la première approche indiquant que des ETM sont présents dans les nodules ne peuvent pas s'appliquer à l'ensemble des tissus internes des nodules. En effet, on observe que certains ETM sont concentrés dans les parois cellulaires. La plus grande proportion de ces ETM n'est donc pas en contact avec les rhizobia, lesquels sont situés dans les tissus internes du nodule où se déroule le processus de fixation biologique de l'azote. De la même façon, les interprétations des tests corrélations effectués entre les éléments du sol et les nodules (Tableau 6) ne peuvent pas s'appliquer à l'ensemble des tissus internes du nodule. L'hétérogénéité de la répartition des ETM en fonction du type de tissu (concentrés au niveau des parois des nodules et répartis de manière homogène dans les tissus interne des nodules) pourrait s'expliquer par une gestion des ETM.

A) Coupe de racine sur sol volcano-sédimentaire (site Vertisol)



B) Coupe de nodules sur sol volcano-sédimentaire (site Poum alabou)

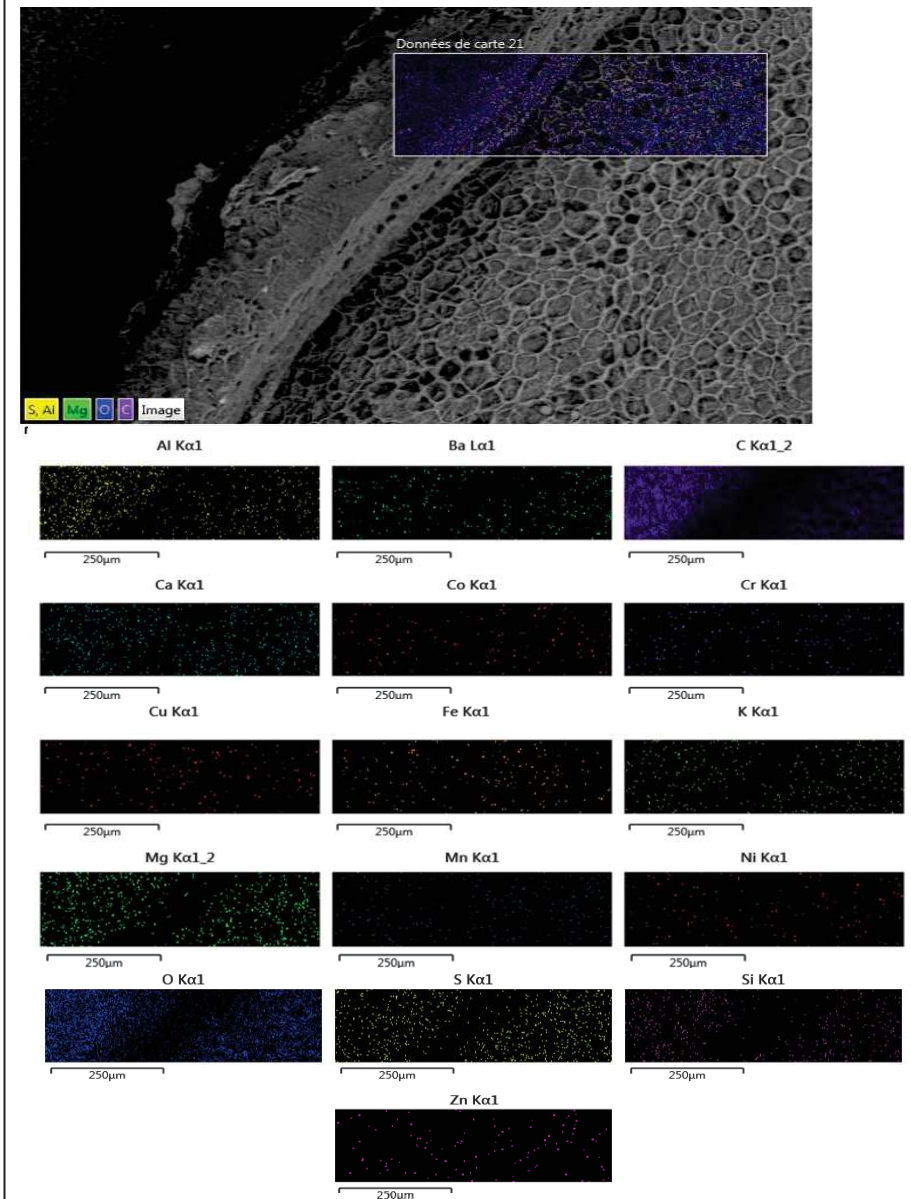


Figure 46 : Images de coupes de nodules et de racines d'*A. spirorbis* sur sols VS réalisées par microscopie électronique à balayage (à partir des électrons secondaires) avec histolocalisation des éléments chimiques (à partir des électrons rétro-diffusés). Éléments chimiques extraits : aluminium, baryum, carbone, calcium, cobalt, chrome, cuivre, fer, magnésium, manganèse, nickel, oxygène, potassium, soufre, silicium et zinc. Le panel A présente une coupe de racine d'*A. spirorbis* développé sur sol volcano-sédimentaire, où la fenêtre d'analyse correspond de gauche à droite à un transect allant du cylindre central de la racinaire au tissu du cortex. Le panel B correspond à une coupe de nodule d'*A. spirorbis* développé sur sol calcaire, où la fenêtre d'analyse correspond à un transect allant de haut en bas de la paroi du nodule jusqu'à ses tissus internes.

Des analyses supplémentaires sont requises pour doser de manière localisée les ETM dans les tissus internes de nodules avec de valider/infirmier leur présence au niveau des rhizobia dans les tussus internes du nodule.

Le second résultat majeur des analyses MEB est la détection de structures cristallines particulières dans les cellules végétales (Figure 44). La nature chimique de ces structures est variable (aluminium, calcium, fer, magnésium ou silicium). En s'appuyant sur les images prises au MEB, ces structures peuvent être classées selon deux catégories : une catégorie avec des cristaux composés de calcium et localisés à l'intérieur de cellules racinaires et une deuxième catégorie avec des amas de minéraux constitués d'aluminium, de fer, de magnésium et de silicium pouvant correspondre à des particules de sol incluses dans les parois cellulaires des nodules et racines. Ces particules de sol sont potentiellement responsables des fortes concentrations en ETM détectées dans les parois des cellules (Tableau 9 ; Figure 44A). La nature chimique de ces particules correspond au type de sol où a été prélevé le tissu, avec (i) des particules d'aluminium dans une coupe de tissu provenant de deux sites calcaires (site Wanaham et Wanek), (ii) des particules de fer sur une coupe de site métallifère (site Tiébaghi) et (iii), des particules de silicium sur une coupe de sols volcano-sédimentaires (site Serpent) (Tableau 9). Les ETM intègrent donc les tissus de la paroi des nodules, indiquant une potentielle gestion des métaux par la plante.

Afin de pallier à l'hétérogénéité de la localisation des ETM dû à la présence de particules de sols dans les tissus internes du nodule, une troisième approche a été mise en place en couplant une technique d'ICP avec une ablation laser (ICP-AL). Cette technique permet de doser les éléments chimiques à l'échelle et donc, d'obtenir des teneurs en ETM dans les tissus internes des nodules.

5.4 Troisième approche : quantification des ETM dans les tissus internes et la paroi des nodules

5.4.1 Problématique et méthodologie

Les résultats de la deuxième approche ont mis en évidence que certains ETM étaient principalement localisés dans les parois cellulaires des nodules sous la forme de particules de sol (Tableau 9 ; Figures 45). Ces résultats remettent en question les interprétations tirées des analyses de la première approche, indiquant que des ETM dosés par ICP-OES étaient présent dans l'ensemble des nodules et par extension, dans les tissus internes des nodules. D'une part, les rhizobia sont localisés dans les tissus internes des nodules et d'autre part, les particules de sol se situent au niveau des parois. Les teneurs en ETM évalués par IC-OES sur l'ensemble des nodules ne reflètent donc potentiellement pas les teneurs auxquelles sont exposées directement les rhizobia dans les tissus internes.

Il faut donc quantifier de manière précise les éléments chimiques à l'intérieur des nodules pour savoir si les ETM sont localisés au niveau des rhizobia pouvant fixer biologiquement l'azote

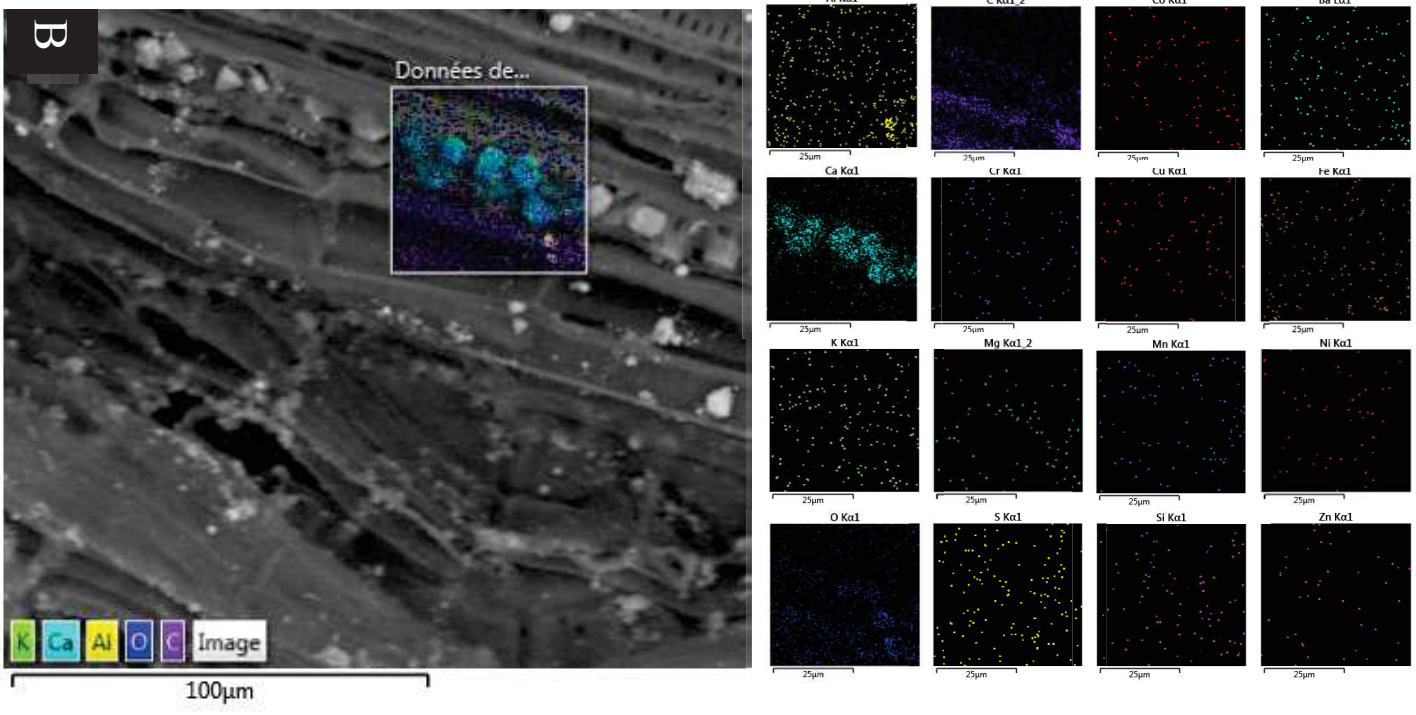
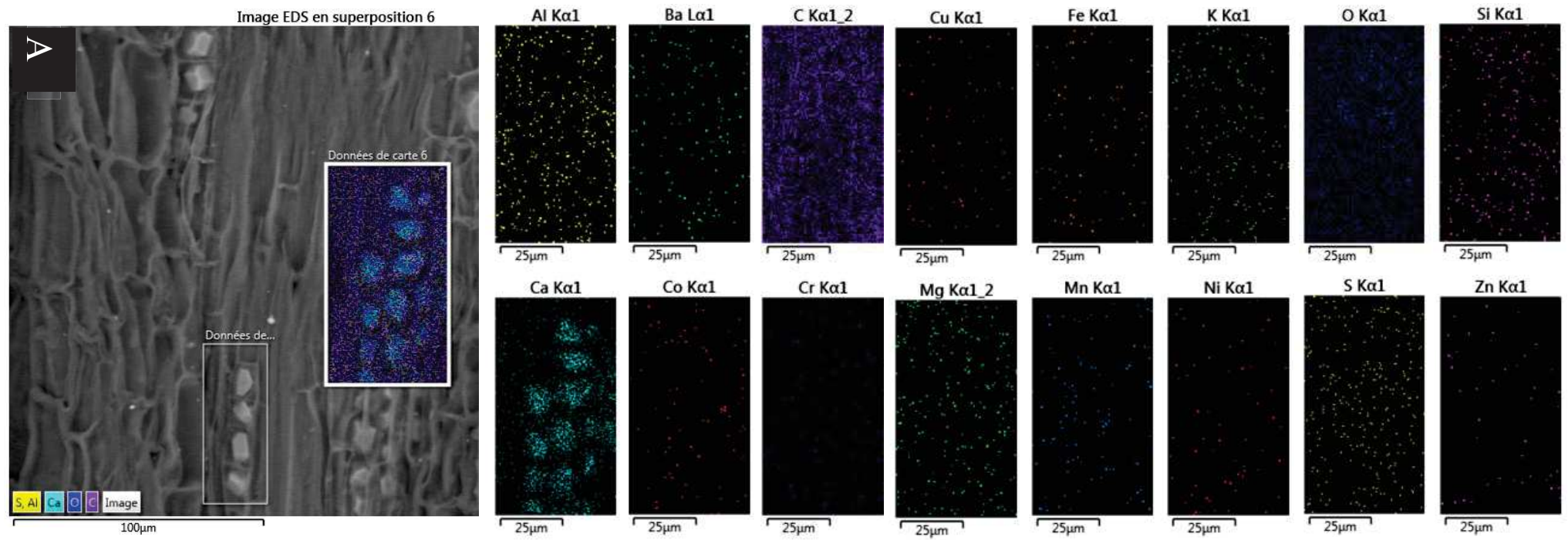


Figure 47 : Images de coupes de racines d'*A. spirorbis* réalisées par microscopie électronique à balayage avec une localisation des éléments chimiques incluant : aluminium, baryum, carbone, calcium, cobalt, chrome, cuivre, fer, magnésium, manganèse, nickel, oxygène, potassium, soufre, silicium et zinc. Les panels A et B présentent des coupes de racines d'*A. spirorbis* développées respectivement sur des sols métallifères (Pandanus 2) et calcaires (site de Wanek). La fenêtre d'analyse inclut des cristaux contenus dans les cellules racinaires.

atmosphérique. La technique correspondante à ce type d'analyse est une ICP couplée à une ablation laser (ICP-AL). Par rapport au MEB, l'ICP-AL permet (i) de quantifier plus précisément les éléments chimiques (seuil de détection de l'ordre de 10 mg.kg⁻¹ pour le MEB et de l'ordre de 0,001 mg.kg⁻¹ pour l'ICP-AL), (ii) de cibler des zones intra-cellulaires et (iii) d'effectuer des répétitions lors du passage d'un seul et même échantillon. Les échantillons analysés par ICP-AL sont des nodules provenant des mêmes sites d'étude que la première approche, répartis selon trois catégories de sol : calcaire, métallifère et volcano-sédimentaire (Tableau 6 ; Figure 42). Les dosages ICP-AL effectués sont classés selon deux localisations dans les tissus du nodule : les tissus internes (Tableau 10) et la paroi (Tableau 11). Ces deux types de résultats sont exprimés en unité relative à l'appareil et une calibration complète est nécessaire afin de convertir ces valeurs en concentration d'éléments (mg.kg⁻¹).

Les analyses des résultats de cette troisième approche obtenus par ICP-AL sont présentées dans deux parties distinctes. Dans un premier temps, les dosages obtenus par ICP-AL des tissus internes (Tableau 10) et des parois (Tableau 11) des nodules sont comparés aux dosages obtenus par ICP-OES (Tableau 7). Les comparaisons effectuées correspondent à des analyses statistiques de la corrélation entre les teneurs en éléments de l'ensemble des nodules évaluées par ICP-OES, par rapport aux teneurs en éléments des tissus internes (Tableau 12) et de la paroi des nodules (Tableau 13) évaluées par ICP-AL. Le test statistique utilisé est un test non-paramétrique de rang de Spearman, où la significativité de la corrélation est symbolisée par : NS : $P > 0,05$; * : $P < 0,05$; ** : $P < 0,01$ et *** : $P < 0,001$. Les coefficients de corrélation ρ sont également indiqués lorsque les teneurs en éléments sont statistiquement corrélées ($P < 0,05$) (Tableau 12 et 13). Cette analyse permet d'étudier un lien potentiel entre les mesures effectuées par ICP-OES et les mesures effectuées par ICP-AL, afin de valider/infirmer l'hypothèse émise dans la deuxième approche, où les analyses d'histolocalisation des éléments chimiques dans les nodules ont révélé une hétérogénéité de leur répartition entre les tissus internes et les parois du nodule.

Dans un deuxième temps, les éléments chimiques dosés par ICP-AL dans les nodules sont visualisées sous la forme de deux analyses en composantes principales (ACP) : (i) en fonction de leur localisation dans le nodule (paroi ou tissu interne ; Figure 48A et 48B) et (ii) en fonction du type de sol (calcaire, métallifère ou volcano-sédimentaire) afin de détecter si les tissus internes des nodules présentent des signatures caractéristiques au type de sol d'origine de leur prélèvement (Tableau 14 et Figure 49). Les comparaisons des teneurs en éléments des tissus internes du nodule par rapport au type de sol sont présentées dans le Tableau 14. Les moyennes de chaque élément sont comparées en fonction du type de sol (calcaire, métallifère ou volcano-sédimentaire) en utilisant d'abord un test non paramétrique de Kruskal-Wallis (Tableau 14). Si le résultat de ce test de Kruskal-Wallis est significatif ($P < 0,05$), les moyennes des éléments chimiques sont ensuite comparées les unes par rapport aux autres en utilisant un test de comparaison multiple de moyenne de Wilcoxon-Mann et Whitney. Lorsque des différences significatives entre des moyennes sont détectées, elles sont symbolisées avec

Tableau 10 : Dosages par ICP-AL¹ des éléments majeurs et ETM contenus dans les tissus internes de nodules d'*A. spirorbis* provenant de neuf sites d'études présentant des types de sols contrastés : sols calcaires, métallifères et volcano-sédimentaires. Les valeurs présentées sont des moyennes exprimées en unité relatives (u.r) au système de mesure propre à la machine de mesure.

Localisation cellulaire	Type de sol	Site	Elément majeur				Elément trace métallique					
			Ca	Mg	K	P	Al	Co	Cr	Fe	Mn	Ni
Tissus internes du nodule	Calcaire	WNK	4200	71977	36102	2310	1831	175	3515	942	542	86
		WAN	8209	44614	70702	2189	42956	317	7008	3889	4463	85
	Métallifère	PIN	12162	73677	85429	3934	96165	1214	6924	6362	49419	229
		PN1	2649	34107	52172	2538	891	455	2986	936	919	1573
		PN2	5577	119816	64455	4341	887	1121	3045	413	7121	4066
	Volcano-sédimentaire	TIE	3157	124508	144567	1598	802	1039	2900	462	22817	1937
		PMB	4317	127832	148108	3416	34605	211	3539	2832	2306	164
		SRP	3690	119763	92424	2291	1000	186	3018	409	600	99
		VRT	6325	23851	97672	1832	1587	199	2899	711	2640	53

Notes : ¹ ICP-AL : Technique analytique à plasma induit couplé à une ablation laser.

Abréviations : PIN : Pindaï ; PN1 : Pandanus 1 ; PN2 : Pandanus 2 ; PMB : Poum Malabou ; TIE : Tiébaghi ; SRP : Serpent ; VRT : Vertisol ; WAN : Wanaham ; WNK : Wanek

Tableau 11 : Dosages par ICP-AL¹ des éléments majeurs et ETM contenus dans les tissus des parois de nodules d'*A. spirorbis* provenant de neuf sites d'études présentant des types de sols contrastés : sols calcaires, métallifères et volcano-sédimentaires. Les valeurs présentées sont des moyennes exprimées en unité relatives (u.r) au système de mesure propre à la machine de mesure.

Localisation cellulaire	Type de sol	Site	Eléments majeurs				Eléments traces métalliques					
			Ca	Mg	K	P	Al	Co	Cr	Fe	Mn	Ni
Tissus de la paroi du nodule	Calcaire	WNK	5798	78931	52105	3098	104838	259	4923	11250	2333	90
		WAN	6731	61432	76819	1655	87457	251	7137	4760	3142	379
	Métallifère	PIN	14977	101876	148803	6094	335836	2409	9112	22007	76251	709
		PN1	10705	30244	78367	3666	5023	1133	6500	7269	9094	5006
		PN2	5768	43635	49130	1481	2234	1747	15238	9174	11602	4597
	Volcano-sédimentaire	TIE	3679	43841	198124	1221	3627	4182	8179	2601	12589	1871
		PMB	4273	93371	225415	3763	23855	200	10809	1891	4581	153
		SRP	10876	62310	146369	2359	5083	208	3669	1334	1102	719
		VRT	12100	29378	109811	1843	22191	199	7235	652	1418	192

Notes : ¹ ICP-AL : Technique analytique à plasma induit couplé à une ablation laser.

Abréviations : PIN : Pindaï ; PN1 : Pandanus 1 ; PN2 : Pandanus 2 ; PMB : Poum Malabou ; TIE : Tiébaghi ; SRP : Serpent ; VRT : Vertisol ; WAN : Wanaham ; WNK : Wanek

Tableau 12 : Résultats des tests de corrélations non-paramétriques de Spearman entre les teneurs en éléments des nodules dosés par ICP-OES¹ et les éléments des tissus internes des nodules évalués par ICP-AL².

	Ca	K	Mg	P	Al	Co	Cr	Fe	Mn	Ni
Significativité de la corrélation	NS	*	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	*
Valeur de rho	NS	0,82	NS	NS	NS	0,85	NS	NS	NS	0,78

Notes : Significativité des tests de corrélations : NS : P > 0,05 ; * : P < 0,05 ; ** : P < 0,01 ; *** : P < 0,001

¹ICP-OES : Technique analytique à plasma induit couplée à spectrométrie à émission optique

²ICP-AL : Technique analytique à plasma induit couplée à une ablation laser

Tableau 13 : Résultats des tests de corrélations non-paramétriques de Spearman entre les teneurs en éléments des nodules dosés par ICP-OES¹ et les éléments des parois des nodules évalués par ICP-AL².

	Ca	K	Mg	P	Al	Co	Cr	Fe	Mn	Ni
Significativité de la corrélation	NS	**	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	*
Valeur de rho	NS	0,85	NS	NS	NS	0,83	NS	NS	NS	0,78

Notes : Significativité des tests de corrélations : NS : P > 0,05 ; * : P < 0,05 ; ** : P < 0,01 ; *** : P < 0,001

¹ICP-OES : Technique analytique à plasma induit couplée à spectrométrie à émission optique

²ICP-AL : Technique analytique à plasma induit couplée à une ablation laser

les lettres « a » et « b » correspondant à des niveaux de moyennes significativement différents. Le niveau « ab » est un niveau intermédiaire signifiant que la moyenne n'est statistiquement différente ni du niveau « a », ni du niveau « b » (Tableau 14).

5.4.2 Résultats de la troisième approche

5.4.2.1 Comparaison des dosages ICP-OES avec les dosages ICP-AL

La comparaison entre les données obtenues par ICP-OES (Tableau 7) et les données ICP-AL (Tableau 10 et 11) montrent que les dosages de certains ETM tels que le cobalt et le nickel sont positivement corrélés entre les dosages obtenus par ICP-OES et ceux obtenus par ICP-AL (Tableau 12 et 13). En effet, le cobalt dosé par ICP-OES est significativement corrélé (i) aux dosages obtenus par ICP-AL des tissus internes ($P < 0,01$ et $r = 0,85$; Tableau 12) et (ii) aux dosages obtenus par ICP-AL de la paroi du nodule ($P < 0,01$ et $r = 0,83$; Tableau 13). Concernant le nickel, les dosages effectués par ICP-OES sont significativement corrélés (i) aux dosages obtenus par ICP-AL des tissus internes ($P < 0,05$ et $r = 0,78$; Tableau 12) et (ii) aux dosages obtenus par ICP-AL de la paroi du nodule ($P < 0,05$ et $r = 0,78$; Tableau 13).

L'analyse des données montre que sept éléments chimiques sur un total de dix (l'aluminium, le calcium, le magnésium, le manganèse, le phosphore, le chrome et le fer) ne présentent pas de corrélations significatives entre les approches ICP-OES et ICP-AL (Tableau 12 et 13).

5.4.2.2 Caractérisation de la signature chimique des nodules chez *A. spirorbis* par ICP-AL

Les éléments chimiques des nodules obtenues par ICP-AL sont présentées sous la forme de deux analyses en composantes principales (Figure 48 et 49). L'ACP présentée en Figure 48 inclut un cercle de corrélation des éléments chimiques (Figure 48A) et une visualisation des données en fonction du type de tissus analysé : la paroi du nodule (en bleu) et les tissus internes (en rouge) (Figure 48B). Ces deux groupes se séparent selon un axe horizontal (Composante 1 représentant 37 % de la variation totale des données : Figure 48). Sur le cercle de corrélation (Figure 48A), cette séparation est principalement représentée par plusieurs éléments chimiques : aluminium, cuivre, fer, scandium, titane et zinc. De manière remarquable, les parois présentent des valeurs plus élevées pour ces six éléments par rapport aux tissus internes du nodule (Tableau 10 et 11). Afin d'avoir une signature en élément chimique uniquement basée sur les tissus internes des nodules la plante, une ACP additionnelle a été effectuée en retirant les données de la paroi des nodules (Figure 49).

Le résultat majeur ressortant de cette analyse est que les signatures en éléments chimiques des échantillons provenant de sols métallifères (UF) se détachent des signatures échantillons provenant de

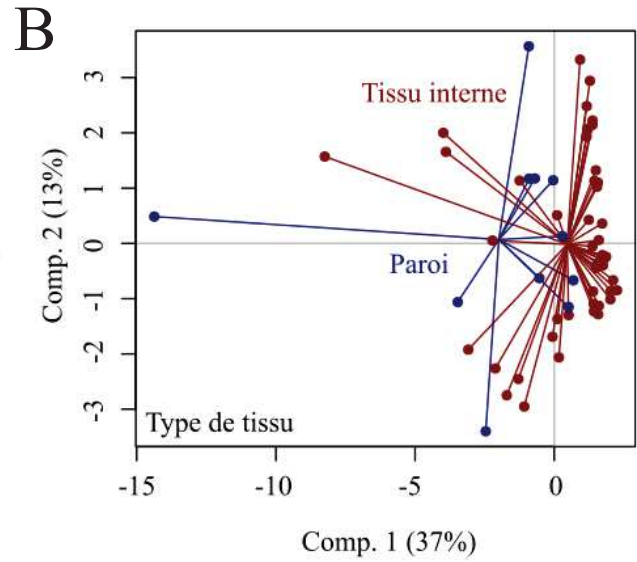
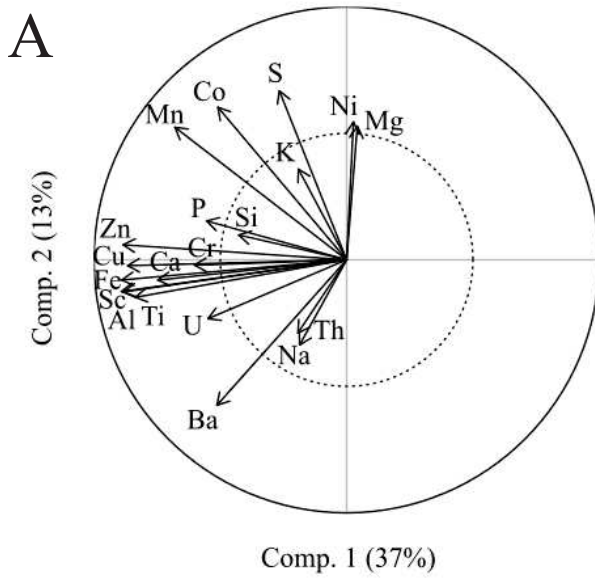


Figure 48 : Analyse en composante principale des données obtenues par ICP-AL en fonction du type de tissu. Le panel A présente le cercle de corrélation des 20 éléments chimiques inclus dans l'analyse. Le panel B représente la distribution des échantillons en fonction de leurs teneurs en éléments chimiques en fonction du type de tissus analysé (tissu interne ou paroi du nodule).

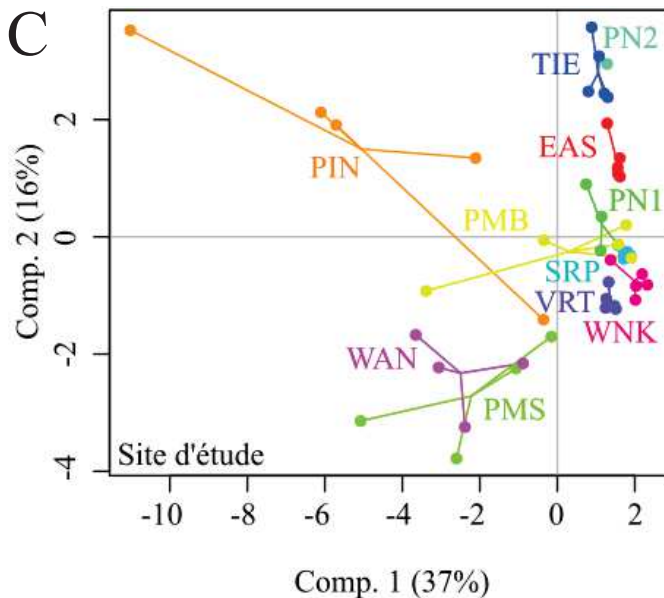
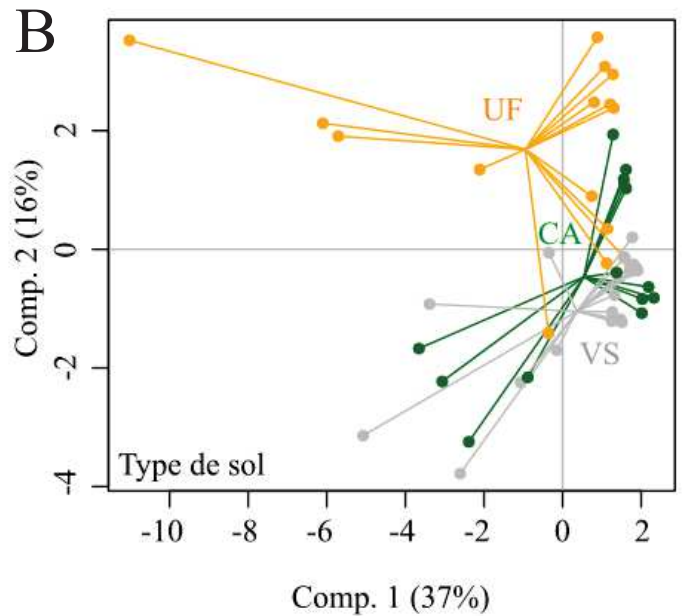
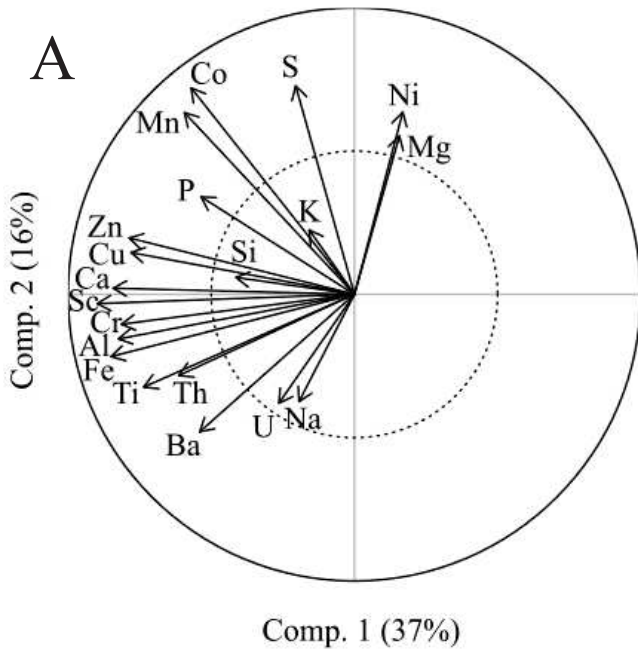


Figure 49 : Analyse en composante principale de la signature en élément chimique des tissus internes des nodules d'*Acacia spirorbis* en fonction des types de sols obtenus par ICP-AL. Le panel A présente le cercle de corrélation des éléments chimiques. Les panels B et C représentent respectivement la distribution des échantillons en fonction du type de sol et du site d'étude.

Abréviations des types de sol : CA : sols calcaires ; UF : sols métallifères ; VS : sols volcano-sédimentaires.

Abréviations des sites d'études : EAS : Easo ; PNI : Pandanus 1 ; PN2 : Pandanus 2 ; PIN : Pindaï ; PMB : Poum Malabou ; PMS : Poum Silice ; SRP : Serpent ; TIE : Tiébaghi ; VRT : Vertisol ; WAN : Wanaham ; WNK : Wanek

sols calcaires (CA) et volcano-sédimentaires (VS) (Figure 49B) Cette séparation se fait verticalement en fonction de l'axe 2 de l'ACP, principalement représenté par le cobalt, le manganèse, le soufre, le nickel et le magnésium (Figure 49A). Ces résultats sont confirmés par des analyses statistiques où les moyennes des éléments chimiques (exprimées en unité relative : u.r) sont comparées les unes par rapport aux autres en fonction du type de sol (Tableau 14). En effet, les moyennes de quatre ETM : le cobalt, le cuivre, le manganèse et le nickel, dans les tissus internes des nodules chez *A. spirorbis*, sont significativement plus élevées dans des nodules prélevés sur des sols UF (947 ± 503 ; 926 ± 438 ; 24798 ± 21596 ; 1413 ± 1078 u.r, respectivement) par rapport à des nodules prélevés sur des sols CA (274 ± 103 ; 521 ± 587 ; 8064 ± 8146 ; 247 ± 225 u.r, respectivement) et VS (219 ± 44 ; 370 ± 146 ; 2140 ± 1130 ; 99 ± 52 , respectivement) (Tableau 14). De plus, le zinc présente des valeurs significativement ($P < 0,05$) plus élevées dans des nodules provenant de sols UF (799 ± 1733 u.r) comparé à des nodules prélevés sur sols CA (280 ± 551 u.r) (Tableau 14).

Les tissus internes des nodules présentent également d'autres éléments caractéristiques en fonction du type de sol où ont été effectués les prélèvements. En effet, le potassium est significativement ($P < 0,05$) plus concentré dans les tissus internes de nodules prélevés sur sols UF et VS ($94\ 875 \pm 39784$ et $11\ 1626 \pm 30\ 493$ u.r, respectivement) par rapport à des nodules prélevés sur un sol CA ($57\ 786 \pm 17\ 631$ u.r) (Tableau 14). De plus, le sodium est significativement ($P < 0,01$) plus concentré dans les tissus internes de nodules prélevés sur sols UF et VS ($241\ 427 \pm 201\ 776$ et $217\ 817 \pm 44\ 284$ u.r, respectivement) par rapport à des nodules prélevés sur un sol CA ($199\ 122 \pm 191\ 940$ et u.r) (Tableau 14).

5.4.3 Discussion

Dans un premier temps, les résultats de la comparaison entre les données obtenues par ICP-OES (Tableau 7) par rapport aux données obtenues par ICP-AL (Tableaux 10 et 11) diffèrent en fonction du type d'approche et de l'élément chimique considéré (Tableaux 12 et 13). En effet, certains éléments (le cobalt, le nickel et le potassium) présentent des teneurs significativement corrélées entre les deux techniques, indiquant que la localisation de ces éléments dans ces nodules, au niveau des tissus internes ou de leur paroi, présente une information similaire à celle des teneurs évaluées par ICP-OES au niveau des nodules entiers (Tableaux 12 et 13). En revanche, l'analyse des données montre que sept éléments chimiques sur un total de dix (l'aluminium, le calcium, le magnésium, le manganèse, le phosphore, le chrome et le fer) ne présentent pas de corrélations significatives entre les approches ICP-OES et ICP-AL (Tableau 12 et 13). De ce fait, si les teneurs en éléments des parois et tissus internes des nodules (évalués par ICP-AL : Tableaux 10 et 11) ne corrélaient pas avec les teneurs en éléments des nodules entiers (évalués par ICP-OES ; Tableau 7), cela pourrait correspondre à une hétérogénéité de la localisation de ces éléments dans les tissus du nodule (Figure 48), révélant une potentielle gestion de ces éléments en fonction du type de tissus considéré. Il faut donc prendre en

Tableau 14 : Signatures des éléments chimiques dans les tissus internes du nodule en fonction des types de sol. Les résultats présentés sont des moyennes \pm écart-type obtenues par ICP-AL¹. Les valeurs sont exprimées en unité relative (u.r) à l'appareil de mesure correspondant au nombre de fois où l'appareil a détecté l'élément.

Type de sol	Al	Ba	Ca	Co	Cr
Calcaire	13318 \pm 20704	7612 \pm 9380	4887 \pm 2305	274 \pm 103 b	4268 \pm 2368
Métallifère	32619 \pm 51272	3035 \pm 3557	6184 \pm 5713	947 \pm 503 a	4274 \pm 2702
Volcano-sédimentaire	32018 \pm 67230	5521 \pm 3476	5209 \pm 1496	219 \pm 44 b	3577 \pm 1103

(continuation)

Type de sol	Cu	Fe	K	Mg	Mn
Calcaire	521 \pm 587 b	1615 \pm 1755	57786 \pm 17631 b	74676 \pm 24525	8064 \pm 8146 b
Métallifère	926 \pm 438 a	2552 \pm 3017	94875 \pm 39783 a	83145 \pm 40313	24798 \pm 21596 a
Volcano-sédimentaire	370 \pm 146 b	2529 \pm 3628	111626 \pm 30493 a	78806 \pm 46951	2140 \pm 1130 b

(continuation)

Type de sol	Na	Ni	P	S	Sc
Calcaire	199122 \pm 191940 b	247 \pm 225 b	2379 \pm 818	67925 \pm 5004 ab	353 \pm 96
Métallifère	241427 \pm 201776 a	1413 \pm 1078 a	2810 \pm 2230	70877 \pm 2865 a	379 \pm 137
Volcano-sédimentaire	217817 \pm 44284 a	99 \pm 52 b	2367 \pm 793	64319 \pm 1369 b	350 \pm 83

(continuation)

Type de sol	Si	Th	Ti	U	Zn
Calcaire	4914 \pm 366 b	25 \pm 24	502 \pm 724	34 \pm 45	280 \pm 551 b
Métallifère	5632 \pm 1226 a	36 \pm 25	702 \pm 919	25 \pm 28	799 \pm 1733 a
Volcano-sédimentaire	5557 \pm 1132 ab	32 \pm 46	1147 \pm 1700	112 \pm 335	173 \pm 386 ab

Notes : Des tests de comparaisons de moyennes multiples de Wilcoxon-Mann et Whitney ont été effectués pour comparer les moyennes de chacun des éléments chimiques en fonction du type de sol. Lorsque des différences significatives sont détectées, elles sont symbolisées avec les lettres « a » et « b » correspondant à des niveaux significativement différents. Le niveau « ab » est un niveau intermédiaire signifiant que la moyenne n'est statistiquement différente ni du niveau « a », ni du niveau « b ».

¹ICP-AL : Technique analytique à plasma induit couplée à une ablation laser.

compte à la fois les données des tissus internes et celles des parois des nodules lors de cette étude de gestion des métaux dans les nodules d'*A. spirorbis*.

Les données de l'histolocalisation des ETM dans les nodules (effectuées par microscopie électronique à balayage : MEB) indiquaient que des particules de sol et/ou cristaux étaient présents au niveau de la paroi des nodules (Tableau 7 ; Figures 44, 45 et 46), pouvant potentiellement influencer le dosage des éléments dans les nodules si l'on ne prend pas en compte le type de tissu. Néanmoins, l'analyse des données obtenues par ICP-AL révèlent un résultat indiquant que les tissus internes des nodules présentent une signature spécifique en fonction du type de sol (Tableau 10 et Figure 49). En effet, les nodules développés dans des sols métallifères présentent des teneurs en ETM significativement plus élevées de quatre éléments traces métalliques (cobalt, cuivre, nickel et manganèse) par rapport aux sols calcaires ou volcano-sédimentaires (Tableau 14). Ces résultats démontrent l'existence d'un transfert des ETM, notamment du cobalt, du nickel et du manganèse entre le compartiment du sol et les tissus internes des nodules. De ce fait, une quatrième approche a été réalisée afin de mieux comprendre la gestion des métaux chez *A. spirorbis* en étudiant le transfert potentiel des éléments entre le compartiment du sol, les parois et tissus internes des nodules et les racines de la plante.

5.5 Quatrième approche : le flux des ETM entre le sol, les racines, les parois et les tissus interne des nodules.

5.5.1 Problématique et méthodologie

Les analyses ICP-AL ont permis d'obtenir les teneurs en éléments dans les tissus internes et la paroi des nodules. Les résultats de la troisième approche mettent en évidence que (i) la signature chimique des nodules variait en fonction du type de tissus analysé (parois ou tissus internes) (Figure 48) et (ii) les tissus internes des nodules présentaient une signature en ETM (cobalt, cuivre, manganèse, nickel et zinc) spécifique au type de sol (Figure 49). Un transfert potentiel des ETM existerait donc entre les éléments du sol et les nodules. De ce fait, la dernière approche cherche à confirmer qu'il y a bien potentiellement un transfert des métaux chez *A. spirorbis* du sol vers la plante. Pour ce faire, nous allons comparer statistiquement les teneurs en éléments dans les sols par rapport aux éléments dans les racines de la plante, dans les parois et dans les tissus internes des nodules. Ces analyses permettront de mettre en évidence/réfuter l'existence de transferts d'éléments entre les différents comaprtiments du sol et la plante.

Les éléments du sol ont été évalués selon la méthode suivie par Vincent *et al.*, 2018 et les valeurs sont exprimées en mg.kg^{-1} (Tableau 6). Les éléments des racines ont été évalués par MEB lors de la deuxième approche et sont exprimées en concentration apparente. La conversion de ces valeurs en mg.kg^{-1} est toujours en attente lors de la rédaction de ce manuscrit, principalement à cause d'une

Tableau 15 : Dosages des éléments chimiques dans les racines d'*A. spirorbis*. Les éléments des racines ont été évalués par MEB et sont exprimés en concentration apparente dont l'unité exacte reste à définir.

Type de sol	Site	Ca	Mg	K	Co	Cr	Fe	Mn	Ni	Al	Si
Calcaire	WNK	0,26	0,11	0,10	0,04	0,06	2,13	0,05	< 0,01	2,90	0,07
	PN1	0,66	< 0,01	0,02	< 0,01	< 0,01	0,02	< 0,01	0,20	0,30	< 0,01
Métallifère	PN2	0,10	0,20	0,10	0,10	< 0,01	4,3	0,3	< 0,01	0,80	0,20
	TIE	0,44	0,11	0,36	< 0,01	< 0,01	0,45	0,57	0,11	0,27	0,01
Volcano-sédimentaire	PMB	0,04	0,07	< 0,01	< 0,01	0,05	0,12	< 0,01	0,14	0,66	< 0,01
	SRP	2,02	0,19	0,12	0,25	0,04	< 0,01	0,10	0,18	0,48	< 0,01
	VRT	1,44	< 0,01	0,17	< 0,01	0,04	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,26	0,10

Note : Plusieurs teneurs sont en dessous du seuil de détection du MEB (< 0,01 en concentration apparente).

Tableau 16 : Résultats des tests non paramétriques de corrélation de Spearman¹ sur les éléments chimiques en fonction de quatre compartiments : le sol, les parois des nodules, les tissus internes des nodules et les racines d'*A. spirorbis*.

	Compartiments comparés ²	Ca	Mg	K	P	Si	Al	Co	Cr	Fe	Mn	Ni
		Résultats des tests de corrélation non paramétriques de Spearman ¹	sol - paroi nodule	NS	NS	NS	NS	NS	NS	** r = 0,82	NS	NS
	paroi nodule - tissus internes nodule	NS	NS	** r = 0,85	NS	NS	*** r = 0,93	* r = 0,73	NS	NS	* r = 0,77	* r = 0,73
	sol - racine	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	tissu interne nodule - racine	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Notes : ¹ Les résultats des tests non paramétriques de corrélation de Spearman sont présentés avec la significativité du test (symbolisée par : NS : P > 0,05 ; * : P < 0,05 ; ** : P < 0,01 et *** : P < 0,001) et le coefficient de corrélation *rho*, abrégé « r ».

² Les analyses statistiques ont été effectuées sur les données obtenues par ICP-MS (Tableau 6), MEB (Tableau 15) et ICP-AL (Tableaux 10 et 11), tout type de sol confondu.

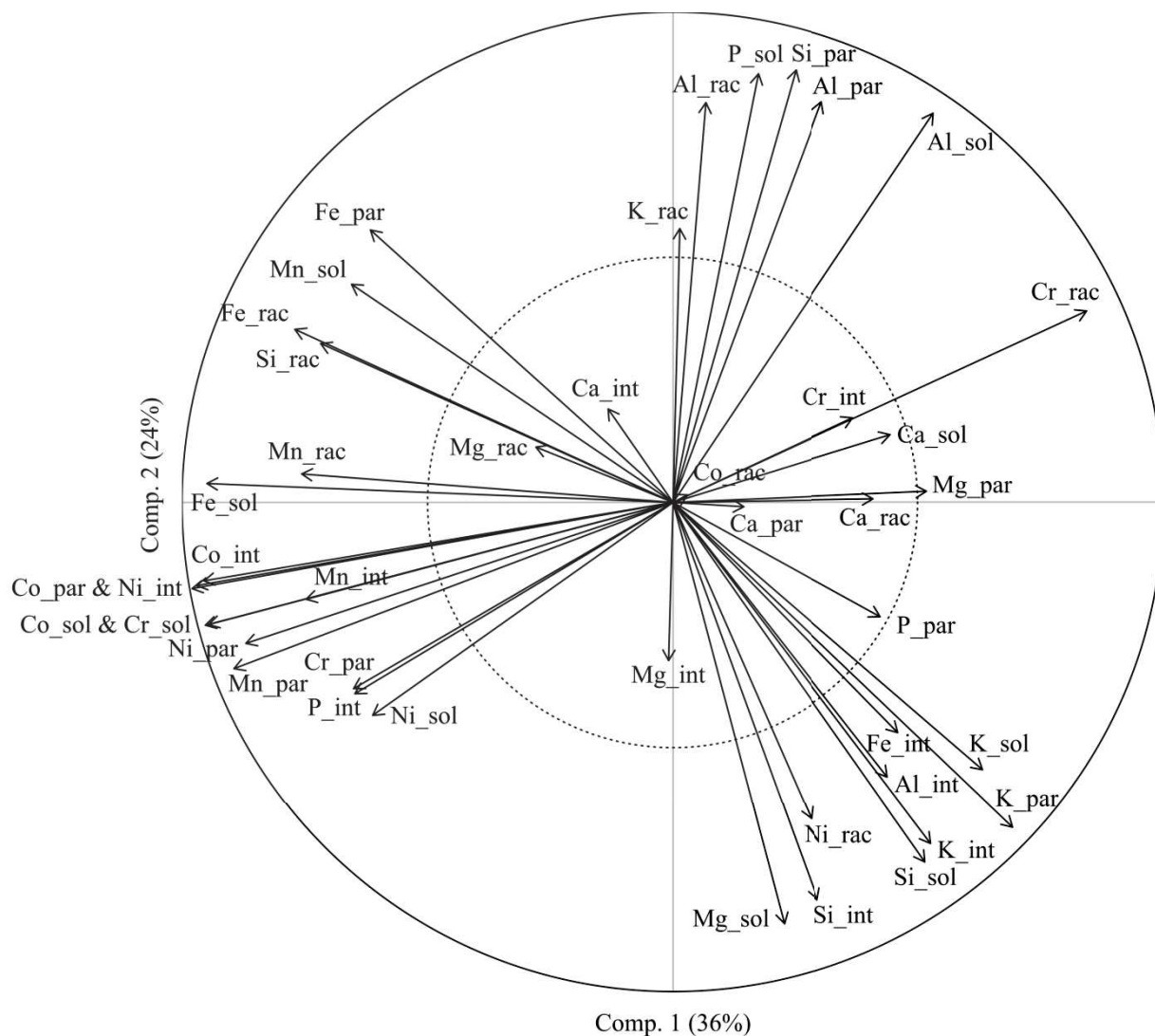
difficulté de calibration de la machine vis-à-vis de certains échantillons de références (Tableau 15). Les teneurs en éléments dans les tissus internes et les parois des nodules ont été évaluées par ICP-AL et sont exprimées en unités relatives (u.r) (Tableaux 10 et 11, respectivement).

Les analyses statistiques effectuées sur ces données sont des tests non-paramétriques de corrélation de rang de Spearman entre les quatre types de données citées (Tableau 16). Les variables analysées et le nombre de tests effectués ont été ciblés et limités afin d'effectuer des comparaisons pertinentes d'un point de vue biologique afin de caractériser des flux d'éléments entre différents compartiments. De ce fait, seulement quatre types de corrélations ont été investiguées (Tableau 16). Une première corrélation évalue le transfert des éléments entre le sol et les parois des nodules (sol - paroi nodule ; Tableau 16). Une deuxième corrélation analyse le transfert potentiel des éléments entre la paroi des nodules et les tissus internes des nodules (paroi nodule – tissus internes nodules ; Tableau 16). Une troisième corrélation est centrée sur l'assimilation potentielle des éléments du sol par les racines de la plante (sol - racine ; Tableau 16). Une quatrième et dernière corrélation mesure une translocation potentielle des éléments entre les tissus internes des nodules et les racines de la plante (tissus interne nodule - racine ; Tableau 16). Une synthèse des résultats de ces tests de corrélations sont disponibles dans le Tableau 16. L'ensemble de ces données est visualisée sous la forme d'une analyse en composantes principales (ACP) afin de détecter si des variables sont potentiellement corrélées entre elles (Figure 50). Cette figure inclut un cercle de corrélation où chaque variable numérique correspond à une teneur en éléments (calcium, magnésium, potassium et phosphore pour les éléments majeurs ; aluminium, chrome, cobalt, fer, manganèse et nickel pour les éléments traces métalliques et pour finir, le silicium) dans un type de compartiment (sol, paroi du nodule, tissus interne du nodule ou racine) (Figure 50A). Les corrélations de chacune des teneurs en éléments par rapport aux axes 1 et 2 sont présentées en Figure 50B et 50C.

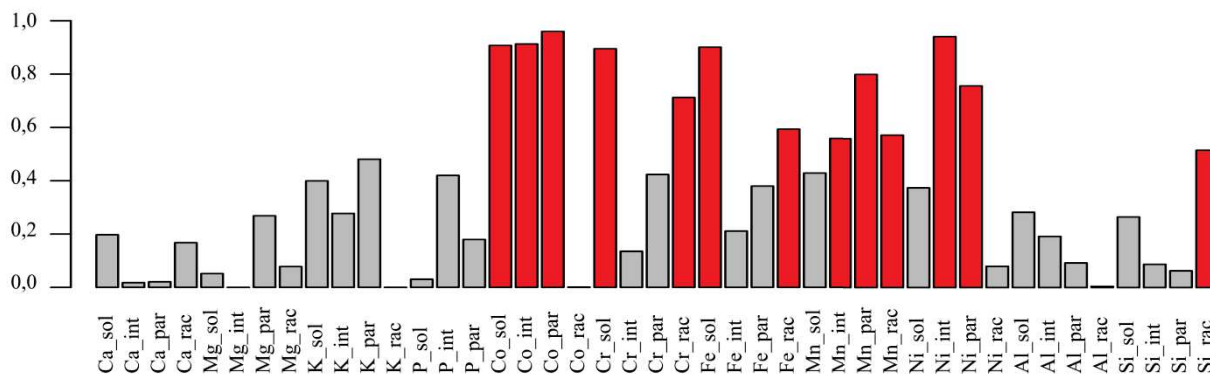
5.5.2 Résultats de la quatrième approche

Le flux des éléments majeurs et traces métalliques est analysé en fonction des compartiments du sol, nodules et racines (Tableau 16 ; Figure 50). L'analyse en composantes principales (ACP) incluant les teneurs en éléments des différents compartiments du sol, racine, nodule (tissus internes et paroi) est présentée en Figure 50. Sur cette analyse, les axes 1 et 2 représentent respectivement 36 et 24 % de la variation totale des données (Figure 45A). Pour chaque élément chimique, les résultats des tests de corrélations sont décrits en fonction des quatre types de corrélation effectuées entre les différents compartiments (sol - paroi du nodule ; paroi du nodule - tissu internes du nodule ; sol - racine ; tissu interne nodule - racine) (Tableau 16). Les résultats du flux des éléments du sol vers la paroi des nodules présentent des corrélations significatives pour le cobalt ($P < 0,01$; $r = 0,82$; Tableau 16) et le nickel ($P < 0,05$; $r = 0,78$; Tableau 16), confirmés par l'ACP (Figure 50A). Des flux significatifs d'éléments sont également détectés entre la paroi des nodules et les tissus internes des

A



B



C

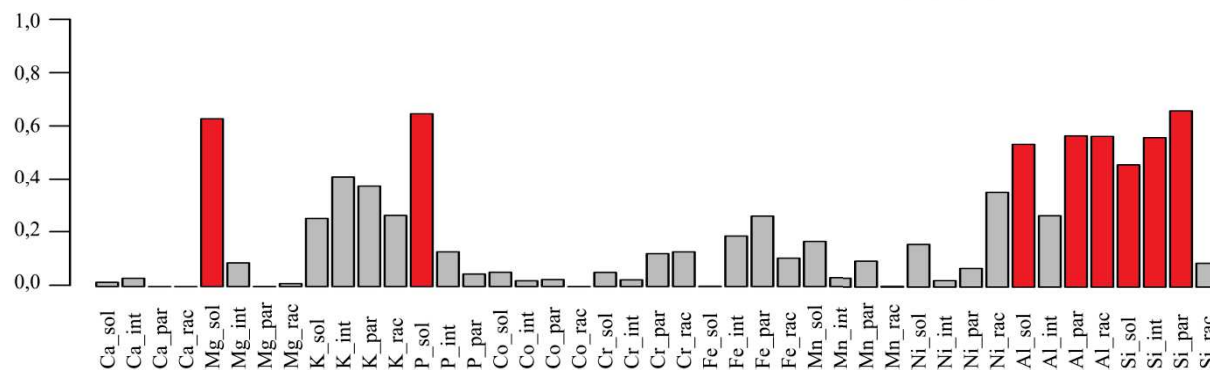


Figure 50 : Analyse en composante principale des éléments chimiques du sol, des racines chez *A. spirorbis*, des tissus internes et des parois des nodules. Les éléments chimiques du sol, des racines, des tissus internes et des parois des nodules sont respectivement symbolisés avec les suffixes « _sol », « _rac », « _int » et « _par ». Le panel A présente le cercle de corrélation de l'ACP. Les panels B et C présentent la corrélation des variables par rapport aux axes 1 et 2 de l'ACP, respectivement. Lorsqu'une variable présente une valeur de corrélation supérieure à $r = 0,5$ par rapport à un axe, elle est indiquée en rouge.

nodules pour un élément majeur (le potassium avec $P < 0,01$; $r = 0,85$) et quatre ETM (l'aluminium avec $P < 0,001$; $r = 0,93$; le cobalt avec $P < 0,05$; $r = 0,73$; le manganèse avec $P < 0,05$; $r = 0,77$; le nickel avec $P < 0,05$; $r = 0,73$) (Tableau 16), confirmés par ACP (Figure 50). Les résultats des tests de corrélations des éléments d'une part, entre le sol et les racines, et d'autre part entre les tissus internes du nodule et les racines n'ont pas montré de corrélations significatives, que ce soit pour les éléments majeurs ou les éléments traces métalliques (Tableau 16).

5.5.3 Discussion

Cette quatrième approche est centrée sur les flux des éléments entre les compartiments du sol, racines et nodules (tissus internes et paroi) à partir de calculs de corrélations. Les résultats obtenus démontrent que certains éléments traces métalliques présents dans les sols (le cobalt et le nickel) arrivent à intégrer les parois des nodules. Ce flux est positivement corrélé tout type de sol confondu (Tableau 16), indiquant que plus le sol est concentré en ETM, plus la paroi du nodule présentera un teneur forte en ETM. De plus, les analyses révèlent que ces ETM diffuseraient de la paroi vers les tissus internes du nodule de manière linéaire, puisqu'une corrélation significative a été mise en évidence entre la paroi du nodule et ses tissus internes. Afin de quantifier les flux d'éléments d'une part entre le sol et la paroi du nodule et d'autre part entre la paroi et les tissus internes du nodule, il faut disposer de données comparables, exprimées dans une unité similaire (mg.kg^{-1}). Les données obtenues par la technique analytique à plasma induit couplée à une ablation laser (ICP-AL) dans le cadre de ce travail de thèse sont exprimées en unité relative à l'appareil de mesure et non en mg.kg^{-1} (Tableaux 10 et 11). Au moment de la rédaction de ce manuscrit, les conversions de ces valeurs en mg.kg^{-1} sont toujours en attente de la calibration de l'appareil de mesure à partir d'échantillons de références.

Les analyses des flux d'assimilation des éléments (du sol vers les racines) et de translocation (des tissus internes des nodules vers les racines de la plante) n'ont pas présenté de résultats notables. Concernant les teneurs en éléments des racines, les dosages ont été effectués par microscopie électronique à balayage (MEB). Ces données intègrent d'une part un nombre limité d'échantillons provenant : d'un site calcaire (Wanek), de trois sites métallifères (sites Pandanus 1, Pandanus 2 et Tiébaghi) et trois sites volcano-sédimentaires (sites Poum Malabou, Serpent et Vertisol). D'autre part, les dosages effectués sont basés sur un nombre limité de répliques, où 30 % des données sont en dessous de seuil de détection de l'appareil (valeurs inférieures à 0,01 en concentration apparente ; Tableau 15). Pour valider/infirmer une absence de corrélations d'une part entre le sol et les racines et d'autre part entre les tissus internes du nodule, les dosages des éléments dans les racines pourraient être renforcés (i) en augmentant le nombre d'échantillons et (ii) en utilisant une technique d'analyse, plus adaptée telle que l'ICP-AL, pouvant doser les éléments dans les tissus internes et les parois des nodules avec une précision de l'ordre de $0,001 \text{ mg.kg}^{-1}$ (Tableaux 10 et 11, respectivement).

5.5 Discussion et conclusion du troisième chapitre

Le flux d'éléments traces métalliques dans les plantes est un sujet d'intérêt, notamment en Nouvelle-Calédonie où les sols riches en éléments trace métalliques (ETM) sont considérés comme hostiles envers le développement des plantes (Proctor, 2003). De ce fait, certains végétaux ont développé des mécanismes leur permettant de survivre à ces conditions particulières. Les mécanismes connus chez les végétaux pour lutter contre une toxicité polymétallique incluent une réduction de l'assimilation des éléments traces métalliques, une séquestration des ETM dans les vacuoles, une utilisation de phytochelatines et/ou metallothionéines et la production de divers antioxydants (Shahid *et al.*, 2015). En complément des mécanismes de défenses spécifiques aux végétaux, de nombreuses études rapportent que des associations symbiotiques entre des plantes avec des microorganismes du sol sont impliquées dans la défense d'une plante face à la toxicité polymétallique (Tiwari et Lata, 2018). Les mécanismes utilisés par ces microorganismes correspondent à une formation de biofilm, une production de sidérophores, d'exopolysaccharides et d'hormones végétales (Tiwari *et al.*, 2016, 2017). En effet, de nombreux travaux s'appuient sur l'utilisation de ces microorganismes associés aux plantes afin de les rendre tolérante à des sols soumis à un stress polymétallique (Tiwari et Lata, 2018). Par exemple, une association entre la plante *Triticum aestivum* avec des espèces bactériennes telles que *Bacillus cereus* et *Pseudomonas moraviensis* permet à la plante de tolérer un stress métallique induit par du cuivre, du chrome, du cobalt, du cadmium, du nickel, du manganèse et du plomb (Hassan *et al.*, 2017). De la même façon, une inoculation la bactérie *Bacillus licheniformis* sur *Oryza sativa* (le riz) conférerait une tolérance vis-à-vis du nickel (Jamil *et al.*, 2014). Une autre étude rapporte que trois souches de *Bradyrhizobium* sp. 750, *Pseudomonas* sp. et *Ochrobactrum cytisi* améliorent la tolérance au cuivre, cadmium et plomb chez l'espèce *Lupin luteus* (Dary *et al.*, 2010). C'est le cas également chez *Acacia spirorbis*, où un champignon ectomycorhizien est impliqué dans le contrôle des flux d'éléments traces métalliques. En effet, une étude rapporte que dans le cadre d'une association symbiotique, le champignon *Pisolithus albus* pouvait limiter l'absorption de nickel chez *Acacia spirorbis* et *Eucalyptus globulus* Labill. (Jourand *et al.*, 2014). Le mécanisme permettant de tolérer le nickel serait attribué une pompe à efflux de nickel situé au niveau des mycorhizes (Majorel *et al.*, 2014). Les mycorhizes jouent donc un rôle dans la détoxification du nickel chez *A. spirorbis*, il est donc légitime de formuler une hypothèse où les bactéries fixatrices d'azote associées à *A. spirorbis* joueraient aussi un rôle dans la régulation des ETM au niveau de l'organe fixateur d'azote : le nodule.

Les quatre approches effectuées pour détecter une potentielle gestion des éléments traces métalliques dans nodules chez *A. spirorbis* présentent les résultats notables suivants : (i) la détection d'ETM (aluminium, chrome, cobalt, fer, manganèse et nickel) dans les nodules au niveau de leurs tissus internes et de leurs parois, (ii) la présence de multiples ETM (aluminium, chrome, cobalt, fer et manganèse) sous la forme de particules incluses au niveau des parois des nodules, (iii) une signature

en éléments chimique des nodules spécifiques au type de sol et (iv) une mise en évidence de flux en éléments traces métalliques (cobalt et nickel) entre le sol et les nodules chez *A. spirorbis*.

L'ensemble de ces résultats démontre que les organes fixateurs d'azote chez *A. spirorbis* (i) contiennent des ETM et (ii) répondent différemment selon le type de sol. Ces résultats préliminaires doivent être considérés comme une première approche de la caractérisation des flux d'éléments traces métalliques chez *A. spirorbis*. Afin d'approfondir ces résultats, des expériences complémentaires seraient nécessaires afin de (i) quantifier les flux d'ETM entre le sol, les racines et les nodules, (ii) caractériser les mécanismes moléculaires bactériens et/ou végétaux impliqués dans la gestion des ETM et (iii) vérifier en conditions contrôlées (*in vitro* et/ou en mésocosmes) le rôle des microorganismes (bactéries et/ou champignons) dans la gestion des ETM au niveau de la plante.

Synthèse des résultats obtenus et
Discussion générale

6 Synthèse des résultats obtenus et discussion générale

6.1 Rappel de l'hypothèse générale du travail de thèse

Acacia spirorbis subsp. *spirorbis* est une légumineuse endémique de Nouvelle-Calédonie se développant naturellement sur des sols calcaires, métallifères et volcano-sédimentaires. Ces sols présentent des propriétés physico-chimiques contrastées et parfois contraignantes pour le développement des plantes, notamment de très fortes concentrations en éléments traces métalliques (ETM). La présence de symbioses plantes-microorganismes (champignons mycorhiziens et bactéries nodulantes et fixatrices d'azote) a été observée chez *Acacia spirorbis*. Il avait déjà été démontré que les symbioses mycorhiziennes contribuaient à l'adaptation de la légumineuse à ces contraintes édaphiques et lui permettait de coloniser ces différents milieux contrastés. Dans ce travail de thèse, nous faisons l'hypothèse que l'établissement d'une symbiose avec des bactéries nodulantes et fixatrices d'azote pourrait également jouer un rôle bénéfique dans l'adaptation d'*A. spirorbis* à ces milieux contrastés.

6.2 Synthèse des résultats obtenus

6.2.1 Chapitre 1 : Le potentiel fixateur d'azote chez *A. spirorbis* en conditions naturelles.

Ce premier volet de thèse a évalué la contribution de la symbiose fixatrice d'azote chez *A. spirorbis* en conditions naturelles. Pour cela, des feuilles d'*A. spirorbis* et d'espèces non-fixatrices d'azote ont été prélevées puis analysées selon la méthode de l'abondance naturelle du ^{15}N . De plus, les teneurs en azote foliaire chez *Acacia spirorbis* et chacune des espèces de références non-fixatrices d'azote ont été mesurées (Tableau 4). L'ensemble des résultats obtenus a été soumis à de multiples tests de corrélation non-paramétriques de Spearman afin de détecter un lien potentiel avec les paramètres du sol.

L'ensemble des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ obtenus chez *Acacia spirorbis* sont centrées autour de 0 ‰ et varient de -1,04 à +0,55 ‰ avec une moyenne (\pm écart-type) de $+0,29 \pm 0,56$ ‰ (à l'exception d'une valeur de +3,13 ‰ sur le site de Wanaham). Les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ des espèces de références non-fixatrices d'azote sont caractérisées par une forte variation allant de -4,83 à +7,05 ‰, toutes espèces de références non-fixatrices confondues. En complément de ces mesures de $\delta^{15}\text{N}$ chez *A. spirorbis* et les multiples espèces de références non-fixatrices d'azote, nous avons réalisé une expérience en conditions contrôlées permettant d'évaluer le paramètre β inclus dans les formules nécessaires pour calculer le %Ndfa. Cette valeur correspond à la signature isotopique en ^{15}N de jeunes plants d'*A. spirorbis* développés sur un substrat dépourvu d'azote minéral où le potentiel fixateur d'azote de la plante est considéré comme maximal. La moyenne du $\delta^{15}\text{N}$ obtenue est de $-0,94 \pm 0,37$ ‰. La comparaison des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ obtenues entre *Acacia spirorbis* et les espèces de références non-fixatrices d'azote ont permis de calculer le pourcentage d'azote issu de la fixation biologique (%Ndfa).

Le paramètre β évalué présente un écart type important (39 % de la valeur moyenne). De ce fait, les estimations du %Ndfa chez *A. spirorbis* sont renforcées en effectuant des simulations avec 10 valeurs différentes du paramètre β comprises entre $-1,00$ et $+1,00$ ‰ (Table 4 de Vincent *et al.*, 2018). La majorité des simulations réalisées présentent des valeurs de %Ndfa supérieures à plus de 80 % chez *A. spirorbis* en conditions naturelles, tout type de sol confondu (Table 4 de l'article Vincent *et al.*, 2018 et Table 5). En effet, le %Ndfa moyen d'*A. spirorbis* est de $83 \pm 39\%$ tout sites d'études et type de sol confondus. De manière remarquable, les estimations du %Ndfa moyen chez *A. spirorbis* est de 98 ± 13 % lorsque les valeurs extrêmes du site de Wanaham ne sont pas prises en compte.

Les teneurs en azote foliaire chez *A. spirorbis* varient de $16\,707$ mg.kg⁻¹ sur le site de Serpent à $23\,459$ mg.kg⁻¹ sur le site de Vertisol (Table 3 de Vincent *et al.*, 2018). Les teneurs en azote foliaire chez *A. spirorbis* varient significativement en fonction des sites ($P < 0,01$) mais pas en fonction des types de sol ($P = 0,4$). Les teneurs en azote foliaire des espèces de références non-fixatrices d'azote varient significativement ($P < 0,001$) en fonction de l'espèce avec des valeurs comprises entre 7877 mg.kg⁻¹ chez *Scaevola* sp. et $29\,954$ mg.kg⁻¹ chez *P. nummularoides*. De manière remarquable, les teneurs en azote foliaire chez *W. indica* (présent naturellement dans des sols calcaires, métallifères et siliceux) sont comprises entre $10\,861$ et $29\,600$ mg.kg⁻¹ et varient significativement ($P < 0,001$) en fonction des sites d'étude (Table 3 de Vincent *et al.*, 2018).

Les tests de corrélations (Table S2 et Figure S4 de Vincent *et al.*, 2018) effectués entre les teneurs en azote foliaire et les paramètres du sol démontrent que chez *A. spirorbis*, ses teneurs en azote foliaire (mg.kg⁻¹), sa signature isotopique ($\delta^{15}\text{N}$) et son pourcentage d'azote fixé (%Ndfa) ne sont pas significativement corrélés avec les paramètres du sol (Table S2 de Vincent *et al.*, 2018). En revanche, les teneurs en azote foliaire des espèces de références non-fixatrices sont significativement corrélées à l'azote du sol ($r = 0,80$; $P < 0,01$), au pH ($r = 0,76$; $P < 0,05$), au carbone du sol ($r = 0,93$; $P < 0,001$), au phosphore du sol ($r = 0,83$; $P < 0,05$), au calcium du sol ($r = 0,88$; $P < 0,01$) et à l'aluminium du sol ($r = 0,70$; $P < 0,05$).

6.2.2 Chapitre 2 : Caractérisation des rhizobia associés à *A. spirorbis* en conditions naturelles.

Le deuxième volet du travail de thèse effectué a caractérisé les rhizobia associés à *A. spirorbis* en conditions naturelles. Suite à des prélèvements de nodules sur le terrain et un isolement en laboratoire, une collection de 40 souches de rhizobia a été réalisée. Dans un premier temps, une approche multilocus (MLSA) a été utilisée afin d'identifier les rhizobia. Dans un second temps des expériences en conditions contrôlées ont été menées afin de caractériser la fonctionnalité de ces souches selon plusieurs critères : (i) la présence des gènes marqueurs de la symbiose, (ii) la capacité nodulante et fixatrice d'azote des souches, (iii) la présence de gènes marqueurs de la tolérance aux

éléments métalliques et (iv) la détermination des concentrations en éléments métalliques inhibant 50 % de la croissance des rhizobia (CI₅₀).

L'approche MLSA a démontrée qu'*A. spirorbis* établissait des symbioses nodulantes et fixatrices d'azote avec des rhizobia appartenant à deux groupes distincts de bactéries : les alpha- et bêta-rhizobia, plus précisément aux genres *Bradyrhizobium* (67,5 %) et *Paraburkholderia* (32,5 %), respectivement. Les souches de *Bradyrhizobium* sp. isolés correspondent à 9 espèces distinctes (Figure 2 du 2^{ème} chapitre). Les souches de *Paraburkholderia* sp., sont majoritairement regroupée au sein d'une espèce (Figure 3 du 2^{ème} chapitre). De manière remarquable, les souches de *Paraburkholderia* sp. ont été isolées exclusivement à partir de nodules développés dans des sols métallifères.

Les gènes marqueurs de la symbiose (*nodA* et *nifH*) ont été détectés puis séquencés chez chacune des souches de rhizobia. Concernant les souches de *Bradyrhizobium* sp., les analyses phylogénétiques menées sur les gènes *nodA* et *nifH* présentent systématiquement 3 clades distincts proches d'autres séquences de *nodA* et *nifH* déjà décrites chez le genre *Bradyrhizobium* (Figures 5 et 6 du 2^{ème} chapitre). Concernant les souches de *Paraburkholderia* sp., les séquences nucléotidiques des gènes *nodA* ne présentent pas de similarités avec d'autres séquences nucléotidiques de *nodA* déjà décrites (Tableau Supplémentaire 11 du 2^{ème} chapitre). Le gène *nifH* a été détecté chez toutes les souches de *Paraburkholderia* sp. et son séquençage est en cours d'acquisition lors de la rédaction de ce manuscrit.

La capacité nodulante et fixatrice d'azote des 40 souches a été démontrée à travers une expérience en conditions *in vitro* en utilisant de jeunes plants d'*A. spirorbis* (Tableaux Supplémentaires 6 et 7 du 2^{ème} chapitre). Le nombre de nodules formés, leurs biomasses et leurs efficacités varient significativement en fonction du genre de rhizobia inoculé (Tableau Supplémentaire 8 du 2^{ème} chapitre). Les biomasses aériennes, racinaires, ainsi que la fixation d'azote globale des plants d'*A. spirorbis* ne varient pas en fonction du genre de rhizobia inoculé. En revanche, l'inoculation de souches de *Bradyrhizobium* sp. isolées de sols métallifères présentent une fixation d'azote et des biomasses aériennes significativement plus faibles que des souches de *Bradyrhizobium* sp. isolées de sols volcano-sédimentaires.

Chez 98 % des souches caractérisées, les gènes marqueurs de la tolérance aux éléments métalliques (gènes *cnrA* et *nreB*) sont simultanément soit présents, soit absents (Tableau 3 du 2^{ème} chapitre). La présence de ces gènes marqueurs de la tolérance aux éléments métalliques diffère en fonction du genre de rhizobia et du type de sol. En effet, les gènes *cnrA* et *nreB* sont détectés chez 70 % des souches de *Paraburkholderia* sp., contre 29 % pour les souches de *Bradyrhizobium* sp. De plus, 50 % des souches isolées de sols métallifères possèdent ces deux gènes, contre 33 % chez des souches isolées de sols volcano-sédimentaires.

Les déterminations des CI_{50} de six éléments métalliques (Al, Co, Cr, Fe, Mn et Ni) présentent des résultats variables selon les souches et les métaux considérés. Par exemple, les CI_{50} du nickel varient de 78 à 3540 μM toutes souches confondues. Les souches de *Paraburkholderia* sp. isolées de sols métallifères présentent des CI_{50} variant de 115 à 1684 μM . Les souches de *Bradyrhizobium* sp. isolées de sols métallifères présentent des CI_{50} variant de 131 à 3540 μM . Les souches de *Bradyrhizobium* sp. isolées de sols volcano-sédimentaires présentent des CI_{50} variant de 78 à 1479 μM . De manière remarquable, les souches présentant des CI_{50} supérieures à 1000 μM de Ni proviennent à 85 % de sols métallifères.

6.2.3 Chapitre 3 : Gestion potentielle des éléments traces métalliques dans les organes fixateurs d'azote chez *A. spirorbis*.

Acacia spirorbis fixe biologiquement l'azote quel que soit le type de sol, notamment dans des sols riches en éléments traces métalliques (ETM). Les ETM sont connus pour inhiber le développement des plantes, des rhizobia et le fonctionnement de la fixation d'azote (Zahran, 1999 ; Emamverdian *et al.*, 2015). De ce fait, le dernier volet de ce travail de thèse soulève la question de savoir comment cette légumineuse et ses symbiontes gèrent les éléments traces métalliques au niveau de ses tissus racinaires et plus particulièrement, au niveau des nodules.

Pour répondre à cette question, des nodules et des racines d'*A. spirorbis* ont été récoltés dans sols calcaires (CA), métallifères (UF) et volcano-sédimentaires (VS). Les expériences menées ont été de (i) doser les éléments chimiques (dont les métaux) dans des nodules entiers (ICP-OES), (ii) localiser les ETM dans ces tissus (MEB), (iii) quantifier de manière précise les ETM dans les nodules (ICP-AL) et (iv) analyser les données récoltées afin de détecter des transferts potentiels d'éléments métalliques entre le sol, les racines et les nodules (tests de corrélations non-paramétriques de Spearman).

Les premiers résultats obtenus par ICP-OES sur des nodules entiers sont caractérisés par la présence d'éléments métalliques dans les nodules (Tableau 7). De manière remarquable, les teneurs en éléments métalliques sont plus élevées dans des nodules développés dans des sols métallifères (Tableau 7). De plus, les teneurs en éléments métalliques des nodules telles que le cobalt, le chrome, le fer, le manganèse et le nickel sont significativement corrélées aux teneurs en éléments métalliques des sols (Tableau 8).

Une histolocalisation des éléments chimiques a permis de détecter des éléments métalliques dans les parois et tissus internes des nodules. Certains éléments sont répartis de manière homogène entre les parois et les tissus internes, tandis que d'autres éléments sont concentrés au niveau des parois (Tableau 9 ; Figures 44, 45 et 46). De plus, le type d'élément chimique concentré au niveau des parois

diffère selon le type de sol (Tableau 9). Les quantités d'éléments chimiques présentes dans les nodules sont proches du seuil de détection du MEB. De ce fait, une quantification plus précise a été réalisée par ICP-AL.

Les éléments chimiques dans les tissus internes des nodules ont été quantifiés par ICP-AL. Ces résultats confirment la présence d'éléments métalliques dans les tissus des nodules (Tableau 10). La signature en éléments chimique des nodules varie en fonction des types de sol où ont été récolté les nodules. De manière remarquable, les teneurs en éléments métalliques telles que le cobalt, le cuivre, le manganèse et le nickel sont significativement plus élevées dans des nodules développés dans des sols métallifères par rapport à des nodules développés dans des sols calcaires et volcano-sédimentaires (Tableau 14).

Les analyses statistiques menées sur les jeux de données obtenus ont permis de mettre en évidence des corrélations significatives d'éléments chimiques entre différents compartiments (sol/paroi du nodule/tissus interne du nodule). En effet, les teneurs en nickel et cobalt sont significativement corrélées (i) entre le sol et les parois du nodule et (ii) entre les parois du nodule et les tissus internes du nodule (Tableau 16).

6.3 Discussion générale

6.3.1 Le potentiel fixateur d'azote chez *A. spirorbis*

L'estimation du potentiel fixateur d'azote chez *A. spirorbis* en conditions naturelles (%Ndfa > 80 %) est l'un des plus élevés chez les légumineuses, en particulier chez les *Acacia* spp. En effet, une étude rapporte que le %Ndfa moyen de neuf *Acacia* spp. en Namibie est de 29 % (Schulze *et al.*, 1991 ; Andrews *et al.*, 2011). Plusieurs études rapportent des valeurs de %Ndfa chez *Acacia mangium*, *A. mucronata*, *A. melanoxylon*, *A. senegal* (syn. *Senegalia senegal*), *A. holosericea* de 50, 43, 48, 39 et 30 %, respectivement (Hamilton *et al.*, 1993 ; Ndiaye & Ganry, 1997 ; Galiana *et al.*, 2002 ; Raddad *et al.*, 2005 ; Isaac *et al.*, 2011).

Acacia spirorbis a recours à la fixation biologique de l'azote quel que soit le type de sol et le site d'étude, à une exception près : le site Wanaham (Tableau 5 ; Vincent *et al.*, 2018). Ce site d'étude est caractérisé par un sol calcaire et de très fortes teneurs en aluminium ($170\,473 \pm 34\,078 \text{ mg.kg}^{-1}$; Tableau 2 ; Vincent *et al.*, 2018). Cet élément métallique est connu pour inhiber le développement des rhizobia dans les sols et impacter le fonctionnement de la fixation biologique de l'azote (Arora *et al.*, 2009 ; Mendoza-Soto *et al.*, 2015). Il est donc probable que l'aluminium contenu dans le sol du site Wanaham ait une influence sur le développement des rhizobia dans les sols pouvant s'associer avec *A. spirorbis*, inhibant ainsi sa capacité à établir des symbioses fixatrices d'azote. Pourtant, aucune

carence en azote foliaire n'a été détectée chez des *A. spirorbis* se développant naturellement sur le site Wanaham. Une autre particularité du site Wanaham est sa forte teneur en azote minéral ($2660 \pm 553 \text{ mg.kg}^{-1}$). Comme toute espèce végétale, *Acacia spirorbis* est capable d'assimiler l'azote minéral *via* ses racines sans avoir recours à la fixation biologique de l'azote. Il est donc probable que sur le site Wanaham, *A. spirorbis* compense sa faible utilisation de la symbiose fixatrice d'azote par une assimilation d'azote minéral *via* ses racines.

Plusieurs éléments permettent d'argumenter le fait que le développement d'*A. spirorbis* en conditions naturelles serait relativement indépendant de l'azote minéral. Les teneurs en azote minéral entre les sites d'études sont très variables (de 387 à 13 945 mg.kg^{-1} ; Tableau 2 ; Vincent *et al.*, 2018). Le développement des espèces non-fixatrices est significativement corrélé à l'azote minéral, ce qui n'est pas le cas pour *A. spirorbis* (Table S3 ; Vincent *et al.*, 2018). De plus, la symbiose fixatrice d'azote exploitant l'azote atmosphérique fournit la quasi-totalité des besoins azotés de la plante (Tableau 4 ; Vincent *et al.*, 2018). La mise en relation de ces éléments démontre que la symbiose fixatrice d'azote contribue (i) dans la relative indépendance de la plante par rapport à l'azote minéral et (ii) de manière plus large, à son adaptation à des sols calcaires, métallifères et volcano-sédimentaires présentant des propriétés géo-chimiques contrastées.

Acacia spirorbis serait une espèce particulièrement intéressante pour restaurer des sols où l'azote minéral fait défaut, notamment sur des sols miniers ou bien suite à des feux de forêts (Jaffré *et al.*, 1997). En effet, la symbiose fixatrice d'azote permet de transformer de l'azote atmosphérique en azote assimilable par les plantes. L'utilisation d'*Acacia spirorbis* en tant que plante « nurse » dans les sols post-exploitation minière est donc recommandée afin de pallier le manque d'azote minéral. En revanche, le caractère grégaire de cette espèce végétale et son application dans la restauration de sites miniers nécessite plusieurs précautions : (i) une utilisation parcimonieuse de cette espèce, (ii) un suivi régulier des individus introduits afin de limiter une forte colonisation des espaces ouverts et (iii) une gestion des individus post-introduction une fois que le rôle de plante « nurse » a été remplie, *i.e.* réintroduire de l'azote minéral, enraciner les sols, relancer une activité microbiologique de dégradation de la matière organique suite à un dépôt de litière, etc.

La conclusion des résultats obtenus dans ce premier volet suggère qu'en conditions naturelles et en termes fonctionnels, la symbiose fixatrice d'azote est un atout majeur dans l'adaptation d'*A. spirorbis* à des milieux contrastés et parfois extrêmes. De plus, la symbiose fixatrice d'azote conférerait à la plante une capacité de restauration des sols miniers et peut être utilisé dans le cadre de la restauration de milieux miniers, sous réserve d'une gestion adaptée des individus introduits.

6.3.2 Les caractéristiques des rhizobia associés à *A. spirorbis*

Acacia spirorbis établit des symbioses fixatrices d'azote avec un large éventail de symbiontes adaptés aux sols et appartenant respectivement aux alpha- et bêta-rhizobia, genres *Bradyrhizobium* et *Paraburkholderia* (Chapitre 2).

Chez les *Acacia s.l.*, rares sont les espèces présentant un aussi large éventail de symbiontes avec des alpha- et bêta-rhizobia. A notre connaissance, une étude menée sur des *Mimosa* spp. rapporte des symbiontes appartenant aux genres *Rhizobium* et *Paraburkholderia* (dos Reis *et al.*, 2010). Une étude encore plus récente rapporte que la légumineuse *Vachellia karroo* (ex *Acacia karroo*) serait capable d'établir des symbioses fixatrices d'azote avec des alpha- et bêta-rhizobia (Beukes *et al.*, 2018). Cependant, aucune expérience permettant de confirmer la nodulation et la capacité fixatrice d'azote de chacune des souches en conditions symbiotiques n'est mentionnée dans cette étude (Beukes *et al.*, 2018). De ce fait, la capacité fixatrice d'azote des alpha- et bêta-rhizobia mentionnés dans cette étude reste à confirmer (Beukes *et al.*, 2018). La prudence est de mise puisque les *Burkholderia* au sens large sont naturellement présents en tant que bactéries endophytes et non-fixatrices d'azote dans les tissus internes des nodules, notamment chez les légumineuses *Mimosa pudica*, *Glycine max* et *Vachellia seyal* (Pandey *et al.*, 2005 ; Diouf *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2008). Tant qu'une démonstration de la capacité nodulante et fixatrice des souches n'est pas réalisé en laboratoire, un simple isolement de ces souches à partir d'un nodule et leur identification en tant que rhizobia ne peuvent pas être considérés comme des éléments assez pertinents pour conclure sur la capacité fixatrice d'azote de ces souches.

A une échelle cellulaire/moléculaire, *Acacia spirorbis* pourrait présenter également un large éventail génétique/moléculaire de signaux permettant la mise en place de la symbiose fixatrice d'azote. En effet, la mise en place d'une symbiose rhizobium-légumineuse nécessite un dialogue moléculaire de haute affinité permettant d'induire la formation de nodules et la colonisation de ces tissus par les rhizobia (Oldroyd, 2013). Ce dialogue moléculaire présente plusieurs niveaux de spécificités : (i) la plante hôte émet un mélange de flavonoïdes afin d'attirer les rhizobia du sol, (ii) la structure des molécules de reconnaissance émises par les rhizobia (facteurs Nod) varient en fonction des souches, (iii) la plante hôte possède différents types de récepteurs pouvant reconnaître les facteurs Nod et (iv) chaque rhizobia possède une panoplie spécifique et complexe d'effecteurs servant à contourner les mécanismes de défense de la plante hôte afin de mettre en place la symbiose (Oldroyd, 2013). Dans ce travail de thèse, les alpha- et les bêta-rhizobia caractérisés sont deux groupes phylogénétiquement éloignés (Masson-Boivin *et al.*, 2009). Entre des souches de *Paraburkholderia* et *Bradyrhizobium*, les gènes bactériens requis pour mettre en place la symbiose fixatrice d'azote (*nodA* et *nifH*) présentent des différences phylogénétiques (Estrada-de Los Santos *et al.*, 2018). Pourtant, *A. spirorbis* est capable de recruter ces rhizobia et de développer une symbiose fixatrice d'azote qui est

fonctionnelle en conditions naturelles. Il est envisageable qu'*Acacia spirorbis* puisse synthétiser plusieurs types de flavonoïdes afin d'attirer différents rhizobia et/ou de reconnaître potentiellement plusieurs types de factor Nod avec un ou plusieurs récepteurs racinaires. Le dialogue moléculaire avec des rhizobia phylogénétiquement éloignés pourrait alors être lié avec une forte capacité de reconnaissance de la part d'*A. spirorbis*.

Dans le chapitre 2 de ce travail de thèse, la capacité nodulante et fixatrice d'azote des souches d'alpha- et bêta-rhizobia isolés a été vérifiée à travers une expérience en conditions *in vitro* sur de jeunes plants d'*A. spirorbis*. De manière remarquable, la capacité nodulante et fixatrice d'azote des symbiontes chez *A. spirorbis* varient en fonction du genre de rhizobia inoculé. En effet, les inoculations des souches de *Bradyrhizobium* sp. ont formé plus de nodules (en nombre et en biomasse totale) que les *Paraburkholderia* sp. (Tableau Supplémentaire 8 ; 2^{ème} chapitre). En revanche, cette différence de phénotype symbiotique n'a pas d'impact significatif sur la capacité fixatrice des souches et sur les biomasses aériennes des plants d'*A. spirorbis* (Tableau Supplémentaire 8 ; 2^{ème} chapitre). Les symbioses fixatrices d'azote chez *A. spirorbis* présenteraient donc une plasticité relative de phénotypes symbiotiques en fonction du genre de rhizobia, sans avoir d'impact significatif sur le développement des plantes.

Les rhizobia d'*A. spirorbis* sont caractérisés par des tolérances aux éléments métalliques variant en fonction des souches et de la nature chimique de l'élément métallique. Par exemple, les souches issues des sols volcano-sédimentaires peuvent présenter des tolérances au nickel faibles (inférieures à 100 μM de Ni), moyennes (comprises entre 100 et 100 μM de Ni) et élevées (supérieures à 1000 μM de Ni). Les différences de tolérances des souches aux éléments métalliques peuvent venir du fait que les rhizobia ne présentent pas la même exposition aux éléments métalliques contenus dans les sols. En effet, le sol est un milieu hétérogène résultant de la dégradation partielle d'une roche mère. Cette altération de la roche mère forme des strates (horizons) et chacune d'entre elle est composée d'un milieu solide, liquide et gazeux (Kabata-Pendias, 1993). De plus, le sol est considéré comme un système bio-géochimique dynamique avec (i) une distribution hétérogène de ses composés, (ii) un changement spatial et saisonnier de ses propriétés physico-chimiques, (iii) une transformation de ses éléments chimiques et pour finir, (iv) des transferts d'éléments entre différentes phases (Kabata-Pendias, 1993). De ce fait, le comportement et la répartition des éléments métalliques peut varier dans un même type de sol, en présentant des zones concentrées et/ou dépourvues en éléments métalliques. En parallèle, les rhizobia peuvent vivre sous une forme libre dans le sol en évoluant dans des zones concentrées et/ou dépourvues en éléments métalliques. Il est donc possible que sur un même site d'étude, *Acacia spirorbis* puisse recruter des rhizobia proches de zones concentrées et/ou dépourvues en éléments métalliques. Les rhizobia associés à *A. spirorbis* étant soumis à la pression abiotique de l'environnement, ils pourraient présenter, sur un même site d'étude, différents degrés de tolérance aux éléments métalliques.

L'ensemble de ces résultats confirme le fait que les rhizobia associés à *A. spirorbis* sont adaptés au type de sol dans lesquels ils évoluent. En Nouvelle-Calédonie, des observations similaires ont été faites sur le symbiosome de plantes se développant sur sols métallifères, notamment chez les espèces de *Costularia* spp., *Mimosa pudica* et *Serianthes calycina* (Chaintreuil *et al.*, 2007 ; Gonin *et al.*, 2013 ; Klonowska *et al.*, 2012).

A notre connaissance, cette étude des symbiontes associés à *A. spirorbis* est la première à rapporter un degré « d'intimité » symbiotique aussi large chez une légumineuse endémique en conditions naturelles avec (i) la présence dans les nodules de bactéries appartenant aux genres *Bradyrhizobium* et *Paraburkholderia*, (ii) la confirmation fonctionnelle et génétique de leur capacité à fixer l'azote en symbiose avec *A. spirorbis* et (iii) une diversité taxonomique et fonctionnelle de la fixation d'azote structurée par le type de sol, où les souches de *Paraburkholderia* sont exclusivement retrouvées dans des sols métallifères et les souches de *Bradyrhizobium* sp. présentent un fonctionnement de la fixation d'azote différent en fonction de leur type de sol d'origine (métallifère ou volcano-sédimentaire). Ces résultats sont un élément supplémentaire suggérant que la symbiose fixatrice d'azote contribuerait de manière significative à l'adaptation d'*A. spirorbis* à des sols contrastés.

6.3.3 Les éléments traces métalliques dans les nodules d'*A. spirorbis*

L'ensemble des résultats obtenus démontre que les organes fixateurs d'azote chez *A. spirorbis* (i) contiennent des ETM et (ii) répondent différemment selon le type de sol (Tableau 14). En effet, certains éléments traces métalliques présents dans les sols (le cobalt et le nickel) intégreraient les parois des nodules. Ce flux est positivement corrélé tout type de sol confondu (Tableau 16), indiquant que plus le sol est concentré en ETM, plus la paroi du nodule présentera une teneur forte en ETM. De plus, les analyses révèlent que ces ETM diffuseraient de la paroi vers les tissus internes du nodule de manière linéaire, puisqu'une corrélation significative a été mise en évidence entre les teneurs en éléments métalliques au niveau de la paroi du nodule et des tissus internes (Tableau 16). Ces résultats préliminaires doivent être considérés comme une première approche de la caractérisation de la gestion des métaux chez *A. spirorbis*. Afin de les approfondir, des expériences complémentaires sont nécessaires afin de (i) quantifier les flux d'ETM entre le sol, les racines et les nodules, (ii) caractériser les mécanismes moléculaires bactériens et/ou végétaux impliqués dans la gestion des ETM et (iii) vérifier lors d'expérience menées en conditions contrôlées (*in vitro* et/ou en mésocosmes) le rôle des microorganismes (bactéries et/ou champignons) dans la gestion des ETM au niveau de la plante.

Le flux d'éléments traces métalliques dans les plantes est un sujet d'intérêt, notamment en Nouvelle-Calédonie où les sols riches en éléments trace métalliques (ETM) sont considérés comme

hostiles envers le développement des plantes (Proctor, 2003). De ce fait, certains végétaux ont développé des mécanismes leur permettant de survivre à ces conditions particulières. Les mécanismes connus chez les végétaux pour lutter contre une toxicité polymétallique incluent une réduction de l'assimilation des éléments traces métalliques, une séquestration des ETM dans les vacuoles, une utilisation de phytochélatines et/ou metallothionéines et la production de divers antioxydants (Shahid *et al.*, 2015). En complément des mécanismes de défenses spécifiques aux végétaux, de nombreuses études rapportent que des associations symbiotiques entre des plantes avec des microorganismes du sol sont impliquées dans la défense d'une plante face à la toxicité polymétallique (Tiwari & Lata, 2018). Les mécanismes utilisés par ces microorganismes correspondent à une formation de biofilm, une production de sidérophores, d'exopolysaccharides et d'hormones végétales (Tiwari *et al.*, 2016, 2017). En effet, de nombreux travaux s'appuient sur l'utilisation de ces microorganismes associés aux plantes afin de les rendre tolérantes à des sols soumis à un stress polymétallique (Tiwari & Lata, 2018). Par exemple, une association entre la plante *Triticum aestivum* avec des espèces bactériennes telles que *Bacillus cereus* et *Pseudomonas moraviensis* permettrait à la plante de tolérer un stress métallique induit par du cuivre, du chrome, du cobalt, du cadmium, du nickel, du manganèse et du plomb (Hassan *et al.*, 2017). De la même façon, une inoculation de la bactérie *Bacillus licheniformis* sur *Oryza sativa* (le riz) conférerait une tolérance vis-à-vis du nickel (Jamil *et al.*, 2014). Une autre étude rapporte que trois souches de *Bradyrhizobium* sp. 750, *Pseudomonas* sp. et *Ochrobactrum cytisi* améliorent la tolérance au cuivre, cadmium et plomb chez l'espèce *Lupin luteus* (Dary *et al.*, 2010). C'est le cas également chez *Acacia spirorbis*, où un champignon ectomycorhizien est impliqué dans le contrôle des flux d'éléments traces métalliques. En effet, une étude rapporte que dans le cadre d'une association symbiotique, le champignon *Pisolithus albus* pouvait limiter l'absorption de nickel chez *Acacia spirorbis* et *Eucalyptus globulus* Labill. (Jourand *et al.*, 2014). Le mécanisme permettant de tolérer le nickel serait attribué une pompe à efflux de nickel situé au niveau des mycorhizes (Majorel *et al.*, 2014). Les mycorhizes jouent donc un rôle dans la détoxification du nickel chez *A. spirorbis*, il est donc légitime de formuler une hypothèse où les bactéries fixatrices d'azote associées à *A. spirorbis* joueraient aussi un rôle dans la régulation des ETM au niveau de l'organe fixateur d'azote : le nodule.

Les données obtenues dans ce troisième volet indiquent que (i) des ETM sont présents dans les nodules et (ii) les tissus internes des nodules présentent des signatures en éléments chimiques contrastées en fonction du type de sol. L'environnement dans lequel évolue *A. spirorbis* a donc un effet sur ses tissus, notamment dans les nodules où se déroule le processus de la fixation d'azote. Des mécanismes potentiels de gestion des ETM par la plante et/ou les bactéries sont envisageables, permettant ainsi à *A. spirorbis* d'avoir recours à la symbiose fixatrice d'azote quelles que soient les conditions édaphiques dans lesquelles la plante évolue, renforçant ainsi la contribution des rhizobia dans la capacité d'adaptation de la plante à des contraintes édaphiques variées.

6.3.4 *Acacia spirorbis* : une légumineuse originaire d’Australie pouvant servir de plante modèle dans l’étude des symbioses en milieux variés et parfois extrêmes

Les travaux menés sur *Acacia spirorbis* subsp. *spirorbis* en Nouvelle-Calédonie révèlent plusieurs caractéristiques d’une plante modèle afin d’étudier la contribution des microorganismes dans son adaptation à des sols contrastés. Ces caractéristiques sont liées à son territoire d’origine : l’Australie.

Plusieurs travaux rapportent que cette espèce serait originaire d’Australie, le berceau de la diversité des *Acacia sensu stricto* incluant ~1045 espèces (Maslin 2004 ; Lewis *et al.*, 2005). En Australie, les *Acacia s.s.* se développent dans des écosystèmes variés : aride, semi-aride et sub-tropical (Maslin 2001 ; Murphy *et al.*, 2010). Plusieurs espèces d’*Acacia s.s.* se sont dispersées depuis le territoire australien, soit naturellement, soit par intervention humaine (Brown *et al.*, 2012). Le mécanisme d’introduction initiale d’*Acacia spirorbis* en Nouvelle-Calédonie n’est pas encore clairement élucidé. Cependant, plusieurs arguments corroborent une hypothèse de dispersion longue distance d’origine naturelle : (i) des données préliminaires sur la génétique des populations chez *A. spirorbis* estimerait une introduction remontant à 100 000 ans (M. Ducouso ; données non-publiées), (ii) la dispersion des *Acacia s.s.* australiens médiée par une action humaine aurait débuté en 1788, après l’arrivée des premiers européens en Australie (Richardson *et al.*, 2011) et (iii) une dispersion longue distance naturelle d’*Acacia* a déjà été décrite de l’Australie vers la Nouvelle-Zélande, avec des graines viables sur une longue période, une tolérance à l’eau de mer (New, 1984) et une attractivité pour les oiseaux migrateurs (Macphail & Hill, 2001).

Suite à l’introduction d’*Acacia spirorbis* sur le territoire néo-calédonien, des populations naturelles sont à ce jour présentes sur des sols calcaires, métallifères, volcano-sédimentaires. *Acacia spirorbis* présenterait donc un caractère invasif qui rappelle celui de ses confrères australiens (Le Maître *et al.*, 2011 ; Miller *et al.*, 2011 ; Richardson *et al.*, 2012). A ce jour, 23 de ces espèces sont reconnues comme possédant un potentiel invasif extrêmement élevé en dehors de leur habitat d’origine (Richardson & Rejmánek, 2011). Ce caractère invasif serait conféré en partie par (i) la persistance des graines dans les sols et (ii) la capacité à établir une symbiose fixatrice d’azote avec des rhizobia (Farrell & Ashton, 1978 ; VanInsberghe *et al.*, 2015). Chez les *Acacia* spp. australiens, le succès de la colonisation serait en partie lié à leur degré d’intimité symbiotique (Rodriguez-Echeverria *et al.*, 2011). Deux stratégies sont proposées : (i) la co-introduction de rhizobia compatibles avec la plante sur un nouveau territoire et/ou (ii) la capacité d’établir des symbioses avec des rhizobia locaux éloignés phylogénétiquement de ceux présents dans les sols d’origine de la plante (Rodriguez-Echeverria *et al.*, 2011). Une étude rapporte que les *Acacia* spp. australiens sont majoritairement associés avec des bactéries appartenant au genre *Bradyrhizobium*, notamment avec l’espèce *B. japonicum* (Lafay & Burdon, 2001 ; Leary *et al.*, 2006). Il est à noter qu’en dehors de l’Australie

(Afrique du Sud, Malaisie et Nouvelle Zélande), les espèces *A. auriculiformis*, *A. dealbata*, *A. longifolia*, *A. mangium* and *A. mearnsii* maintiennent leur degré d'intimité symbiotique avec des espèces du genre *Bradyrhizobium* (Joubert, 2003 ; Weir *et al.*, 2004 ; Roux *et al.*, 2009). Concernant *A. spirorbis*, son degré d'intimité symbiotique très large recoupe en partie celui des *Acacia* spp. invasifs australiens. En effet, la caractérisation des rhizobia associés à *A. spirorbis* indique une compatibilité symbiotique avec des souches proches de neuf espèces différentes de *Bradyrhizobium*, dont *B. japonicum*. Cependant, *A. spirorbis* ne se contente pas d'établir des symbioses avec des bactéries du genre *Bradyrhizobium*. Nos résultats rapportent que dans les sols métallifères, une partie des symbiontes associés à *A. spirorbis* appartiennent au genre *Paraburkholderia*. Ces résultats confirmeraient le fait qu'*A. spirorbis* utilise les mêmes stratégies de colonisation que les *Acacia* spp. invasifs australiens : utiliser des symbiontes d'origine (*Bradyrhizobium*) et établir des symbioses avec de nouveaux genres/espèces (*Paraburkholderia*).

Les rhizobia contribueraient donc de manière significative dans l'adaptation d'*Acacia spirorbis* à des sols contrastés mais ce ne sont pas les seuls microorganismes impliqués dans le succès de cette adaptation. En effet, une étude rapporte que *A. spirorbis* est capable d'établir des symbioses avec des champignons ectomycorhiziens (ECM). Ces ECM sont notamment structurés en fonction du type de sol et des conditions physico-chimiques (Houlès *et al.*, 2018). De manière notable, l'importance et l'efficacité de l'utilisation d'*A. spirorbis* a été mise en évidence dans le cadre de la restauration d'écosystèmes dégradés, notamment sur les sols miniers après une exploitation de gisements nickélifères (Houlès, 2018). Une étude rapporte que *Pisolithus albus*, un champignon ectomycorhizien associé à *A. spirorbis*, améliorerait la croissance de la plante dans des sols nickélifères (Jourand *et al.*, 2014). De manière remarquable, ce champignon dispose d'une pompe à efflux de nickel, utilisée pour limiter l'accumulation de nickel dans les racines de la plante (Majorel *et al.*, 2014). D'autres travaux sont également entrepris sur les champignons mycorhiziens à arbuscule (AMF) et les résultats sont en cours d'acquisition et de publication.

Acacia spirorbis aurait subi une dispersion naturelle longue distance, suivi d'une colonisation insulaire et d'un maintien dans ce nouvel environnement, promouvant alors son endémisme. La clé de son succès reposerait en partie sur les associations symbiotiques avec des microorganismes du sol : des bactéries fixatrices d'azote, des champignons ectomycorhiziens et des champignons mycorhiziens à arbuscule. De manière notable, les conditions du sol structurent la taxonomie et la physiologie de ces microorganismes. Les propriétés physico-chimiques contrastées des sols calcaires, métallifères et volcano-sédimentaires ne sont pas un obstacle puisqu'*Acacia spirorbis* serait capable d'adapter son panel de symbiontes en fonction de l'environnement afin d'établir des associations bénéfiques avec les microorganismes locaux, quel que soit le type de sol. De ce fait, *Acacia spirorbis* pourrait être

considéré comme un modèle d'étude dans la contribution des microorganismes dans l'adaptation d'une plante à des conditions édaphiques contrastées.

Conclusions et perspectives

7. Conclusions et perspectives du travail de thèse

Le travail de thèse effectué a porté sur trois aspects : (i) l'évaluation du fonctionnement de la fixation d'azote en conditions naturelles, (ii) la caractérisation des rhizobia associés à *A. spirorbis* en conditions naturelles et (iii) la réponse adaptative de la plante vis-à-vis des ETM au niveau de ses nodules. Les données obtenues sont : (i) un très fort potentiel fixateur d'azote quel que soit le type de sol (85 ± 29 %Ndfa), (ii) un large éventail de partenaires symbiotiques (*Bradyrhizobium* et *Paraburkholderia*) adaptés aux conditions édaphiques (métallifères et volcano-sédimentaires) et (iii) la mise en évidence de certains flux d'ETM entre le sol et les tissus internes des nodules, indiquant une potentielle gestion des ETM au niveau des nodules : e.g. une corrélation significative entre les teneurs en nickel du sol et les teneurs de nickel dans les parois des nodules ($P < 0,05$; $r = 0,78$) et entre le nickel des parois des nodules et le nickel des tissus internes des nodules ($P < 0,05$; $r = 0,73$).

L'ensemble des données obtenues durant ces travaux de thèse apporte des éléments permettant d'étayer l'hypothèse générale que la symbiose fixatrice d'azote contribuerait de manière significative dans l'adaptation d'*Acacia spirorbis* à des sols contrastés. Ces éléments permettraient de proposer la légumineuse *Acacia spirorbis* subsp. *spirorbis* endémique de Nouvelle-Calédonie en tant que plante modèle afin d'étudier la contribution des microorganismes dans l'adaptation d'une plante à des contraintes édaphiques variées, notamment à de fortes concentrations en éléments traces métalliques.

D'un point de vue de la recherche fondamentale, la caractérisation génétique de la population d'*Acacia spirorbis* en Nouvelle-Calédonie apporterait des précisions concernant le trait endémique de cette espèce. De plus, cette approche permettrait de valider/infirmer une hypothèse où les populations naturelles d'*A. spirorbis* présenteraient des écotypes distincts en fonction (i) des différents types de sols (calcaires, métallifère et volcano-sédimentaires) et (ii) de la localisation dans l'archipel (Grande Terre et îles Loyautés). L'adaptation de la plante aux contraintes édaphiques pourrait également être d'origine génétique. De ce fait, ces données permettraient de mieux distinguer les contributions respectives des microorganismes et de la génétique de la plante dans son adaptation à des sols aux contraintes édaphiques variées.

De même, la contribution des rhizobia dans la tolérance aux éléments traces métalliques chez *A. spirorbis* peut être renforcée en effectuant des expériences complémentaires en conditions contrôlées. A partir de souches sauvages de *Bradyrhizobium* et de *Paraburkholderia* isolées de nodules d'*A. spirorbis*, la première étape consisterait à obtenir des rhizobia mutés au niveau de gènes marqueurs de la tolérance aux ETM, tels que les gènes *cnrA* et *nreB*. Les rhizobia sauvages et mutants dont la perte de la tolérance métallique aurait été vérifiée, seraient ensuite inoculés sur de jeunes plants d'*A. spirorbis* dans des conditions de stress métallique, notamment par l'ajout de nickel à des concentrations croissantes (les gènes *cnrA* et *nreB* étant spécifiques à la prise en charge de cet élément trace métallique). Si des différences significatives de développement entre des plants inoculés avec des

souches sauvages et mutantes étaient détectées en présence de nickel, alors cela montrerait que les gènes de tolérances aux métaux *cnrA* et *nreB* présents chez les rhizobia sont bien impliqués dans l'adaptation d'*A. spirorbis* à une contrainte nickélique.

Par complémententation, il serait possible de réintroduire les gènes de la tolérance aux ETM dans les rhizobia mutés et la dernière étape consisterait à vérifier si l'inoculation de ces nouveaux mutants complémentés sur des jeunes plants d'*A. spirorbis* en présence de nickel rétablirait le phénotype originel obtenu avec l'inoculation de souches sauvages. Ces expériences confirmeraient la contribution des rhizobia dans l'adaptation de la plante aux contraintes métalliques du sol.

D'un point de vue recherche appliquée, *Acacia spirorbis* peut être utilisé dans des processus de restauration écologique d'anciens sites miniers. Des essais de restauration ont déjà été réalisés et rapportent des résultats positifs quant à l'utilisation d'*A. spirorbis*. Néanmoins, ces processus de restauration prennent peu en compte le compartiment microbien du sol. Pourtant, ces travaux de thèse suggèrent que les rhizobia du sol contribuent de manière significative au développement d'*A. spirorbis*, notamment dans des sols métallifères. De ce fait, la restauration de sites miniers pourrait être optimisée en utilisant des rhizobia associés à *A. spirorbis*. Les rhizobia compatibles avec *A. spirorbis* sont peut-être déjà naturellement présents dans les sites miniers à restaurer (cela reste à démontrer) mais il est possible que leur abondance ne soit pas suffisante pour une opération de restauration demandant une production rapide de résultats. Une solution proposée pour accélérer le processus de restauration serait d'intervenir dans les premiers stades de développement de la plante par l'ajout d'un inoculum bactérien contenant des rhizobia adaptés aux sols métallifères et compatibles avec *Acacia spirorbis*.

Bibliographie

8. Bibliographie

- Abdel-Wahab AM, Zahran HH. 1981.** Effects of salt stress on nitrogenase activity and growth of four legumes. *Biologia Plantarum* **23** : 16.
- Aber JD, Nadelhoffer KJ, Steudler P, Melillo JM. 1989.** Nitrogen saturation in northern forest ecosystems excess nitrogen from fossil fuel combustion may stress the biosphere. *BioScience* **39** : 378–386.
- Adjers G, Hadi TS. 1993.** Acacias in agroforestry. In : Acacias for rural, industrial and environmental development. Bangkok, Thailand : FAO forestry Research Programme for Asia and the Pacific, 134–143.
- Ahmad E, Zaidi A, Khan MS, Oves M. 2012.** Heavy metal toxicity to symbiotic nitrogen-fixing microorganism and host legumes. In : Toxicity of heavy metals to legumes and bioremediation. Springer, Vienna, 29–44.
- Allen ON, Allen EK. 1936.** Root nodule bacteria of some tropical leguminous plants : I. Cross-inoculation studies with *Vigna sinensis* L. *Soil Science* **42** : 61–77.
- Allen ON, Allen EK. 1981.** *The Leguminosae. A source book of characteristics, uses and nodulation.* Madison, WI : University of Wisconsin Press.
- Amir H, Pineau R. 1998.** Influence of plants and cropping on microbiological characteristics of some New Caledonian ultramafic soils. *Australian journal of soil research* **36** : 457–471.
- Andrews M, James EK, Sprent JI, Boddey RM, Gross E, Fabio Bueno dos Reis F.B. 2011.** Nitrogen fixation in legumes and actinorhizal plants in natural ecosystems : values obtained using ¹⁵N natural abundance. *Plant Ecology & Diversity* **4** : 131–140.
- Appunu C, N'Zoue A, Laguerre G. 2008.** Genetic diversity of native bradyrhizobia isolated from soybeans (*Glycine max* L.) in different agricultural-ecological-climatic regions of India. *Applied and Environmental Microbiology* **74** : 5991–5996.
- Arason GJ. 1996.** Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. *Fish & Shellfish Immunology* **6** : 277–289.
- Arora NK, Khare E, Singh S, Maheshwari DK. 2009.** Effect of Al and heavy metals on enzymes of nitrogen metabolism of fast and slow growing rhizobia under *ex planta* conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **26** : 811–816.
- Ashraf M, Athar HR, Harris PJC, Kwon TR. 2008.** Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. In : Advances in Agronomy. Academic Press, 45–110.
- Azani N, Babineau M, Bailey CD, Banks H, Barbosa AR, Pinto RB, Boatwright JS, Borges LM, Brown GK, Bruneau A, et al. 2017.** A new subfamily classification of the *Leguminosae* based on a taxonomically comprehensive phylogeny The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). *Taxon* **66** : 44–77.
- Ba S, Willems A, de Lajudie P, Roche P, Jeder H, Quatrini P, Neyra M, Ferro M, Promé J-C, Gillis M, et al. 2002.** Symbiotic and taxonomic diversity of rhizobia isolated from *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* in Africa. *Systematic and Applied Microbiology* **25** : 130–145.

Barnet Y, Catt P, Hearne D. 1985. Biological nitrogen fixation and root-nodule bacteria (*Rhizobium* sp. and *Bradyrhizobium* sp.) In two rehabilitating sand dune areas planted with *Acacia* spp. *Australian Journal of Botany* **33** : 595–610.

Barnett MJ, Fisher RF, Jones T, Komp C, Abola AP, Barloy-Hubler F, Bowser L, Capela D, Galibert F, Gouzy J, et al. 2001. Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98** : 9883–9888.

de Bary A. 1879. *Die Erscheinung der Symbiose : Vortrag*. Strassburg : Verlag von Karl J. Trübner.

Bavard D. 1989. Forêt et filière-bois en Nouvelle-Calédonie. *Revue Forestière Française* **41** : 231–244.

Beijerinck MW. 1888. Cultur des *Bacillus radicolica* aus den Knöllchen. *Bot. Ztg.* **46** : 740–750.

Berg B, Ekbohm G, Söderström B, Staaf H. 1991. Reduction of decomposition rates of scots pine needle litter due to heavy-metal pollution. *Water, Air, and Soil Pollution* **59** : 165–177.

Beukes CW, Boshoff F, Phalane FL, Venter SN, Steenkamp ET. 2018. Alpha- and beta-rhizobia nodulate *Vachellia karroo* in South Africa. *South African Journal of Botany* **115** : 279–280.

Beukes CW, Palmer M, Manyaka P, Chan WY, Avontuur JR, van Zyl E, Huntemann M, Clum A, Pillay M, Palaniappan K, et al. 2017. Genome data provides high support for generic boundaries in *Burkholderia sensu lato*. *Frontiers in Microbiology* **8**.

Bielen A, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A. 2013. The influence of metal stress on the availability and redox state of ascorbate, and possible interference with its cellular functions. *International Journal of Molecular Sciences* **14** : 6382–6413.

Bland JM, Altman DG. 1995. Multiple significance tests : the Bonferroni method. *BMJ : British Medical Journal* **310** : 170.

Boddey RM, Peoples MB, Palmer B, Dart PJ. 2000. Use of the ¹⁵N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **57** : 235–270.

Bontemps C, Elliott GN, Simon MF, Dos Reis Júnior FB, Gross E, Lawton RC, Neto NE, de Fátima Loureiro M, De Faria SM, Sprent JI, et al. 2010. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. *Molecular Ecology* **19** : 44–52.

Bonvallet J, Gay J-C, Habert E. 2012. *Atlas de la Nouvelle-Calédonie*. Marseille : Institut de Recherche pour le Développement.

Bordeleau LM, Prévost D. 1994. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant and Soil* **161** : 115–125.

Bose J, Babourina O, Rengel Z. 2011. Role of magnesium in alleviation of aluminium toxicity in plants. *Journal of Experimental Botany* **62** : 2251–2264.

Bouchenak-Khelladi Y, Maurin O, Hurter J, van der Bank M. 2010. The evolutionary history and biogeography of *Mimosoideae* (*Leguminosae*) : an emphasis on African acacias. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **57** : 495–508.

Bouchet P, Jaffre T, Veillon J-M. 1995. Plant extinction in New Caledonia : protection of sclerophyll forests urgently needed. *Biodiversity & Conservation* **4** : 415–428.

Bournaud C, de Faria SM, dos Santos JMF, Tisseyre P, Silva M, Chaintreuil C, Gross E, James EK, Prin Y, Moulin L. 2013. *Burkholderia* species are the most common and preferred nodulating symbionts of the *Piptadenia* group (tribe *Mimoseae*). *PLoS One* **8** : e63478.

Brewin NJ. 2004. Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Critical reviews in plant sciences*.

Brockwell J. 1980. Experiments with crop and pasture legumes - principles and practice. *Experiments with crop and pasture legumes - principles and practice* : 417–488.

Brockwell J., Bottomley PJ, Thies JE. 1995. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility : a critical assessment. *Plant and Soil* **174** : 143-180.

Brockwell J, Pilka A, Holliday RA, Brockwell J, Pilka A, Holliday RA. 1991. Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils in central New South Wales. *Animal Production Science* **31** : 211–219.

Brooks R. 1988. Serpentine and its vegetation. A multidisciplinary approach. *Brittonia* **40** : 268–268.

Brown P, Minges G. 1916. The effect of some manganese salts on ammonification and nitrification. *Soil Science* **1** : 67–85.

Brown GK, Murphy DJ, Kidman J, Ladiges PY. 2012. Phylogenetic connections of phyllodinous species of *Acacia* outside Australia are explained by geological history and human-mediated dispersal. *Australian Systematic Botany* **25** : 390–403.

Brown GK, Murphy DJ, Ladiges PY. 2011. Relationships of the Australo-Malesian genus *Paraserianthes* (*Mimosoideae* : *Leguminosae*) identifies the sister group of *Acacia sensu stricto* and two biogeographical tracks. *Cladistics* **27** : 380–390.

Brown GK, Murphy DJ, Miller JT, Ladiges PY. 2008. *Acacia* s.s. and its relationship among tropical legumes, tribe *Ingeae* (*Leguminosae* : *Mimosoideae*). *Systematic Botany* **33** : 739–751.

Buchanan RE. 1926. What names should be used for the organisms producing nodules on the roots of leguminous plants? *Proceedings of the Iowa Academy of Science* : 81–90.

Busse MD, Bottomley PJ. 1989. Growth and nodulation responses of *Rhizobium meliloti* to water stress induced by permeating and nonpermeating solutes. *Applied and Environmental Microbiology* **55** : 2431–2436.

Caldwell BE, Weber DF. 1970. Distribution of *Rhizobium japonicum* serogroups in soybean nodules as affected by planting dates 1. *Agronomy Journal* **62** : 12–14.

Corpet F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* **16** : 10881–10890.

Carvalho V, Tomaz M, Amaral DC, Guilherme LRG, Aarts MGM. 2013. *Gomphrena claussenii*, the first South-American metallophyte species with indicator-like Zn and Cd accumulation and extreme metal tolerance. *Frontiers in Plant Science* **4**.

Casida LE. 1982. *Ensifer adhaerens* gen. nov., sp. nov. : a bacterial predator of bacteria in soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **32** : 339–345.

Chahboune R, Carro L, Peix A, Barrijal S, Velázquez E, Bedmar EJ. 2011. *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61** : 2922–2927.

- Chaintreuil C, Rigault F, Moulin L, Jaffré T, Fardoux J, Giraud E, Dreyfus B, Bailly X. 2007.** Nickel resistance determinants in *Bradyrhizobium* strains from nodules of the endemic New Caledonia legume *Serianthes calycina*. *Applied and Environmental Microbiology* **73** : 8018–8022.
- Chaintreuil C, Rivallan R, Bertioli DJ, Klopp C, Gouzy J, Courtois B, Leleux P, Martin G, Rami J-F, Gully D, et al. 2016.** A gene-based map of the Nod factor-independent *Aeschynomene evenia* sheds new light on the evolution of nodulation and legume genomes. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes* **23** : 365–376.
- Chang YL, Wang JY, Wang ET, Liu HC, Sui XH, Chen WX. 2011.** *Bradyrhizobium lablabi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lablab purpureus* and *Arachis hypogaea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61** : 2496–2502.
- Chappill JA, Maslin BR. 1995.** ‘A phylogenetic assesment of Tribe *Acacieae*’. In : Crisp MD, Doyle JJ, eds. *Advances in legume systematics, part 7. Phylogeny*. UK : Royal Botanic Gardens, Kew, 77–99.
- Chee W., Sundram J, Date RA, Roughley RJ. 1989.** Nodulation of *Leucaena leucocephala* in acid soils of peninsular Malaysia. *Tropical Grasslands* **23** : 171–178.
- Chen W-M, de Faria SM, Straliotto R, Pitard RM, Simões-Araújo JL, Chou J-H, Chou Y-J, Barrios E, Prescott AR, Elliott GN, et al. 2005.** Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa*-nodulating strains from South America. *Applied and Environmental Microbiology* **71** : 7461–7471.
- Chen W-M, Moulin L, Bontemps C, Vandamme P, Béna G, Boivin-Masson C. 2003.** Legume symbiotic nitrogen fixation by beta-proteobacteria is widespread in nature. *Journal of Bacteriology* **185** : 7266–7272.
- Chen WX, Yan GH, Li JL. 1988.** Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **38** : 392–397.
- Chodak M, Gołębiewski M, Morawska-Płoskonka J, Kuduk K, Niklińska M. 2013.** Diversity of microorganisms from forest soils differently polluted with heavy metals. *Applied Soil Ecology* **64** : 7–14.
- Choi H-K, Mun J-H, Kim D-J, Zhu H, Baek J-M, Mudge J, Roe B, Ellis N, Doyle J, Kiss GB, et al. 2004.** Estimating genome conservation between crop and model legume species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101** : 15289–15294.
- Coughtrey PJ, Jones CH, Martin MH, Shales SW. 1979.** Litter accumulation in woodlands contaminated by Pb, Zn, Cd and Cu. *Oecologia* **39** : 51–60.
- Csonka LN, Hanson AD. 1991.** Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annual Review of Microbiology* **45** : 569–606.
- Czernic P, Gully D, Cartieaux F, Moulin L, Guefrachi I, Patrel D, Pierre O, Fardoux J, Chaintreuil C, Nguyen P, et al. 2015.** Convergent evolution of endosymbiont differentiation in Dalbergioid and inverted repeat-lacking clade legumes mediated by nodule-specific cysteine-rich peptides. *Plant Physiology* **169** : 1254–1265.
- Dangeard P-A. 1926.** *Recherches sur les tubercules radicaux des Légumineuses*. Paris, France : Du botaniste.

Dary M, Chamber-Pérez MA, Palomares AJ, Pajuelo E. 2010. ‘*In situ*’ phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *Journal of Hazardous Materials* **177** : 323–330.

Date RA, Halliday J. 1987. Collection, isolation, cultivation and maintenance of rhizobia. In : Symbiotic Nitrogen Fixation Technology. New York: Marcel Dekker Incorporated, 1–27.

De Meyer SE, Cnockaert M, Ardley JK, Van Wyk B-E, Vandamme PA, Howieson JG. 2014. *Burkholderia dilworthii* sp. nov., isolated from *Lebeckia ambigua* root nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64** : 1090–1095.

Debellé F, Plazenet C, Roche P, Pujol C, Savagnac A, Rosenberg C, Promé JC, Dénarié J. 1996. The NodA proteins of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium tropici* specify the N-acylation of Nod factors by different fatty acids. *Molecular Microbiology* **22** : 303–314.

Delamuta JRM, Ribeiro RA, Araújo JLS, Rouws LFM, Zilli JÉ, Parma MM, Melo IS, Hungria M. 2016. *Bradyrhizobium stylosanthis* sp. nov., comprising nitrogen-fixing symbionts isolated from nodules of the tropical forage legume *Stylosanthes* spp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **66** : 3078–3087.

Delamuta JRM, Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, Parma MM, Melo IS, Martínez-Romero E, Hungria M. 2015. *Bradyrhizobium tropiciagri* sp. nov. and *Bradyrhizobium embrapense* sp. nov., nitrogen-fixing symbionts of tropical forage legumes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **65** : 4424–4433.

Delgado MJ, Garrido JM, Ligeró F, Lluch C. 1993. Nitrogen fixation and carbon metabolism by nodules and bacteroids of pea plants under sodium chloride stress. *Physiologia Plantarum* **89** : 824–829.

Delgado MJ, Ligeró F, Lluch C. 1994. Effects of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba-bean, common bean and soybean plants. *Soil Biology and Biochemistry* **26** : 371–376.

Dénarié J, Debellé F, Promé JC. 1996. *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors : signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry* **65** : 503–535.

Dereeper A, Audic S, Claverie J-M, Blanc G. 2010. BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC evolutionary biology* **10** : 8.

Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard J-F, Guindon S, Lefort V, Lescot M, et al. 2008. Phylogeny.fr : robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research* **36** : W465-469.

Diem HG, Gauthier D, Dommergues YR. 2011. The isolation of *Frankia* from nodules of *Casuarina*. *Canadian Journal of Microbiology* **28** : 526–530.

Diouf D, Samba-Mbaye R, Lesueur D, Ba AT, Dreyfus B, De Lajudie P, Neyra M. 2007. Genetic diversity of *Acacia seyal* Del. rhizobial populations indigenous to Senegalese soils in relation to salinity and pH of the sampling sites. *Microbial Ecology* **54** : 553–566.

Dobert RC, Breil BT, Triplett EW. 1994. DNA sequence of the common nodulation genes of *Bradyrhizobium elkanii* and their phylogenetic relationship to those of other nodulating bacteria. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **7** : 564–572.

Dragišić Maksimović J, Mojović M, Maksimović V, Römheld V, Nikolic M. 2012. Silicon ameliorates manganese toxicity in cucumber by decreasing hydroxyl radical accumulation in the leaf apoplast. *Journal of Experimental Botany* **63** : 2411–2420.

- Dreyfus BL, Dommergues YR. 1981.** Nodulation of *Acacia* species by fast- and slow-growing tropical strains of *Rhizobium*. *Applied and Environmental Microbiology* **41** : 97–99.
- Ducouso M, Galiana A, Houlès A, Prin Y, Hannibal L, Jourand P, Klonowska A, Carriconde F, Fritsch E, Juillot F, et al. 2014.** *Acacia spirorbis* a model plant to study the contribution of symbiotic root microorganisms in plant adaptation to soil constraints: news and prospects. In : *Acacia 2014 "Sustaining the Future of Acacia Plantation Forestry"*, Hue - Viet Nam.
- Durán D, Rey L, Mayo J, Zúñiga-Dávila D, Imperial J, Ruiz-Argüeso T, Martínez-Romero E, Ormeño-Orrillo E. 2014a.** *Bradyrhizobium paxllaeri* sp. nov. and *Bradyrhizobium icense* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64** : 2072–2078.
- Durán D, Rey L, Navarro A, Busquets A, Imperial J, Ruiz-Argüeso T. 2014b.** *Bradyrhizobium valentinum* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lupinus mariae-josephae*, a lupine endemic of basic-lime soils in Eastern Spain. *Systematic and Applied Microbiology* **37** : 336–341.
- Eckhardt MM, Baldwin IL, Fred EB. 1931.** Studies of the root-nodule organism of lupinus 1. *Journal of Bacteriology* **21** : 273–285.
- El-Hamdaoui A, Redondo-Nieto M, Torralba B, Rivilla R, Bonilla I, Bolaños L. 2003.** Influence of boron and calcium on the tolerance to salinity of nitrogen-fixing pea plants. *Plant and Soil* **251** : 93–103.
- Elliott GN, Chen W-M, Bontemps C, Chou J-H, Young JPW, Sprent JI, James EK. 2007.** Nodulation of *Cyclopia* spp. (*Leguminosae*, *Papilionoideae*) by *Burkholderia tuberum*. *Annals of Botany* **100** : 1403–1411.
- Elliott GN, Chou J-H, Chen W-M, Bloemberg GV, Bontemps C, Martínez-Romero E, Velázquez E, Young JPW, Sprent JI, James EK. 2009.** *Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of *Mimosa*, particularly under N-limited conditions. *Environmental Microbiology* **11** : 762–778.
- Emamverdian A, Ding Y, Mokhberdoran F, Xie Y. 2015.** Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *The Scientific World Journal* : 18.
- Erismán JW, Sutton MA, Galloway J, Klimont Z, Winiwarter W. 2008.** How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nature Geoscience* **1** : 636–639.
- Estrada-de Los Santos P, Palmer M, Chávez-Ramírez B, Beukes C, Steenkamp ET, Briscoe L, Khan N, Maluk M, Lafos M, Humm E, et al. 2018.** Whole genome analyses suggests that *Burkholderia sensu lato* contains two additional novel genera (*Mycetohabitans* gen. nov., and *Trinickia* gen. nov.): Implications for the evolution of diazotrophy and nodulation in the *Burkholderiaceae*. *Genes* **9**.
- Fagg CW, Stewart JL. 1994.** The value of *Acacia* and *Prosopis* in arid and semi-arid environments. *Journal of Arid Environments* **27** : 3–25.
- de Faria SM, Lewis GP, Sprent JI, Sutherland JM. 1989.** Occurrence of nodulation in the *Leguminosae*. *New Phytologist* **111** : 607–619.
- Farrell TP, Ashton DH. 1978.** Population studies on *Acacia melanoxylon* R. Br. I. Variation in seed and vegetative characteristics. *Australian Journal of Botany* **26** : 365–379.
- Festin ES, Tigabu M, Chileshe MN, Syampungani S, Odén PC. 2018.** Progresses in restoration of post-mining landscape in Africa. *Journal of Forestry Research* : 1–16.

Fierer N, Jackson RB. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103** : 626–631.

Fowler D, Coyle M, Skiba U, Sutton MA, Cape JN, Reis S, Sheppard LJ, Jenkins A, Grizzetti B, Galloway JN, et al. 2013. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Phil. Trans. R. Soc. B* **368** : 20130164.

Frank B. 1889. Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* **7** : 332–346.

Frey-Klett P, Chavatte M, Clausse M-L, Courrier S, Le Roux C, Raaijmakers J, Martinotti MG, Pierrat J-C, Garbaye J. 2005. Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *The New Phytologist* **165** : 317–328.

Fuhrmann M, Hennecke H. 1984. *Rhizobium japonicum* nitrogenase Fe protein gene (*nifH*). *Journal of Bacteriology* **158** : 1005–1011.

Gadd GM. 1990. Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experientia* **46** : 834–840.

Galiana A, Balle P, N’Guessan Kanga A, Domenach AM. 2002. Nitrogen fixation estimated by the ¹⁵N natural abundance method in *Acacia mangium* Willd. inoculated with *Bradyrhizobium* sp. and grown in silvicultural conditions. *Soil Biology and Biochemistry* **34** : 251–262.

Galloway JN, Aber JD, Erisman JW, Seitzinger SP, Howarth RW, Cowling EB, Cosby BJ. 2003. The nitrogen cascade. *BioScience* **53** : 341–356.

Gaunt MW, Turner SL, Rigottier-Gois L, Lloyd-Macgilp SA, Young JP. 2001. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51** : 2037–2048.

George E, Marschner H, Jakobsen I. 1995. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in uptake of phosphorus and nitrogen from soil. *Critical Reviews in Biotechnology* **15** : 257–270.

Georgiev GI, Atkins CA. 1993. Effects of salinity on N₂ fixation, nitrogen metabolism and export and diffusive conductance of cowpea root nodules. *Symbiosis (USA)* **15** : 239–255.

Giller KE, Witter E, Mcgrath SP. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils : a review. *Soil Biology and Biochemistry* **30** : 1389–1414.

Girard ML, Flores M, Brom S, Romero D, Palacios R, Dávila G. 1991. Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Journal of Bacteriology* **173** : 2411–2419.

Giraud E, Moulin L, Vallenet D, Barbe V, Cytryn E, Avarre J-C, Jaubert M, Simon D, Cartieaux F, Prin Y, et al. 2007. Legumes symbioses : absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science (New York, N.Y.)* **316** : 1307–1312.

Goethals K, Gao M, Tomekpe K, Van Montagu M, Holsters M. 1989. Common nodABC genes in Nod locus 1 of *Azorhizobium caulinodans* : nucleotide sequence and plant-inducible expression. *Molecular & general genetics* : *MGG* **219** : 289–298.

Gonin M, Gensous S, Lagrange A, Ducouso M, Amir H, Jourand P. 2013. Rhizosphere bacteria of *Costularia* spp. from ultramafic soils in New Caledonia : diversity, tolerance to extreme edaphic conditions, and role in plant growth and mineral nutrition. *Canadian Journal of Microbiology* **59** : 164–174.

Gope P. 2005. *La parenthèse*. Nouméa, Nouvelle-Calédonie : Ultimo Group Limited.

- Govindarajulu M, Pfeffer PE, Jin H, Abubaker J, Douds DD, Allen JW, Bücking H, Lammers PJ, Shachar-Hill Y. 2005.** Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* **435** : 819–823.
- Graham PH, Vance CP. 2003.** Legumes : importance and constraints to greater use. *Plant Physiology* **131** : 872–877.
- Grangeteau C, Ducouso M, Fritsch E, Juillot F, Jourand P, Acherar S, Lebrun M, Klonowska A. 2012.** Diversity of nitrogen fixing bacteria associated to the New Caledonian ubiquitous tree *Acacia spirorbis*. In : Soil management as a determinant of microbial diversity and function, European Geoscience Union, General assembly, Vienna - Austria.
- Griffin AR, Midgley SJ, Bush D, Cunningham PJ, Rinaudo AT. 2011.** Global uses of Australian acacias – recent trends and future prospects. *Diversity and Distributions* **17** : 837–847.
- Grönemeyer JL, Chimwamurombe P, Reinhold-Hurek B. 2015.** *Bradyrhizobium subterraneum* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium from root nodules of groundnuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **65** : 3241–3247.
- Grönemeyer JL, Hurek T, Büniger W, Reinhold-Hurek B. 2016.** *Bradyrhizobium vignae* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from effective nodules of *Vigna* and *Arachis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **66** : 62–69.
- Grönemeyer JL, Kulkarni A, Berkelmann D, Hurek T, Reinhold-Hurek B. 2014.** Rhizobia indigenous to the Okavango region in sub-Saharan Africa : diversity, adaptations, and host specificity. *Applied and Environmental Microbiology* **80** : 7244–7257.
- Guentas L, Gensous S, Cavaloc Y, Ducouso M, Amir H, De Georges de Ledenon B, Moulin L, Jourand P. 2016.** *Burkholderia novacaledonica* sp. nov. and *B. ultramafica* sp. nov. isolated from roots of *Costularia* spp. pioneer plants of ultramafic soils in New Caledonia. *Systematic and Applied Microbiology* **39** : 151–159.
- Guindon S, Lethiec F, Duroux P, Gascuel O. 2005.** PHYML Online--a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Research* **33** : W557-559.
- Gulash M, Ames P, Larosiliere RC, Bergman K. 1984.** Rhizobia are attracted to localized sites on legume roots. *Applied and Environmental Microbiology* **48** : 149–152.
- Habish HA. 1970.** Effect of certain soil conditions on nodulation of *Acacia* spp. *Plant and Soil* **33** : 1–6.
- Haferburg G, Kothe E. 2007.** Microbes and metals : interactions in the environment. *Journal of Basic Microbiology* **47** : 453–467.
- Hamdi YA. 1971.** Soil-water tension and the movement of rhizobia. *Soil Biology and Biochemistry* **3** : 121–126.
- Hamilton SD, Hopmans P, Chalk PM, Smith CJ. 1993.** Field estimation of N₂ fixation by *Acacia* spp. using ¹⁵N isotope dilution and labelling with ³⁵S. *Forest Ecology and Management* **56** : 297–313.
- Hardy RWF, Holsten RD, Jackson EK, Burns RC. 1968.** The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation : laboratory and field evaluation 1. *Plant Physiology* **43** : 1185–1207.
- Harrier LA, Whitty P, Sutherland JM, Sprent JI. 2000.** Pre-infection events in non-nodulating species of african *Acacia*. *African Journal of Ecology* **38** : 8–15.
- Hassan TU, Bano A, Naz I. 2017.** Alleviation of heavy metals toxicity by the application of plant growth promoting rhizobacteria and effects on wheat grown in saline sodic field. *International Journal of Phytoremediation* **19** : 522–529.

- Hassan MM, Eissa RA. 2013.** Molecular characterization of salt tolerant rhizobial strains induced by gamma rays using RAPD markers. *New York Science Journal* **6** : 36–41.
- Herrmann L, Lesueur D, Giamperi F. 2011.** Chapter 26 : Collecting symbiotic bacteria and fungi. In : Guarino L, Rao R, Reid R, eds. *Collecting Plant Diversity : Technical Guidelines*. CAB International, 17.
- Hingston FJ, Malajczuk N, Grove TS. 1982.** Acetylene reduction (N₂-Fixation) by Jarrah forest legumes following fire and phosphate application. *Journal of Applied Ecology* **19** : 631–645.
- Högberg P. 1997.** Tansley Review No. 95 ¹⁵N natural abundance in soil-plant systems. *New Phytologist* **137** : 179–203.
- Helene LCF, Delamuta JRM, Ribeiro RA, Ormeño-Orrillo E, Rogel MA, Martínez-Romero E, Hungria M. 2015.** *Bradyrhizobium viridifuturi* sp. nov., encompassing nitrogen-fixing symbionts of legumes used for green manure and environmental services. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **65** : 4441–4448.
- Houlès A. 2017.** Principe de facilitation appliqué à la restauration écologique de sites miniers dégradés. Suivi des communautés ectomycorhiziennes au cours de successions végétales assistées par *Acacia spirorbis*.
- Houlès A, Vincent B, David M, Ducouso M, Galiana A, Juillot F, Hannibal L, Carriconde F, Fritsch E, Jourand P. 2018.** Ectomycorrhizal communities associated with the legume *Acacia spirorbis* growing on contrasted edaphic constraints in New Caledonia. *Microbial Ecology*.
- Hue NV, Silva JA, Uehara G, Hamasaki RT, Uchida R, Bunn P. 1998.** Managing manganese toxicity in former sugarcane soils on Oahu. *Soil and Crop Management* **1**.
- Isaac ME, Harmand J-M, Lesueur D, Lelon J. 2011.** Tree age and soil phosphorus conditions influence N₂-fixation rates and soil N dynamics in natural populations of *Acacia senegal*. *Forest Ecology and Management* **261** : 582–588.
- Ishtiaq S, Mahmood S. 2011.** Phytotoxicity of nickel and its accumulation in tissues of three *Vigna* species at their early growth stages. *Journal of Applied Botany and Food Quality* **84** : 223–223.
- Islam MS, Kawasaki H, Muramatsu Y, Nakagawa Y, Seki T. 2008.** *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **72** : 1416–1429.
- Isnard S, L’huillier L, Rigault F, Jaffré T. 2016.** How did the ultramafic soils shape the flora of the New Caledonian hotspot? *Plant and Soil* : 1–24.
- Izaguirre-Mayoral ML, Sinclair TR. 2005.** Soybean genotypic difference in growth, nutrient accumulation and ultrastructure in response to manganese and iron supply in solution culture. *Annals of Botany* **96** : 149–158.
- Jaffré T. 1993.** The relationship between ecological diversity and floristic diversity in New Caledonia. *Biodiversity Letters* **1** : 82–87.
- Jaffré T, L’Huillier L. 2010.** La végétation des roches ultramafiques ou terrains miniers. In : L’Huillier L, Jaffré T, Wulff A, eds. *Etudes Synthèses. Mines et environnement en Nouvelle Calédonie : les milieux sur substrats ultramafiques et leur restauration*. Païta : IAC, 45–103.
- Jaffré T, Munzinger J, Lowry PP. 2010.** Threats to the conifer species found on New Caledonia’s ultramafic massifs and proposals for urgently needed measures to improve their protection. *Biodiversity and Conservation* **19** : 1485–1502.

Jaffré T, Veillon J-M, Rigault F, Dagostini G, Chazeau J, Bonnet de Larbogne L, Potiaroa T, Jourdan H. 1997. *Impact des feux de brousse sur le milieu naturel en Nouvelle-Calédonie*. Nouméa : ORSTOM.

Jamil M, Zeb S, Anees M, Roohi A, Ahmed I, ur Rehman S, Rha ES. 2014. Role of *Bacillus licheniformis* in phytoremediation of nickel contaminated soil cultivated with rice. *International Journal of Phytoremediation* **16** : 554–571.

Jaramillo PMD, Guimarães AA, Florentino LA, Silva KB, Nóbrega RSA, Moreira FM de S. 2013. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems in the Western Amazon. *Scientia Agricola* **70** : 397–404.

Jenkins MB, Virginia RA, Jarrell WM. 1989. Ecology of fast-growing and slow-growing mesquite-nodulating rhizobia in Chihuahuan and Sonoran desert ecosystems. *Soil Science Society of America Journal* **53** : 543–549.

Jensen HL. 1942. Nitrogen fixation in leguminous plants. I. General characters of root-nodule bacteria isolated from species of *Medicago* and *Trifolium* in Australia. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* **67** : 98–108.

Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME, Walker GC. 2007. How rhizobial symbionts invade plants : the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nature Reviews. Microbiology* **5** : 619–633.

Jordan DC. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **32** : 136–139.

Joubert C. 2003. Rhizobia associated with Australian *Acacia* species (*Acacia mearnsii*, *Acacia dealbata* and *Acacia decurrens*) in South Africa as determined by sodium dodecyl-sulphate polyacrylamide gel electrophoresis.

Jourand P, Ducouso M, Loulergue-Majorel C, Hannibal L, Santoni S, Prin Y, Lebrun M. 2010. Ultramafic soils from New Caledonia structure *Pisolithus albus* in ecotype. *FEMS Microbiology Ecology* **72** : 238–249.

Jourand P, Giraud E, Béna G, Sy A, Willems A, Gillis M, Dreyfus B, de Lajudie P. 2004. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylophilic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54** : 2269–2273.

Jourand P, Hannibal L, Majorel C, Mengant S, Ducouso 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.

Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes. 2008. The genus name *Sinorhizobium* Chen *et al.* 1988 is a later synonym of *Ensifer* Casida 1982 and is not conserved over the latter genus name, and the species name ‘*Sinorhizobium adhaerens*’ is not validly published. Opinion 84. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58** : 1973.

Kabata-Pendias A. 1993. Behavioural properties of trace metals in soils. *Applied Geochemistry* **8**: 3–9.

Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Minamisawa K, Uchiumi T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Iriguchi M, Kawashima K, *et al.* 2002. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic

bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* **9** : 189–197.

Kape R, Parniske M, Werner D. 1991. Chemotaxis and *nod* gene activity of *Bradyrhizobium japonicum* in response to hydroxycinnamic acids and isoflavonoids. *Applied and Environmental Microbiology* **57** : 316–319.

Käss E, Wink M. 1996. Molecular evolution of the leguminosae : Phylogeny of the three subfamilies based on *rbcL*-sequences. *Biochemical Systematics and Ecology* **24** : 365–378.

Kaye JP, Hart SC. 1997. Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Trends in Ecology & Evolution* **12** : 139–143.

Kazakou E, Dimitrakopoulos PG, Baker AJM, Reeves RD, Troumbis AY. 2008. Hypotheses, mechanisms and trade-offs of tolerance and adaptation to serpentine soils : from species to ecosystem level. *Biological Reviews* **83** : 495–508.

Kessel C van, Roskoski JP. 1981. Nodulation and N₂ fixation by *Inga jinicuil*, a woody legume in coffee plantations. *Plant and Soil* **59** : 207–215.

Khan MR, Khan MM. 2010. Effect of varying concentration of nickel and cobalt on the plant growth and yield of chickpea. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* **4** : 1036–1046.

Klonowska A, Chaintreuil C, Tisseyre P, Miché L, Melkonian R, Ducouso M, Laguerre G, Brunel B, Moulin L. 2012. Biodiversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts (*Cupriavidus taiwanensis*, *Rhizobium mesoamericanum*) in New Caledonia and their adaptation to heavy metal-rich soils. *FEMS Microbiology Ecology* **81** : 1–18.

Krishnan HB, Pueppke SG. 1991. Sequence and analysis of the *nodABC* region of *Rhizobium fredii* USDA257, a nitrogen-fixing symbiont of soybean and other legumes. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **4** : 512–520.

Krzaklewski W, Pietrzykowski M. 2002. Selected physico-chemical properties of zinc and lead ore tailings and their biological stabilisation. *Water, Air, and Soil Pollution* **141** : 125–141.

Kuykendall LD, Saxena B, Devine TE, Udell SE. 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology* **38** : 501–505.

Lafay B, Burdon JJ. 2001. Small-subunit rRNA genotyping of Rhizobia nodulating Australian *Acacia* spp. *Applied and Environmental Microbiology* **67** : 396–402.

Laguerre G, Nour SM, Macheret V, Sanjuan J, Drouin P, Amarger N. 2001. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology (Reading, England)* **147** : 981–993.

de Lajudie P, Willems A, Nick G, Moreira F, Molouba F, Hoste B, Torck U, Neyra M, Collins MD, Lindström K, et al. 1998. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48 Pt 2** : 369–382.

Lal B, Khanna S. 1994. Selection of salt-tolerant *Rhizobium* isolates of *Acacia nilotica*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **10** : 637–639.

Leary JK, Singleton PW, Scowcroft PG, Borthakur D. 2006. Symbiotic diversity in the cosmopolitan genus *Acacia*. *Symbiosis* **4** : 107–117.

Lefèvre T, Renaud F, Selosse M-A, Thomas F, Bernstein C, Broennimann O, Charlat S, De Mazancourt C, De Meeüs T, Fleury F, *et al.* 2010. Evolution des interactions entre espèces. In : F. Thomas TL& MR, ed. *Biologie évolutive*. De Boeck, 533–616.

Le Roux C, Tentchev D, Prin Y, Goh D, Japarudin Y, Perrineau M-M, Duponnois R, Domergue O, Lajudie P de, Galiana A. 2009. Bradyrhizobia nodulating the *Acacia mangium* × *A. auriculiformis* interspecific hybrid are specific and differ from those associated with both parental species. *Applied and Environmental Microbiology* 75 : 7752–7759.

Lewis GP, Schrire BD, MacKinder B, Lock M. 2005. *Legumes of the World*. UK : Royal Botanic Garden, Kew.

Lewis GP, Schrire BD, Mackinder BA, Rico L, Clark R. 2013. A 2013 linear sequence of legume genera set in a phylogenetic context — A tool for collections management and taxon sampling. *South African Journal of Botany* 89 : 76–84.

Lipman CB, Burgess PS. 1914. The effect of copper, zinc, iron and lead salts on ammonification in soils. *University of California Publications in Agricultural Science* 1 : 127–139.

Li JH, Wang ET, Chen WF, Chen WX. 2008. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biology and Biochemistry* 40 : 238–246.

Li YH, Wang R, Zhang XX, Young JPW, Wang ET, Sui XH, Chen WX. 2015. *Bradyrhizobium guangdongense* sp. nov. and *Bradyrhizobium guangxiense* sp. nov., isolated from effective nodules of peanut. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65 : 4655–4661.

Lira MA, Nascimento LRS, Fracetto GGM. 2015. Legume-rhizobia signal exchange : promiscuity and environmental effects. *Frontiers in Microbiology* 6.

Liu J, Piñeros MA, Kochian LV. 2014. The role of aluminum sensing and signaling in plant aluminum resistance. *Journal of Integrative Plant Biology* 56 : 221–230.

Liu X, Wei S, Wang F, James EK, Guo X, Zagar C, Xia LG, Dong X, Wang YP. 2012. *Burkholderia* and *Cupriavidus* spp. are the preferred symbionts of *Mimosa* spp. in Southern China. *FEMS Microbiology Ecology* 80 : 417–426.

Lopes-Santos L, Castro DBA, Ferreira-Tonin M, Corrêa DBA, Weir BS, Park D, Ottoboni LMM, Neto JR, Destéfano SAL. 2017. Reassessment of the taxonomic position of *Burkholderia andropogonis* and description of *Robbsia andropogonis* gen. nov., comb. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* 110 : 727–736.

Losfeld G, L’Huillier L, Fogliani B, Jaffré T, Grison C. 2014. Mining in New Caledonia : environmental stakes and restoration opportunities. *Environmental Science and Pollution Research* 22 : 5592–5607.

Lottermoser B. 2010. *Mine wastes : characterization, treatment and environmental impacts*. Berlin Heidelberg : Springer-Verlag.

Lu JK, Dou YJ, Zhu YJ, Wang SK, Sui XH, Kang LH. 2014. *Bradyrhizobium ganzhouense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from *Acacia melanoxylon* R. Br. nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64 : 1900–1905.

Luckow M, Miller JT, Murphy DJ, Livshultz T. 2003. A phylogenetic analysis of the *Mimosoideae* (*Leguminosae*) based on chloroplast DNA sequence data. In : *Advances in legume systematics*, part 10. London : Royal Botanic Gardens, Kew, 197–220.

Ma JF, Ryan PR, Delhaize E. 2001. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science* 6 : 273–278.

- Macphail M, Hill R. 2001.** Fossil record of *Acacia* in Australia : Eocene to Recent. In : Orchard AE, Wilson AJ., eds. Flora of Australia. Melbourne : CSIRO Publishing, 13–29.
- Maier RM. 2015.** Bacterial growth. In : 3rd edition. Environmental microbiology. Elsevier, 728.
- Majorel C, Hannibal L, Ducouso M, Lebrun M, Jourand P. 2014.** Evidence of nickel (Ni) efflux in Ni-tolerant ectomycorrhizal *Pisolithus albus* isolated from ultramafic soil. *Environmental Microbiology Reports* **6** : 510–518.
- Maliszewska W, Dec S, Wierzbicka H, Woźniakowska A. 1985.** The influence of various heavy metal compounds on the development and activity of soil micro-organisms. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological* **37** : 195–215.
- Marchese C. 2015.** Biodiversity hotspots : A shortcut for a more complicated concept. *Global Ecology and Conservation* **3** : 297–309.
- Mariotti A. 1983.** Atmospheric nitrogen is a reliable standard for natural ¹⁵N abundance measurements. *Nature* **303** : 685–687.
- Marsudi NDS, Glenn AR, Dilworth MJ. 1999.** Identification and characterization of fast- and slow-growing root nodule bacteria from South-Western Australian soils able to nodulate *Acacia saligna*. *Soil Biology and Biochemistry* **31** : 1229–1238.
- Martens M, Dawyndt P, Coopman R, Gillis M, De Vos P, Willems A. 2008.** Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies : a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58** : 200–214.
- Maslin BR. 2001.** Introduction to *Acacia*. In : Orchard AE, Wilson AJ., eds. Flora of Australia. Melbourne : Australian Biological Resources Study/CSIRO Publishing, 3–13.
- Maslin BR. 2004.** ‘Classification and phylogeny of *Acacia*’. In : Crespi BJ, Morris DC, Mound LA, eds. Australian Biological Resources Study & Australian National Insect Collection. Evolution of ecological and behavioural diversity : Australian *Acacia* thrips as model organisms. Canberra, Australia.
- Maslin BR. 2008.** Generic and subgeneric names in *Acacia* following retypification of the genus. *Muelleria* **26** : 7–9.
- Maslin BR, Miller JT, Seigler DS. 2003.** Overview of the generic status of *Acacia* (*Leguminosae* : *Mimosoideae*). *Australian Systematic Botany* **16** : 1–18.
- Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J. 2009.** Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes : how many rhizobium recipes ? *Trends in Microbiology* **17** : 458–466.
- Masson-Boivin C, Sachs JL. 2018.** Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia—the roots of a success story. *Current Opinion in Plant Biology* **44** : 7–15.
- McAuliffe C, Chamblee DS, Uribe-Arango H, Woodhouse WW. 1958.** Influence of inorganic nitrogen on nitrogen fixation by legumes as revealed by ¹⁵N. *Agronomy Journal* **50** : 334–337.
- McDonald M., Maslin BR, Butcher PA. 2001.** Utilisation of acacias. In : Orchard AE, Wilson AJ., eds. Flora of Australia. Melbourne : Australian Biological Resources Study/CSIRO Publishing, 30–40.
- McNeill J, Stuessy TF, Turland NJ, Hörandl E. 2005.** XVII International botanical congress : Preliminary mail vote and report of congress action on nomenclature proposals. *Taxon* **54** : 1057–1064.

Mendoza-Soto AB, Naya L, Leija A, Hernández G. 2015. Responses of symbiotic nitrogen-fixing common bean to aluminum toxicity and delineation of nodule responsive microRNAs. *Frontiers in Plant Science* **6** : 587.

Menna P, Barcellos FG, Hungria M. 2009. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59** : 2934–2950.

Menna P, Hungria M. 2011. Phylogeny of nodulation and nitrogen-fixation genes in *Bradyrhizobium* : supporting evidence for the theory of monophyletic origin, and spread and maintenance by both horizontal and vertical transfer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61** : 3052–3067.

Miché L, Moulin L, Chaintreuil C, Contreras-Jimenez JL, Munive-Hernández J-A, Del Carmen Villegas-Hernandez M, Crozier F, Béna G. 2010. Diversity analyses of *Aeschynomene* symbionts in Tropical Africa and Central America reveal that nod-independent stem nodulation is not restricted to photosynthetic bradyrhizobia. *Environmental Microbiology* **12** : 2152–2164.

Miller JT, Bayer RJ. 2001. Molecular phylogenetics of *Acacia* (*Fabaceae* : *Mimosoideae*) based on the chloroplast *MATK* coding sequence and flanking *TRNK* intron spacer regions. *American Journal of Botany* **88** : 697–705.

Miller JT, Murphy DJ, Brown GK, Richardson DM, González-Orozco CE. 2011. The evolution and phylogenetic placement of invasive Australian *Acacia* species. *Diversity and Distributions* **17** : 848–860.

Miller JT, Seigler D. 2012. Evolutionary and taxonomic relationships of *Acacia s.l.* (*Leguminosae* : *Mimosoideae*). *Australian Systematic Botany* **25** : 217–224.

Morat P, Jaffré T, Tronchet F, Munzinger J, Pillon Y, Veillon JM, Chalopin M, Birnbaum P, Rigault F, Dagostini G, et al. 2012. The taxonomic reference base Florical and characteristics of the native vascular flora of New Caledonia. *Adansonia* **34** : 179–221.

Moulin L, Munive A, Dreyfus B, Boivin-Masson C. 2001. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* **411** : 948–950.

Munns R, Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **59** : 651–681.

Murphy D. 2008. A review of the classification of *Acacia* (*Leguminosae*, *Mimosoideae*). *Muellaria* **26** : 10–26.

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403** : 853–858.

Nandasena KG, O'hara GW, Tiwari RP, Howieson JG. 2006. Rapid *in situ* evolution of nodulating strains for *Biserrula pelecinus* L. through lateral transfer of a symbiosis island from the original mesorhizobial inoculant. *Applied and Environmental Microbiology* **72** : 7365–7367.

Ndiaye M, Ganry F. 1997. Variation in the biological N₂ fixation by tree legumes in three ecological zones from the north to the south of Senegal. *Arid Soil Research and Rehabilitation* **11** : 245–254.

New TR. 1984. *A biology of Acacias*. Melbourne ; Oxford : Oxford University Press in association with La Trobe University Press, 153.

Nick G, Jussila M, Hoste B, Niemi RM, Kaijalainen S, de Lajudie P, Gillis M, de Bruijn FJ, Lindström K. 1999a. Rhizobia isolated from root nodules of tropical leguminous trees characterized

using DNA-DNA dot-blot hybridisation and rep-PCR genomic fingerprinting. *Systematic and Applied Microbiology* **22** : 287–299.

Nick G, de Lajudie P, Eardly BD, Suomalainen S, Paulin L, Zhang X, Gillis M, Lindström K. 1999b. *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49 Pt 4** : 1359–1368.

Nygren P, Fernández MP, Harmand J-M, Leblanc HA. 2012. Symbiotic dinitrogen fixation by trees : an underestimated resource in agroforestry systems? *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **94** : 123–160.

Okazaki S, Kaneko T, Sato S, Saeki K. 2013. Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110** : 17131–17136.

Okazaki S, Tittabutr P, Teulet A, Thouin J, Fardoux J, Chaintreuil C, Gully D, Arrighi J-F, Furuta N, Miwa H, et al. 2016. *Rhizobium*-legume symbiosis in the absence of Nod factors : two possible scenarios with or without the T3SS. *The ISME journal* **10** : 64–74.

Oladele EO, Odeigah PGC, Taiwo IA. 2013. The genotoxic effect of lead and zinc on bambara groundnut (*Vigna subterranean*). *African Journal of Environmental Science and Technology* **7** : 9–13.

Oldroyd GED. 2013. Speak, friend, and enter : signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews. Microbiology* **11** : 252–263.

Orchard VA, Cook FJ. 1983. Relationship between soil respiration and soil moisture. *Soil Biology and Biochemistry* **15** : 447–453.

Ott T, van Dongen JT, Günther C, Krusell L, Desbrosses G, Vigeolas H, Bock V, Czechowski T, Geigenberger P, Udvardi MK. 2005. Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current biology* **15** : 531–535.

Ovalle C, Longeri L, Aronson J, Herrera A, Avendaño J. 1996. N₂-fixation, nodule efficiency and biomass accumulation after two years in three Chilean legume trees and *Tagasaste Chamaecytisus proliferus* subsp. *palmensis*. *Plant and Soil* **179** : 131–140.

Ovtsyna AO, Geurts R, Bisseling T, Lugtenberg EJJ, Tikhonovich A, Spaink HP. 1998. Restriction of host range by the sym2 allele of Afghan pea is nonspecific for the type of modification at the reducing terminus of nodulation signals. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **11** : 418–422.

Padilla FM, Pugnaire FI. 2006. The role of nurse plants in the restoration of degraded environments. *Frontiers in Ecology and the Environment* **4** : 196–202.

Pandey P, Kang SC, Maheshwari DK. 2005. Isolation of endophytic plant growth promoting *Burkholderia* sp. MSSP from root nodules of *Mimosa pudica*. *Current Science* **89** : 177–180.

Patriarca EJ, Tatè R, Ferraioli S, Iaccarino M. 2004. Organogenesis of legume root nodules. *International Review of Cytology* **234** : 201–262.

Payne GW, Vandamme P, Morgan SH, Lipuma JJ, Coenye T, Weightman AJ, Jones TH, Mahenthiralingam E. 2005. Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. *Applied and Environmental Microbiology* **71** : 3917–3927.

Pedley L. 1978. A revision of *Acacia* Mill. in Queensland. *Austrobaileya* **1** : 75–234.

Pedley L. 1986. Derivation and dispersal of *Acacia* (*Leguminosae*), with particular reference to Australia, and the recognition of *Senegalia* and *Racosperma*. *Botanical Journal of the Linnean Society* **92** : 219–254.

Peix A, Ramírez-Bahena MH, Velázquez E, Bedmar EJ. 2015. Bacterial associations with legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences* **34** : 17–42.

Pelletier B. 2006. Geology of the New Caledonia region and its implications for the study of the New Caledonian biodiversity. In : Payri C, Richer de Forges B, Colin F, eds. Documents Scientifiques et Techniques : II. Compendium of marine species from New Caledonia : second edition. Nouméa : IRD, 19–32.

Perret X, Staehelin C, Broughton WJ. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64** : 180–201.

Peoples MB, Chalk PM, Unkovich MJ, Boddey RM. 2015. Can differences in ¹⁵N natural abundance be used to quantify the transfer of nitrogen from legumes to neighbouring non-legume plant species ? *Soil Biology and Biochemistry* **87** : 97–109.

Perret X, Staehelin C, Broughton WJ. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64** : 180–201.

Pillon Y, Munzinger J, Amir H, Lebrun M. 2010. Ultramafic soils and species sorting in the flora of New Caledonia. *Journal of Ecology* **98** : 1108–1116.

Postma J, van Veen JA, Walter S. 1989. Influence of different initial soil moisture contents on the distribution and population dynamics of introduced *Rhizobium leguminosarum* biovar *Trifolii*. *Soil Biology and Biochemistry* **21** : 437–442.

Proctor J. 2003. Vegetation and soil and plant chemistry on ultramafic rocks in the tropical Far East. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **6** : 105–124.

Raddad EAY, Salih AA, Fadl MAE, Kaarakka V, Luukkanen O. 2005. Symbiotic nitrogen fixation in eight *Acacia senegal* provenances in dryland clays of the Blue Nile Sudan estimated by the ¹⁵N natural abundance method. *Plant and Soil* **275** : 261–269.

Rae AL, Bonfante-Fasolo P, Brewin NJ. 1992. Structure and growth of infection threads in the legume symbiosis with *Rhizobium leguminosarum*. *The Plant Journal* **2** : 385–395.

Rajkumar M, Vara Prasad MN, Freitas H, Ae N. 2009. Biotechnological applications of serpentine soil bacteria for phytoremediation of trace metals. *Critical Reviews in Biotechnology* **29** : 120–130.

Ramírez-Bahena MH, Peix A, Rivas R, Camacho M, Rodríguez-Navarro DN, Mateos PF, Martínez-Molina E, Willems A, Velázquez E. 2009. *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59** : 1929–1934.

Rasolomampianina R, Bailly X, Fetiariison R, Rabevohitra R, Béna G, Ramaroson L, Raherimandimby M, Moulin L, De Lajudie P, Dreyfus B, et al. 2005. Nitrogen-fixing nodules from rose wood legume trees (*Dalbergia* spp.) endemic to Madagascar host seven different genera belonging to alpha- and beta-Proteobacteria. *Molecular Ecology* **14** : 4135–4146.

Reddy KJ. 2006. Nutrient stress. In : Rao KVM, Raghavendra AS, Reddy KJ, eds. Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants. Springer Netherlands, 187–217.

dos Reis FB, Simon MF, Gross E, Boddey RM, Elliott GN, Neto NE, Loureiro M de F, de Queiroz LP, Scotti MR, Chen W-M, et al. 2010. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. *The New Phytologist* **186** : 934–946.

- Rezai K, Farboodnia T. 2008.** Manganese toxicity effects on chlorophyll content and antioxidant enzymes in pea plant (*Pisum sativum* L. c.v *qazvin*). *Agricultural Journal* **3** : 454–458.
- Richardson DM, Carruthers J, Hui C, Impson FAC, Miller JT, Robertson MP, Rouget M, Le Roux JJ, Wilson JRU. 2011.** Human-mediated introductions of Australian acacias – a global experiment in biogeography. *Diversity and Distributions* **17** : 771–787.
- Richardson DM, Le Roux JJ, Wilson JRU. 2015.** Australian acacias as invasive species : lessons to be learnt from regions with long planting histories. *Southern Forests* **77** : 31–39.
- Richardson DM, Rejmánek M. 2011.** Trees and shrubs as invasive alien species – a global review. *Diversity and Distributions* **17** : 788–809.
- Richer de Forges B, Pascal M. 2008.** La Nouvelle-Calédonie, un « point chaud » de la biodiversité mondiale gravement menacé par l’exploitation minière. *Le Journal de la Société des Océanistes* : 95–112.
- Rivas R, Willems A, Palomo JL, García-Benavides P, Mateos PF, Martínez-Molina E, Gillis M, Velázquez E. 2004.** *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54** : 1271–1275.
- Rodriguez-Echeverria S, Le Roux JJ, Crisostomo JA, Ndlovu J. 2011.** Jack-of-all-trades and master of many? How does associated rhizobial diversity influence the colonization success of Australian *Acacia* species? *Diversity and Distributions* **17**: 946–957.
- Rühling Å, Tyler G. 1973.** Heavy metal pollution and decomposition of spruce needle litter. *Oikos* **24** : 402–416.
- Samantaray S, Rout GR, Das P. 1998.** Role of chromium on plant growth and metabolism. *Acta Physiologiae Plantarum* **20** : 201–212.
- Sarrailh J-M. 2002.** La revégétalisation des exploitations minières : l’exemple de la Nouvelle-Calédonie. *Bois et Forêts des Tropiques* : 21–31.
- Sawada H, Kuykendall LD, Young JM. 2003.** Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *The Journal of General and Applied Microbiology* **49** : 155–179.
- Sawana A, Adeolu M, Gupta RS. 2014.** Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia* : proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. *Frontiers in Genetics* **5**.
- Scott DB, Young CA, Collins-Emerson JM, Terzaghi EA, Rockman ES, Lewis PE, Pankhurst CE. 1996.** Novel and complex chromosomal arrangement of *Rhizobium loti* nodulation genes. *Molecular plant-microbe interactions* : *MPMI* **9** : 187–197.
- Scholla MH, Elkan GH. 1984.** *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **34** : 484–486.
- Schrire BD, Lewis GP, Lavin M. 2005.** Biogeography of the leguminosae. *Legumes of the World* : 21–54.
- Schulze E-D, Gebauer G, Ziegler H, Lange OL. 1991.** Estimates of nitrogen fixation by trees on an aridity gradient in Namibia. *Oecologia* **88** : 451–455.

- Schützendübel A, Polle A. 2002.** Plant responses to abiotic stresses : heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* **53** : 1351–1365.
- Schwintzer CR. 1979.** Nitrogen fixation by *Myrica* gale root nodules Massachusetts wetland. *Oecologia* **43** : 283–294.
- Selosse M-A. 2012.** Symbiose et mutualisme versus évolution : de la guerre à la paix ? *Atala* **15** : 35–49.
- Shahid M, Khalid S, Abbas G, Shahid N, Nadeem M, Sabir M, Aslam M, Dumat C. 2015.** Heavy metal stress and crop productivity. In: Hakeem KR, ed. *Crop Production and Global Environmental Issues*. Cham: Springer International Publishing, 1–25.
- Shanker AK, Cervantes C, Loza-Tavera H, Avudainayagam S. 2005.** Chromium toxicity in plants. *Environment International* **31** : 739–753.
- Shaw JE, Reynolds T, Sprent JI. 1997.** A study of the symbiotic importance and location of *nod* gene inducing compounds in two widely nodulating and two non-nodulating tropical tree species. *Plant and Soil* **188** : 77–82.
- Shearer G, Kohl D. 1986.** N₂-fixation in field settings : estimations based on natural ¹⁵N abundance. *Functional Plant Biology* **13** : 699–756.
- Sheik CS, Mitchell TW, Rizvi FZ, Rehman Y, Faisal M, Hasnain S, McInerney MJ, Krumholz LR. 2012.** Exposure of soil microbial communities to chromium and arsenic alters their diversity and structure. *PLoS ONE* **7** : e40059.
- Shoushtari NH, Pepper IL. 1985.** Mesquite rhizobia isolated from the Sonoran Desert : Competitiveness and survival in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **17** : 803–806.
- da Silva K, De Meyer SE, Rouws LFM, Farias ENC, dos Santos MAO, O'Hara G, Ardley JK, Willems A, Pitard RM, Zilli JE. 2014.** *Bradyrhizobium ingae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Inga laurina* grown in Cerrado soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64** : 3395–3401.
- Silva FV, De Meyer SE, Simões-Araújo JL, Barbé T da C, Xavier GR, O'Hara G, Ardley JK, Rumjanek NG, Willems A, Zilli JE. 2014.** *Bradyrhizobium manausense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vigna unguiculata* grown in Brazilian Amazonian rainforest soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64** : 2358–2363.
- Silva ML de S, Vitti GC, Trevizam AR. 2014.** Heavy metal toxicity in rice and soybean plants cultivated in contaminated soil. *Revista Ceres* **61** : 248–254.
- de Souza Costa ET, Guilherme LRG, de Melo ÉEC, Ribeiro BT, dos Santos B. Inácio E, da Costa Severiano E, Faquin V, Hale BA. 2012.** Assessing the tolerance of castor bean to Cd and Pb for phytoremediation purposes. *Biological Trace Element Research* **145** : 93–100.
- Spilker T, Baldwin A, Bumford A, Dowson CG, Mahenthiralingam E, LiPuma JJ. 2009.** Expanded multilocus sequence typing for *Burkholderia* species. *Journal of Clinical Microbiology* **47** : 2607–2610.
- Sprent JI, James EK. 2007.** Legume evolution : where do nodules and mycorrhizas fit in? *Plant Physiology* **144** : 575–581.
- Sreekanth TVM, Nagajyothi PC, Lee KD, Prasad TNVKV. 2013.** Occurrence, physiological responses and toxicity of nickel in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology* **10** : 1129–1140.

- Stepkowski T, Czaplńska M, Miedzinska K, Moulin L. 2003.** The variable part of the *dnaK* gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related alpha Proteobacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **26** : 483–494.
- Stepkowski T, Hughes CE, Law IJ, Markiewicz Ł, Gurda D, Chlebicka A, Moulin L. 2007.** Diversification of lupine *Bradyrhizobium* strains : evidence from nodulation gene trees. *Applied and Environmental Microbiology* **73** : 3254–3264.
- Stepkowski T, Zak M, Moulin L, Króliczak J, Golińska B, Narożna D, Safronova VI, Mądrzak CJ. 2011.** *Bradyrhizobium canariense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the two dominant rhizobium species in root nodules of lupin and serradella plants growing in Europe. *Systematic and Applied Microbiology* **34** : 368–375.
- Sy A, Giraud E, Jourand P, Garcia N, Willems A, de Lajudie P, Prin Y, Neyra M, Gillis M, Boivin-Masson C, et al. 2001.** Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *Journal of Bacteriology* **183** : 214–220.
- Tedersoo L, Bahram M, Põlme S, Kõljalg U, Yorou NS, Wijesundera R, Ruiz LV, Vasco-Palacios AM, Thu PQ, Suija A, et al. 2014.** Global diversity and geography of soil fungi. *Science* **346** : 1256688.
- Tedersoo L, May TW, Smith ME. 2010.** Ectomycorrhizal lifestyle in fungi : global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* **20** : 217–263.
- The Angiosperm Phylogeny Group. 2009.** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants : APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161** : 105–121.
- The Legume Phylogeny Working Group. 2013.** Legume phylogeny and classification in the 21st century : Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Taxon* **62** : 217–248.
- Theriault G, Michael P, Nkongolo K. 2016.** Comprehensive transcriptome analysis of response to nickel stress in white birch (*Betula papyrifera*). *PLOS ONE* **11** : e0153762.
- Tiwari S, Lata C. 2018.** Heavy metal stress, signaling, and tolerance due to plant-associated microbes: an overview. *Frontiers in Plant Science* **9** : 452.
- Tiwari S, Lata C, Chauhan PS, Nautiyal CS. 2016.** *Pseudomonas putida* attunes morphophysiological, biochemical and molecular responses in *Cicer arietinum* L. during drought stress and recovery. *Plant physiology and biochemistry: PPB* **99** : 108–117.
- Tiwari S, Prasad V, Chauhan PS, Lata C. 2017.** *Bacillus amyloliquefaciens* confers tolerance to various abiotic stresses and modulates plant response to phytohormones through osmoprotection and gene expression regulation in rice. *Frontiers in Plant Science* **8** : 1510.
- Truta E, Gherghel D, Bara ICI, Vochita GV. 2013.** Zinc-induced genotoxic effects in root meristems of barley seedlings. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* **41** : 150–156.
- Tsonev T, Lidon FJC. 2012.** Zinc in plants - an overview. *Emirates Journal of Food and Agriculture* **24** : 322–333.
- Tu JC. 1981.** Effect of salinity on *Rhizobium*-root-hair interaction, nodulation and growth of soybean. *Canadian Journal of Plant Science* **61** : 231–239.
- Unkovitch M, Herridge D, Peoples M, Cadish G, Boddey R, Giller K, Alves B, Chalk P. 2008.** *Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems*. Canberra, Australia : ACIAR.

- Valverde A, Velázquez E, Fernández-Santos F, Vizcaíno N, Rivas R, Mateos PF, Martínez-Molina E, Igual JM, Willems A. 2005.** *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55** : 1985–1989.
- Van Damme EJM, Barre A, Rougé P, Peumans WJ. 2004.** Cytoplasmic/nuclear plant lectins : a new story. *Trends in Plant Science* **9** : 484–489.
- Van de Velde W, Zehirov G, Szatmari A, Debreczeny M, Ishihara H, Kevei Z, Farkas A, Mikulass K, Nagy A, Tiricz H, et al. 2010.** Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science (New York, N.Y.)* **327** : 1122–1126.
- Vassal J. 1972.** *Apport des recherches ontogéniques et séminologiques à l'étude morphologique, taxonomique et phylogénique du genre Acacia*. Toulouse, France : T.F. Editions.
- Vázquez M, Dávalos A, de las Peñas A, Sánchez F, Quinto C. 1991.** Novel organization of the common nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains. *Journal of Bacteriology* **173** : 1250–1258.
- Vincent B, Jourand P, Juillot F, Ducouso M, Galiana A. 2018.** Biological *in situ* nitrogen fixation by an *Acacia* species reaches optimal rates on extremely contrasted soils. *European Journal of Soil Biology* **86** : 52–62.
- Vincent JM. 1970.** *A manual for the practical study of root-nodule bacteria*. Oxford : Published for the International Biological Program by Blackwell Scientific.
- Vitousek PM, Howarth RW. 1991.** Nitrogen limitation on land and in the sea : How can it occur? *Biogeochemistry* **13** : 87–115.
- Walsh KB. 1995.** Physiology of the legume nodule and its response to stress. *Soil Biology and Biochemistry* **27** : 637–655.
- Wang R, Chang YL, Zheng WT, Zhang D, Zhang XX, Sui XH, Wang ET, Hu JQ, Zhang LY, Chen WX. 2013a.** *Bradyrhizobium arachidis* sp. nov., isolated from effective nodules of *Arachis hypogaea* grown in China. *Systematic and Applied Microbiology* **36** : 101–105.
- Wang JY, Wang R, Zhang YM, Liu HC, Chen WF, Wang ET, Sui XH, Chen WX. 2013b.** *Bradyrhizobium daqingense* sp. nov., isolated from soybean nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63** : 616–624.
- Watt MS, Clinton PW, Whitehead D, Richardson B, Mason EG, Leckie AC. 2003.** Above-ground biomass accumulation and nitrogen fixation of broom (*Cytisus scoparius* L.) growing with juvenile *Pinus radiata* on a dryland site. *Forest Ecology and Management* **184** : 93–104.
- Weber DF, Miller VL. 1972.** Effect of soil temperature on *Rhizobium japonicum* serogroup distribution in soybean nodules. *Agronomy Journal* **64** : 796–798.
- Weir BS, Turner SJ, Silvester WB, Park D-C, Young JM. 2004.** Unexpectedly diverse *Mesorhizobium* strains and *Rhizobium leguminosarum* nodulate native legume genera of New Zealand, while introduced legume weeds are nodulated by *Bradyrhizobium* species. *Applied and Environmental Microbiology* **70** : 5980–5987.
- Westhoek A, Field E, Rehling F, Mulley G, Webb I, Poole PS, Turnbull LA. 2017.** Policing the legume-*Rhizobium* symbiosis : a critical test of partner choice. *Scientific Reports* **7** : 1419.
- Wickens GE. 1996.** *Rôle des acacias dans l'économie rurale des régions sèches d'Afrique et du Proche-Orient*. Food & Agriculture Org.

Wilson JRU, Gairifo C, Gibson MR, Arianoutsou M, Bakar BB, Baret S, Celesti-Grapow L, DiTomaso JM, Dufour-Dror J-M, Kueffer C, et al. 2011. Risk assessment, eradication, and biological control : global efforts to limit Australian acacia invasions. *Diversity and Distributions* **17** : 1030–1046.

Wilson K. 2001. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology Chapter 2* : Unit 2.4.

Woese CR, Stackebrandt E, Weisburg WG, Paster BJ, Madigan MT, Fowler VJ, Hahn CM, Blanz P, Gupta R, Nealson KH, et al. 1984. The phylogeny of purple bacteria : the alpha subdivision. *Systematic and Applied Microbiology* **5** : 315–326.

Wood SM, Newcomb W. 1989. Nodule morphogenesis : the early infection of *Alfalfa* (*Medicago sativa*) root hairs by *Rhizobium meliloti*. *Canadian Journal of Botany* **67** : 3108–3122.

Yahara T, Javadi F, Onoda Y, de Queiroz LP, Faith DP, Prado DE, Akasaka M, Kadoya T, Ishihama F, Davies S, et al. 2013. Global legume diversity assessment : Concepts, key indicators, and strategies. *Taxon* **62** : 249–266.

Yao ZY, Kan FL, Wang ET, Wei GH, Chen WX. 2002. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52** : 2219–2230.

Yao Y, Sui XH, Zhang XX, Wang ET, Chen WX. 2015. *Bradyrhizobium erythrophlei* sp. nov. and *Bradyrhizobium ferriligni* sp. nov., isolated from effective nodules of *Erythrophleum fordii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **65** : 1831–1837.

Young JPW, Crossman LC, Johnston AWB, Thomson NR, Ghazoui ZF, Hull KH, Wexler M, Curson ARJ, Todd JD, Poole PS, et al. 2006. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biology* **7** : R34.

Young JM, Kuykendall LD, Martínez-Romero E, Kerr A, Sawada H. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations : *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51** : 89–103.

Young ND, Mudge J, Ellis THN. 2003. Legume genomes : more than peas in a pod. *Current Opinion in Plant Biology* **6** : 199–204.

Yu X, Cloutier S, Tambong JT, Bromfield ESP. 2014. *Bradyrhizobium ottawaense* sp. nov., a symbiotic nitrogen fixing bacterium from root nodules of soybeans in Canada. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64** : 3202–3207.

Yun AC, Szalay AA. 1984. Structural genes of dinitrogenase and dinitrogenase reductase are transcribed from two separate promoters in the broad host range cowpea *Rhizobium* strain IRc78. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81** : 7358–7362.

Zilli JE, Baraúna AC, da Silva K, De Meyer SE, Farias ENC, Kaminski PE, da Costa IB, Ardley JK, Willems A, Camacho NN, et al. 2014. *Bradyrhizobium neotropicale* sp. nov., isolated from effective nodules of *Centrolobium paraense*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64** : 3950–3957.

Zahra H, Latifeh P. 2013. Zinc toxicity on antioxidative response in (*Zea mays* L.) at two different pH. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry* **9** : 66–73.

Zahran HH. 1999. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63** : 968–989.

Zahran HH, Sprent JI. 1986. Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root-hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. *Planta* **167** : 303–309.

Zhang H, Jiang Z, Qin R, Zhang H, Zou J, Jiang W, Liu D. 2014. Accumulation and cellular toxicity of aluminum in seedling of *Pinus massoniana*. *BMC plant biology* **14** : 264.

Zhang YM, Li Y, Chen WF, Wang ET, Sui XH, Li QQ, Zhang YZ, Zhou YG, Chen WX. 2012. *Bradyrhizobium huanghuaihaiense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from soybean (*Glycine max* L.) nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62** : 1951–1957.

Zou N, Dart PJ, Marcar NE. 1995. Interaction of salinity and rhizobial strain on growth and N₂-fixation by *Acacia ampliceps*. *Soil biology & biochemistry* **27** : 409–413.

Annexes

9. Annexe 1 : Article Houlès *et al.* (2018) de la revue *Microbial Ecology*

Microbial Ecology
<https://doi.org/10.1007/s00248-018-1193-1>

ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY



Ectomycorrhizal Communities Associated with the Legume *Acacia spirorbis* Growing on Contrasted Edaphic Constraints in New Caledonia

Anne Houles^{1,2} · Bryan Vincent³ · Magali David⁴ · Marc Ducouso¹ · Antoine Galiana¹ · Farid Juillot⁴ · Laure Hannibal³ · Fabian Carriconde⁵ · Emmanuel Fritsch⁴ · Philippe Jourand³

Received: 29 June 2017 / Accepted: 12 April 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

This study aims to characterize the ectomycorrhizal (ECM) communities associated with *Acacia spirorbis*, a legume tree widely spread in New Caledonia that spontaneously grows on contrasted edaphic constraints, i.e. calcareous, ferralitic and volcano-sedimentary soils. Soil geochemical parameters and diversity of ECM communities were assessed in 12 sites representative of the three main categories of soils. The ectomycorrhizal status of *Acacia spirorbis* was confirmed in all studied soils, with a fungal community dominated at 92% by Basidiomycota, mostly represented by *tomentella-thelephora* (27.6%), *boletus* (15.8%), *sebacina* (10.5%), *russula-lactarius* (10.5%) and *pisolithus-scleroderma* (7.9%) lineages. The diversity and the proportion of the ECM lineages were similar for the ferralitic and volcano-sedimentary soils but significantly different for the calcareous soils. These differences in the distribution of the ECM communities were statistically correlated with pH, Ca, P and Al in the calcareous soils and with Co in the ferralitic soils. Altogether, these data suggest a high capacity of *A. spirorbis* to form ECM symbioses with a large spectrum of fungi regardless the soil categories with contrasted edaphic parameters.

Keywords *Acacia spirorbis* · Ectomycorrhizas · New Caledonia · Fungal diversity · Edaphic constraint

Introduction

New Caledonia is a tropical archipelago located in the south-west Pacific, about 1200 km east from Australia. Because of a contrasted geological history, New Caledonia presents a wide variety of soils that can be grouped into three major categories: clayey and chert soils developed upon volcano-

sedimentary rocks (basalts, schists and chert-type siliceous sediments) that cover about two thirds of the main island; ferralitic soils developed upon ultramafic rocks (peridotites and serpentinites) representing about one third of the main island and more or less humic and aluminous soils developed upon coral reef formations that are mainly found in the Loyalty islands [1]. This diversity of soils, combined with the tropical climatic conditions and the geographical isolation of the archipelago, led to the high terrestrial biodiversity of the island, i.e. 3371 vascular plant species among which 80% are endemic [2]. Among the vascular plants identified in New Caledonia, Labillardière [3] reported *Acacia spirorbis*, which belongs to the Fabaceae family and the Mimosoideae subfamily. This legume named *Acacia spirorbis* subsp. *spirorbis*, abbreviated into *A. spirorbis* along the following text, is now considered as a species of the phyllodinous Australian acacias clade and is geographically located only in the New Caledonian archipelago [4]. *A. spirorbis* is able to colonize and grow on a large variety of soils (i.e. calcareous in the Loyalty islands; volcano-sedimentary and ferralitic soils on the main island that show a large range of concentrations of major plant nutrients (Ca, N, P and K) and high levels of potentially toxic heavy metals (Co, Cr, Mn and Ni) as well

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00248-018-1193-1>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Marc Ducouso
marc.ducouso@cirad.fr

¹ CIRAD, UMR082 LSTM, TA A-82/J, Campus International de Baillarguet, 34398 Cedex 5 Montpellier, France

² Koniambo Nickel SAS, Vavouto, BP 679, 98860 Koné, New Caledonia

³ IRD, UMR040 LSTM, 98848 Nouméa Cedex, New Caledonia

⁴ IRD, UMR206 IMPMC, 98848 Nouméa Cedex, New Caledonia

⁵ Institut Agronomique néo-Calédonien (IAC), Axe 2, 98800 Nouméa, New Caledonia

as pH values between 4 and 8). This plant is naturally widespread in New Caledonia, with a large distribution along the archipelago up to an altitude of 400 m, and it was used as a tool in ecological restoration strategies for ferrallitic outcrops after nickel mining [5]. This legume species has the capacity to develop a triple root symbiosis with the nitrogen fixing bacteria *Bradyrhizobium* sp. [6] and with both arbuscular (AM) and ectomycorrhizal (ECM) fungi [7, 8]. In a previous study, it has been shown that *A. spirorbis* was able to form ECM symbiosis with the fungus *Pisolithus albus* in soils developed upon volcano-sedimentary or ultramafic rocks [9]. It has also been recently demonstrated that the ECM fungus *P. albus* plays a key role in adaptation of *A. spirorbis* to ferrallitic soils by enhancing the uptake of major nutritive elements such as Ca, K and P and reducing the polymetallic toxicity related to the large amounts of cobalt, chromium, manganese and nickel naturally present in most New Caledonian ferrallitic soils [8]. Such adaptations of *A. spirorbis* related to its ability to develop symbiotic association with a specific ECM fungus raises the question of the actual diversity of the ECM fungal community associated with this plant species, in relation with the various edaphic conditions encountered by this legume. Very few studies have reported comparisons between ECM fungal communities of a same tree species facing different edaphic constraints, mainly because the distribution of most ECM tree species is limited by soil constraints. For example, a study focused on *Quercus* spp. that is able to grow on both ferrallitic and non-ferrallitic soils reported similar structures of ECM communities associated with this plant in both soil types [10]. Similarly, the comparison of fungal ECM communities from plants growing on both serpentine and non-serpentine soils concluded that the serpentinic edaphic constraints did not limit but might even promote the ECM diversity [11, 12]. However, it is often assumed that links exist between (i) the distribution of tropical tree diversity, (ii) the distribution of tropical ectomycorrhizal diversity and (iii) the local-scale edaphic variations [13]. More recently, Roy et al. [14] found that the richness of the ECM community associated with *Alnus* spp. was significantly influenced by soil parameters (mineral vs organic), with about 26% of richness variation that could be explained by the soil parameters in combination with the host plant of origin. This latter result is in agreement with the conclusion of the recent review article by Tedersoo et al. [15], indicating that environmental traits such as climatic and edaphic conditions strongly structure the fungal biodiversity at the global scale. In New Caledonia, the contrasted edaphic conditions might also structure the diversity of the ECM fungal communities encountered by the legume *A. spirorbis* that is able to colonize a large variety of soils. The aims of the present study were (i) to characterize the general ECM status of *A. spirorbis* on the different soil types on which this plant species grows, (ii) to analyse the structure of the ECM fungal communities able to

develop symbiotic associations with this legume species in situ, and (iii) to compare the structures of ECM communities of the three soil categories. The hypothesis is that *A. spirorbis* has a strong capacity to develop ECM with a large spectrum of fungi regardless of the very contrasting edaphic parameters. In order to perform this study, the diversity of the ECM fungal community associated with *A. spirorbis* naturally growing on the three major types of soils in New Caledonia, i.e. soils developed upon calcareous, ultramafic and volcano-sedimentary rocks, was assessed. For that purpose, ECM root tips of *A. spirorbis* were sampled in several sites representative of the three major soil types for identification and molecular characterization of symbiotic partners by ITS sequencing. The resulting ECM fungal diversity associated with *A. spirorbis* was established and then analysed according to the soil type.

Materials and Methods

Site Description, Soil Sampling and Chemical Analyses

The sites for sampling were chosen as they all presented spontaneous gregarious populations of *A. spirorbis*. The geographical position of the sites where the soil samples and ECM roots from *A. spirorbis* were collected are shown on the map in Fig. 1, and the detailed location of the study sites and soil descriptions are reported in Table 1 [17]. These soils were classified into three major categories as recently reported in the pedological survey of New Caledonia by Fritsch [1]. Four soils were classified into the calcareous (CA) soil category: two Gibbisc Ferralsols, Humic (WKN and MUC), one Gibbisc Ferralsols, Magnesian (WAN) and one Rendzic Leptosol, Humic (EAS). Four soils were classified into the ferrallitic (FE) soil category: one Geric Plinthosol (TIE), one Magnesian Ferralsol (PAND-1), one Abruptic Ferralsol (PAND-2) and one Haplic Ferralsol (PIND). Four soils were classified into the volcano-sedimentary (VS) soil category: one Leptic Cambisol (POUM MB), one Albic Acrisol (POUM SI), one Haplic Vertisol (VERT), and one Haplic Cambisol (SERP). For each of these 12 soils, three samples of 1 L each representing the 0–30-cm horizon were collected. This depth was considered as representative of the bulk soil horizon that is mainly explored by the *A. spirorbis* roots. The concentration of elements (Si, Mg, Ca, Na, K, P, Fe, Mn, Al, Ni, Cr, Co, P) in the soil samples was determined at the ISO 9002 certified Laboratoire des Moyens Analytiques (LAMA) of the Centre IRD in Noumea (New Caledonia) by ICP-AES after alkaline fusion [18]. The organic carbon (Corg) and nitrogen (Norg) contents were determined following the Walkley-Black and Kjeldahl methods, respectively, as previously described in [19]. The full geochemical characteristics of the 12 soils sampled are reported in ESM Table 1A–C and data are summarized in Table 2. The geochemical data of each

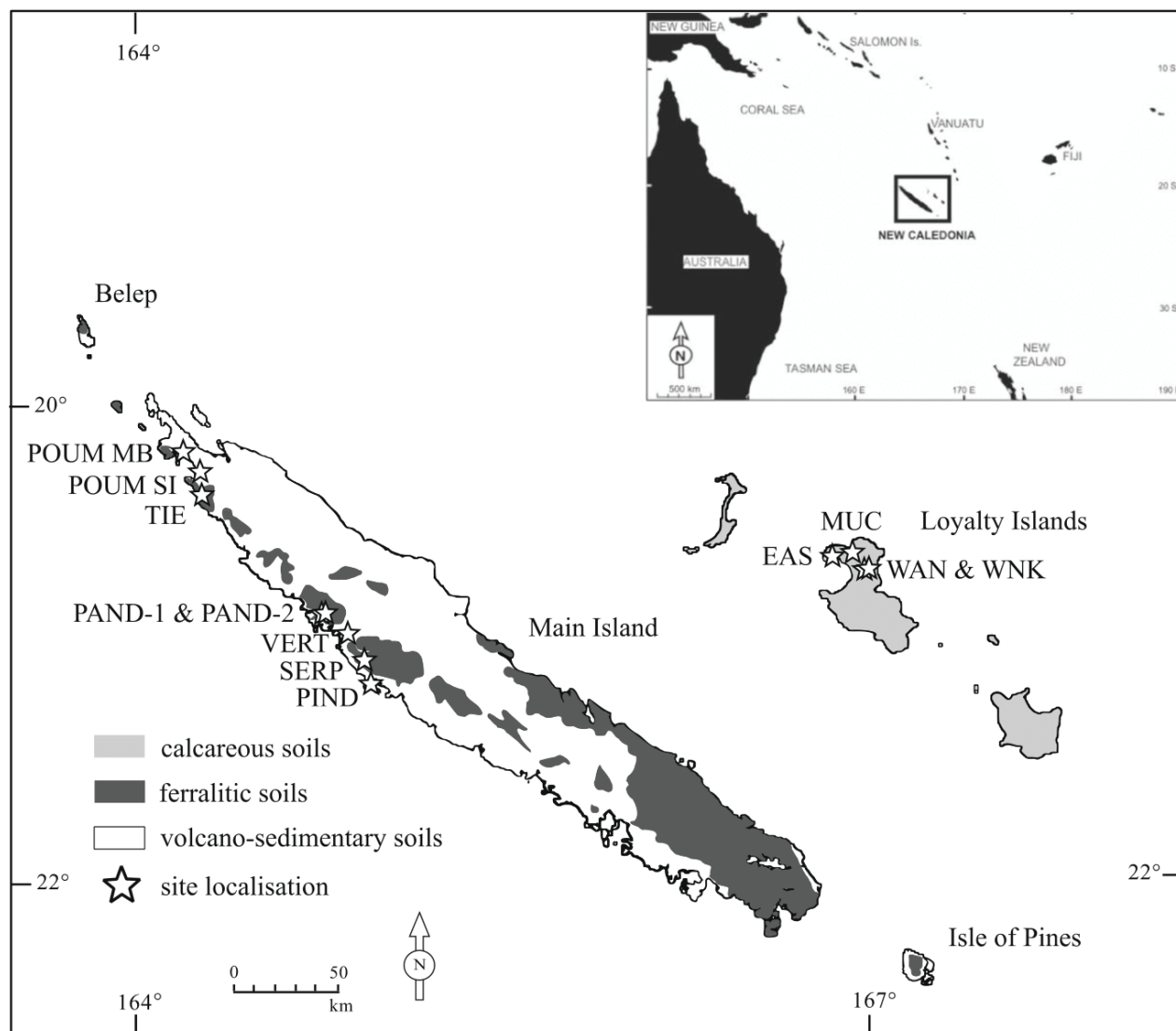


Fig. 1 Map of the New Caledonian archipelago including the three major soil categories (i.e. calcareous, ferrallitic and volcano-sedimentary soils) and showing the location of the sites where ectomycorrhizal fungi were sampled from roots of *Acacia spirorbis*

site were analysed by a principal component analysis (PCA) in order to test the pooling of the sites according to their geochemical properties. All statistical analyses were carried out using the *R* software (<https://www.r-project.org/>) as described below.

Sampling of Ectomycorrhizal Root Tips

In each selected site, ectomycorrhizal root tips were collected from roots of *A. spirorbis* specimens in dense populations, aged from 2 to 15 years, and dispersed across an area of about 1 ha. Ectomycorrhizas were randomly collected on five trees per site, with a minimal distance of 10 m between each specimen. For each tree, ectomycorrhizas were collected using the root tracking method that consists in following the roots from

the largest trunk-connected roots toward the finest ones where ectomycorrhizas preferentially occur [19]. Numbers of ECM collected on each site are reported in Table 3. Immediately after sampling, the ectomycorrhizal root tips were placed in sealed vials and directly transferred into liquid nitrogen. Back to the laboratory, the samples were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ before DNA extraction for sequencing.

Molecular Methods

Total DNA was extracted from individual ectomycorrhizal root tips using the DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Courtabœuf, France) following the protocol described by Jourand et al. [9]. A fragment of ribosomal DNA of approximately 650 bp of the Internal Transcribed Spacer regions (ITS) was amplified using

Table 1 Summary data of sampled sites where ectomycorrhizas of *A. spirorbis* were collected: description, references as reported in Fig. 1, location with geographical coordinates and soil description and WRB classification as reported by Fritsch [1]

Soil geochemical category	Site name	Location and coordinates	Soil description and WRB classification
Calcareous	EAS	Atoll's ledge, Pointe of Easo (Lifou) S 20° 47' 12.23"; E 167° 07' 21.72" (alt 25 m)	Very thin dark-brown humic soil Rendzic leptosol (humic)
	MUC	Atoll's central plateau, Mucaweng (Lifou) S 20° 44' 57.54"; E 167° 09' 09.34" (alt 40 m)	Thin dark yellow-brown soil Gibbsic ferralsol (humic)
	WAN	Atoll's central plateau, Wanaham (Lifou) S 20° 44' 43.56"; E 167° 13' 17.88" (alt 31 m)	Thin yellow-brown soil Gibbsic ferralsol (magnesian)
	WNK	Atoll's central plateau, Wanek (Lifou). S 20° 44' 49.33"; E 167° 05' 00.86" (alt 41 m)	Red-brown soil with calcareous rocks Gibbsic ferralsol (humic)
	Ferrallitic	TIE	Colluvium at the bottom of the Tiebaghi ultramafic regolith S 20°28'19.20"; E 164°15'35.16" (alt 69 m)
	PIND	Pindai peninsula, East Nepoui S 21° 19' 55.45" E164° 58' 19.24" (alt 65 m)	Red-brown soil Haplic ferralsol
	PAND-1	Bottom of the Koniombo ultramafic regolith S 21° 01' 35.84"; E 164° 46' 58.68" (alt 38 m)	Brown soil Magnesian ferralsol
	PAND-2	Colluvium of pisolithic material (Pandanus valley) S 21° 01' 58.80"; E 164° 46' 40.97" (alt 31 m)	Brown clayey soil with colluvium pisolithic cover Abruptic ferralsol
Volcano-sedimentary	POUM MB	Golone peninsula, Poum Malabou S 20° 17' 32.56"; E 164° 05' 22.60" (alt 48 m)	Brown gravel-rich soil Leptic cambisol
	POUM SI	Podzols beach (Poum) S 20° 13' 38.50"; E 164° 04' 44.52" (alt 14 m)	Silicic bleached soil Geric acrisol (Albic)
	VERT	Black soils plain on basalts, Pouembout S 21° 07' 59.59"; E 164° 54' 55.64" (alt 16 m)	Black yey soil Haplic vertisol
	SERP	Serpentinic basement of the Tia plateau ultramafic regolith S 21° 10' 27.74"; E 164° 52' 40.47" (alt 75 m)	Thin silty grey-brown soil (can be gravel-rich) Haplic cambisol

alt altitude, WRB world reference base for soil resources [16]

primers ITS1F: 5'-TTTCCGTAGGTGAACCT-3' [16] and ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' [18]. The PCR reaction used for this amplification was prepared in a total volume of 25 μ L containing a 1 μ L aliquot of genomic DNA diluted to 1/20; 1 μ M of each primer; 1.5 units of Taq DNA polymerase (Promega, Charbonnières, France); 5 μ L of 5X Promega Taq polymerase buffer; 2 mM of MgCl₂ and 200 μ M of dNTP Promega. Amplification was performed with a Mastercycler® thermocycler Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, Germany) programmed as follows: 1 cycle of 3 min at 94 °C, followed by 35 cycles of 45 s at 94 °C, 45 s at 55 °C, 1 min at 72 °C and a final extension of 10 min at 72 °C. PCR products were checked by electrophoresis on a 1% agarose gel (Sigma) in 0.5% TBE buffer with 2 μ L ethidium bromide (BET, 10 μ g/mL for 100 mL gel). A size marker 1000 pb (Promega) was used to estimate the weight of the different fragments. The DNA bands were then visualized by fluorescence under UV light and photographed. Samples with simple and well-defined bands were then sequenced with primers ITS4 and ITS1F by the Macrogen Company (Macrogen, Seoul, Korea) using a genetic analysis based on capillary electrophoresis ABI3730.

Data and Statistical Analyses

The molecular data were analysed as follow: the ITS1F and ITS4 sequences were analysed and assembled into contigs with the Sequencher® software (Genes code Corporation,

Ann Harbor, Michigan, USA). The algorithm ITSx [20, 21] was used to remove the parts of 18S and 28S regions and keep the ITS highly variable sub-regions and analyses were carried out using PlutoF Unite [22]. The total DNA sequences were assigned to operational taxonomic units (OTU) using a 97% sequence similarity cutoff homology of the ITS sequences, as reported in Smith et al. [23] by using the software CD-Hit Est® [21]. The fungal phylogenetic lineages were assigned using the MassBLASTer algorithm and then identified in reference to the PlutoF Unite fungal database [22] following the fungal nomenclature reported by Tedersoo et al. [24].

Then, to investigate the richness and the diversity of ECM communities associated with *A. spirorbis*, we standardized the samples using rarefaction curves and extrapolation methods as previously reported in the Chao et al. method [25]. Rarefaction provides a method of comparison between different communities, whereby each community is "rarefied" back to an equal number of sampled specimens. Extrapolation methods are useful to validate any convergence between the observed and estimated diversity [25]. The level of diversity for each site was evaluated by calculation of the observed Shannon H' and Simpson D indexes based on the sample coverage of each soil category as reported in ESM Fig. 1 and Table 4 [27]. In addition, the estimated and asymptotic richness index 0D , which counts species equally without regarding their relative abundance, Shannon diversity index 1D , which counts species in proportion to their abundance, and the

Table 2 Geochemical characteristics of the bulk soils. All data are means \pm stdv of element content measured in soil samples gathering data of soil sites belonging to a same soil category. For pH and each soil element, a non-parametric test of Kruskal-Wallis was applied todetect differences between soil types of which *p* value is reported. When Kruskal-Wallis *p* value test was < 0.05 , a pairwise Wilcoxon test was used to assess the different levels of significance that letters a, b or c indicate at $p < 0.05$

Geochemical characteristics	Soil type according to the geochemical soil analyses			Kruskall wallis Statistic test <i>p</i> value
	Calcareous	Ferrallitic	Volcano-sedimentary	
pH	7.6 \pm 0.8 a	6.1 \pm 0.5 b	5.7 \pm 1.1 b	< 0.001
Total element soil contents (mg/kg)				
C	7420 \pm 3521 a	2322 \pm 2004 b	2858 \pm 2627 b	0.007362
N	5500 \pm 4845 a	999 \pm 780 b	1006 \pm 923 b	0.003292
P	6471 \pm 2662 a	81 \pm 59 b	168 \pm 180 b	< 0.001
K	267 \pm 124	336 \pm 469	2807 \pm 3222	0.459
Ca	78,585 \pm 81,909 a	1443 \pm 1968 b	13,035 \pm 20,923 b	< 0.001
Mg	23,234 \pm 34,731	29,087 \pm 41,762	21,199 \pm 20,005	0.8723
Na	585 \pm 475 b	352 \pm 194 b	4017 \pm 4825 a	0.02781
Al	141,574 \pm 75,691 a	29,079 \pm 19,879 b	49,952 \pm 37,457 b	0.004413
Fe	109,749 \pm 58,963 b	317,453 \pm 137,596 a	46,231 \pm 35,582 c	< 0.001
Co	43 \pm 26 b	608 \pm 295 a	45 \pm 39 b	< 0.001
Cr	570 \pm 233 b	20,833 \pm 9919 a	569 \pm 581 b	< 0.001
Mn	3103 \pm 1768 a	7714 \pm 6942 a	668 \pm 516 b	< 0.001
Ni	44 \pm 20 b	5653 \pm 2783 a	524 \pm 772 b	< 0.001
Si	13,420 \pm 10,698 c	100,194 \pm 57,151 b	301,606 \pm 97,483 a	< 0.001

Simpson diversity index 2D , which discounts all but the dominant species in the assemblage, were calculated using the *R* package of iNEXT [26]. To test the sampling method, the observed and estimated richness sample completeness curves were constructed using the iNEXT online software (http://chao.stat.nthu.edu.tw/wordpress/software_download/; [25]).

A chi-square independence test and dissimilarity Jaccard indices was applied to compare the distribution of ECM lineages between soil types. Correlations between the diversity of ECM lineages distribution among soils and their edaphic

parameters were calculated ranking the geochemical characteristics of the soils into a Euclidian matrix. The distribution of OTUs per site reflecting the diversity of ECM communities was ranking into a Bray-Curtis dissimilarity matrix using abundance data [28]. A non-parametric Mantel test was then performed in order to check potential correlations between the Bray-Curtis and the Euclidian matrices. The combination of both data (i) the ECM lineages and (ii) the edaphic parameters, all according to sites sampling and type of soils, is represented with a non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis.

Table 3 Summary of ECM data collected on roots of *A. spirorbis* in the 12 studied sites: number of ECM collected, ITS DNA sequences obtained with their accession number as deposited in DDJB bank, thecorresponding number of OTU generated and the observed Shannon H' and Simpson D diversity indexes per site

Soil geochemical category	Site name	Total number of ECM root tips sampled	Number of DNA ITS sequences obtained	ITS DNA sequence accession number in DDJB bank	Number of OTU at 97% represented	Diversity indexes	
						Shannon H'	Simpson D
Calcareous	EAS	49	25	LC122057 to LC122081	11	2.20	0.09
	MUC	18	5	LC122082 to LC122086	4	1.33	0.10
	WAN	43	19	LC122241 to LC122259	8	1.84	0.15
	WNK	18	5	LC122260 to LC122264	4	1.33	0.10
Ferrallitic	TIE	62	12	LC122200 to LC122211	8	2.27	0.06
	PIND	33	16	LC122116 to LC122131	11	2.45	0.11
	PAND-1	21	13	LC122087 to LC122099	7	2.35	0.03
	PAND-2	48	16	LC122100 to LC122115	13	1.77	0.17
Volcano-sedimentary	POUM MB	77	41	LC122132 to LC122172	18	1.35	0.24
	POUM SI	46	12	LC122173 to LC122184	5	2.15	0.11
	VERT	55	29	LC122212 to LC122240	11	1.92	0.11
	SERP	38	15	LC122185 to LC122199	8	1.94	0.09
	Global sampling	488	208		108	2.15	0.11

ITS internal transcribed spacer, OTU operational taxonomic unit, DDJB DNA Data Bank of Japan

Permanova tests were carried out with the ADONIS function included in the Vegan R package to test the influence of the edaphic parameters on the ECM distribution. As the statistical analyses based on the Bray-Curtis matrices generated by the dataset of OTU with and without singletons were very similar, only non-singleton OTUs were used in the NMDS analyses because the dataset may be influenced by low sampling that can yield misleading inferences about composition. All statistical analyses were carried out using the packages Vegan 2.0–6, RVAideMemoire 0.9–54 and Inext R, all in R 2.15.1 software [29].

Results

Soil Properties

The geochemical characteristics per soil category (i.e. calcareous, ferralitic and volcano-sedimentary soils) are summarized in Table 2 and the whole data per site are reported in ESM Tables 1A–C. For pH and most of the element soil contents, the non-parametric test of Kruskal-Wallis showed significant differences between soil types ($p < 0.05$) as reported in Table 2. The results of a principal component analysis (PCA) of the soil geochemical characteristics (including total element contents and pH) are shown in Fig. 2. These results confirmed that the selected sites could be distributed into three main groups according to the soil geochemical characteristics: sites EAS, MUC, WAN and WNK can be grouped as calcareous soils (CA soils); sites PAND-1, PAND-2, PIND and TIE can be grouped as ferralitic soils (FE soils) and sites POUM SI, POUM MB, SERP and VERT can be grouped as volcano-sedimentary soils (VS soils). The results of the statistical analyses (Table 2) indicated that CA soils were mainly characterized by significantly high levels of major plant nutrients (i.e. N and P) and also a high Ca/Mg ratio (3:1), while FE and VS soils had low contents in C, N and P and presented a strongly unbalanced Ca/Mg ratio (1:1.6 in VS soils to 1:20 in FE soils). VS-soils were characterized by significantly high contents of Na and Si. Regarding potentially toxic elements, CA-soils were characterized by significantly high contents of Al, while VS soils presented quite low levels of Fe and Mn. Finally, FE soils differed significantly from the two other categories of soils, with very high Fe content and also high contents in potentially toxic heavy metals: Co, Cr, Mn and Ni.

Diversity and Richness of ECM Fungi Communities Associated with *A. spirorbis*

All the ITS DNA sequences obtained in this study were deposited in the DNA Data Bank of Japan (DDJB) from the accession numbers LC122057 to LC122264. Summary data concerning ITS sequences distribution in the studied sites are

presented in Table 3. Full data presenting DDJB sequence accession numbers, OTU and Blast results with both genus and lineage identifications are available in ESM Table 2. A total of 488 mycorrhizal root tips were collected from 60 *A. spirorbis* trees distributed throughout 12 selected sites and three soil categories (Table 3). Successful ITS sequences were obtained from 208 ECM root tips and grouped into 76 different identified OTUs (including 41 singletons) corresponding to fungal lineages identified by Blast (ESM Table 2). Our results indicated that the majority of ECM taxa found in association with *A. spirorbis* belonged to the Basidiomycota division (92% of the total number of OTUs). The relative abundance of the 208 sequences according to the 76 identified OTUs and their distribution into 15 lineages, as presented in Fig. 3, showed that the most representative Basidiomycota ECM taxa found belonged to the */tomentella-thelephora* (27.6%), */boletus* (15.8%), */sebacina* (10.5%), */russula-lactarius* (10.5%) and */pisolithus-scleroderma* (7.9%) lineages. The rarefaction curves in ESM Fig. 1 build with observed and estimated sample coverage validates the quality of our sampling. For calcareous and volcano-sedimentary sites, the sample coverage reach approximately 90 and 80% of sample coverage observed, and for the ferralitic sites, approximately 55%. The estimated sample coverage indicates that by doubling this sampling, the sample coverage for calcareous and ferralitic sites change by less than 5% and for ferralitic sites the sample coverage reaches 60%.

Relationship between ECM Communities and Edaphic Conditions of Soil Categories

The distribution of OTUs into lineages according to the three soil categories yielded contrasted features (Fig. 4). In CA soils, three Basidiomycota ECM lineages reached 96.2% of the total number of OTUs identified, namely */sebacina* (41%), */tomentella-thelephora* (37%) and */inocybe* (18%). In FE soils, 11 Basidiomycota ECM lineages amounted to 92.4% of the OTUs, the most represented ones being */botelus* (25%), */pisolithus-scleroderma* (17.9%), */russula-lactarius* (12.8%), */tomentella-thelephora* (10.2%) and */cortinarius* (7.7%). In VS soils, eight Basidiomycota ECM lineages reached 88.1% of the OTUs, mostly represented by */tomentella-thelephora* (31%), */botelus* (16.7%), */pisolithus-scleroderma* (14.3%) and */russula-lactarius* (14.3%). The distribution of the OTUs relative abundance according to both fungal lineages and soil categories is reported in ESM Fig. 2. The chi square independence statistical test confirmed that the lineages distribution found in CA soils was significantly different from those found in FE soils (chi square = 74.3, df = 28, p value = $4.5e-06 < 0.05$) and in VS soils (chi square = 47.2, df = 13, p value = $9.0e-06 < 0.05$). However, no significant differences were observed in the lineages distribution found in FE and VS soils (chi square = 11.2, df = 12, p value =

Table 4 Data summary of samples (sequences and OTUs), sample coverage, observed and asymptotic estimated indexes of diversity of the OTUs distribution according to the soil category based on “iNext” algorithm R Package as reported by Hsieh et al. [26]

Soil category		Samples		Sample* coverage %	Diversity indexes					
		Sequence number	Total OTUs		Richness ⁰ D		Shannon (¹ D)		Simpson (² D)	
					Observed**	Estimated	Observed	Estimated	Observed	Estimated
	CA	54	27	90	18	22.1 ± 4.8	2.71	2.92 ± 0.12	0.923	0.941 ± 0.012
	FE	57	39	55	33	225.6 ± 155	3.04	4.21 ± 0.45	0.917	0.934 ± 0.024
	VS	97	42	80	36	90.6 ± 37	3.14	3.57 ± 0.19	0.937	0.946 ± 0.011

CA calcareous, FE ferralitic, VS volcano-sedimentary

*Sample coverage was estimated according to Chao et al. method [27] and as reported in ESM Fig. 1

**Un-repeated OTUs

0.5139 > 0.05). These results are reinforced by the Jaccard indices of dissimilarity indicating CA soil lineages distribution is more different of the other soils types, with, respectively, values 0.918 and 0.810 for CA-soils compared to FE and VS soils, and 0.579 for FE soils compared to VS soils. To evaluate the diversity of ECM fungi colonizing *A. spirorbis*, the observed and estimated richness of Shannon and Simpson indices were calculated (Table 4). The results showed that the observed species richness ⁰D differed from the asymptotic estimated richness for both FE and VS soils. The observed and estimated Shannon ¹D converged to similar values for the ECM distribution found in CA and VS soils (averaged variation of 5% between observed and estimated indexes), while a gap of 27% difference could be noticed between observed and estimated indexes in FE soils. Finally, the Simpson ²D for the ECM distribution found in the three categories of

soils showed close values between observed and estimated indexes with only 3.7% differences in mean. A Mantel test between the Bray-Curtis matrix of the ECM diversity and the Euclidian matrix of the soil properties (i.e. pH, Corg/Norg ratio, total element contents as reported in ESM Table 1A–C) showed a significant correlation between these two parameters (at *p* < 0.01) as reported in ESM Table 3. These positive results allowed to perform a Permanova analysis showing multiple significant correlations (*p* < 0.05) between the edaphic parameters as pH, the elements content in soils (i.e. Ca, P, Al and Co) and the ECM OTUs distribution (ESM Table 4). In addition, no significant differences could be observed when considering OTU data with or without singletons (ESM Table 4). Consequently, only non-singleton OTUs were used in a non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis in order to avoid misleading inferences about composition that

Fig. 2 Principal component analysis of the pH, the C/N ratio and the total element contents in the studied soils. Confidence ellipses (95%, R package) group sites into soils categories, i.e. CA = calcareous soils; FE = ferralitic soils and VS = volcano-sedimentary soils

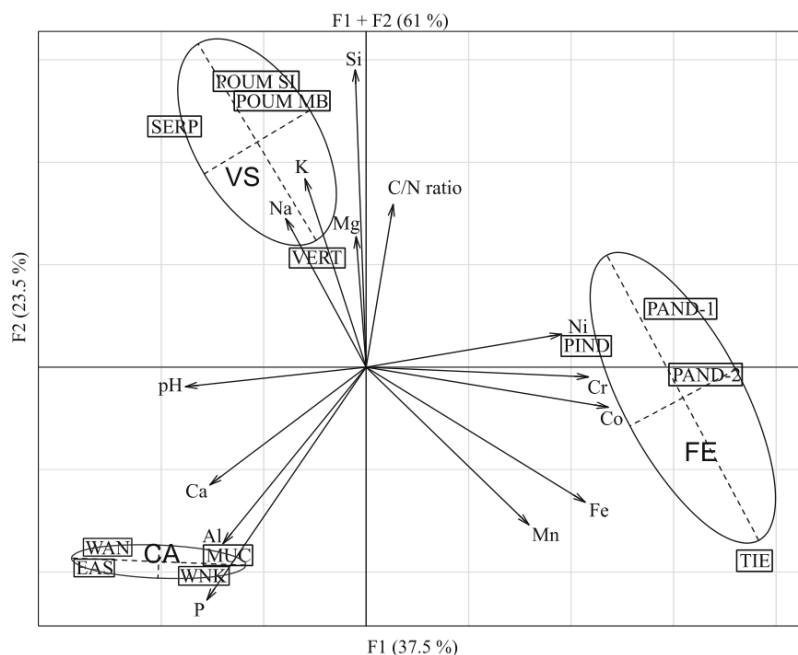
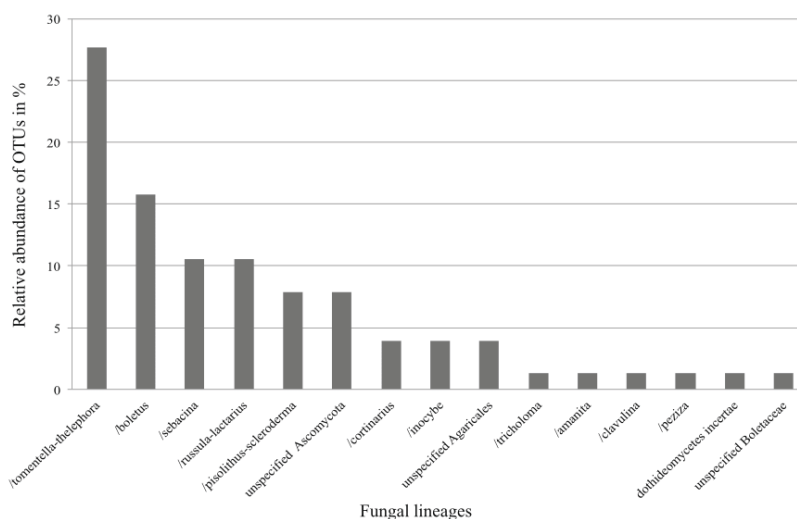


Fig. 3 Distribution of the OTUs relative abundance (%) according to fungal lineages [24]



could have erased from influence on the dataset by low sampling. The NMDS results showed that the three soil categories harboured different fungal communities although those of ferralitic and volcano-sedimentary soil types shared the most abundant lineages, in particular */tomentella-thelephora*, and at a lesser extent */boletus* */pisolithus-scleroderma* and */russula-lactarius* (Fig. 5). By contrast, the calcareous soils predominantly harboured the */sebacina* and */inocybe* lineages as well as */tomentella-thelephora* which was the most ubiquitous and abundant ECM lineage found in the three soil types (Fig. 5). In addition, as reported in ESM Table 4, the Permanova results indicated that the variation of the ECM diversity in the study sites was significantly explained by major edaphic parameters as pH (31.4%), soil contents of P (45.5%), Ca (28.4), Al (29.5%) and Co (26.1%).

Discussion

The originality of this study is to bring (i) new data about ectomycorrhizal diversity of a legume from tropical southern hemisphere and (ii) to focus on one endemic *Acacia* that colonized a tropical island [4] and which is able to grow on a large and contrasted variety of soils.

Ectomycorrhizal Status and Global Diversity of the ECM Community Associated with *A. spirorbis*

Australian phyllodinous acacias have been described for their ability to form symbiotic associations with ECM fungi [30]. The present study confirms the ECM status of *A. spirorbis* that belongs to the phyllodinous acacias [4] and it reports the existence of 76 fungal OTUs grouped into 15 ectomycorrhizal lineages. Among the total of OTUs, 92% belong to the Basidiomycota. The dominant ECM lineages of

Basidiomycota found were */tomentella-thelephora*, */boletus*, */sebacina*, */russula-lactarius* and */pisolithus-scleroderma*. Compared to other previous studies about the diversity of ECM fungi associated with native or introduced plant species [23, 31, 32], the results of the present study indicate that the diversity of ECM fungi associated with *A. spirorbis* in New Caledonia is similar to the native range of ECM from other plant species. Indeed Smith et al. [31] listed 161 ectomycorrhizal species associated with native *Quercus douglasii* in California. Ducouso et al. [32] reported 38 ectomycorrhizal species associated with the introduced *Eucalyptus robusta* in Madagascar. The recent study by Smith et al. [23] on the ectomycorrhizal community of *Pakaraimaea dipterocarpacea* and *Dicymbe jenmanii* in a neotropical forest of Guyana listed 52 OTUs distributed into 11 ectomycorrhizal groups based on 255 sequences analysed. Considering the lack of data about the diversity of ECM communities associated with acacias, this study brings then original data about *A. spirorbis* to form symbiotic associations particularly with a large spectrum of ECM fungi on different edaphic constraints.

Diversity of the Ectomycorrhizal Communities as a Function of the Soil Category

Regarding the ECM diversity and the lineages richness associated with *A. spirorbis*, our results indicate that Basidiomycota are dominant whatever the type of soil. Concerning the diversity of the ECM communities associated with *A. spirorbis* as a function of the soil category our data showed that there is no significant difference between the ECM communities from ferralitic (FE) and volcano-sedimentary (VS) soils. The main common lineages for these both type of soil are */boletus*, */tomentella-thelephora*, */pisolithus-scleroderma* and */russula-lactarius*. These results

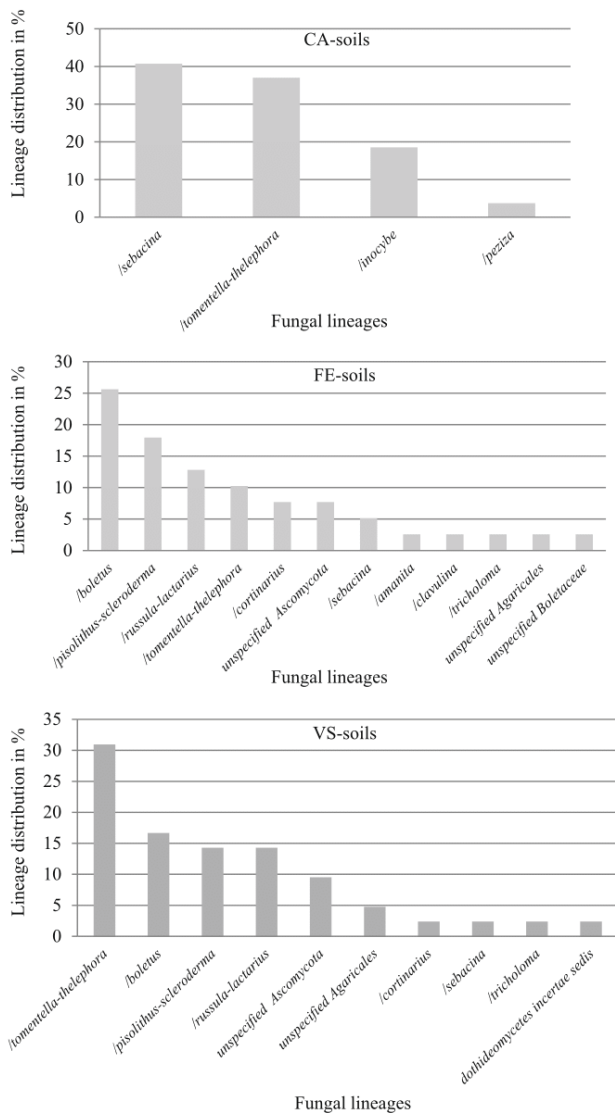


Fig. 4 Distribution of the lineages according the three categories of soils: CA = calcareous; FE = ferrallitic; VS = volcano-sedimentary

are in agreement with previous results reported by Moser et al. [10] that showed no significant difference between the ECM communities associated with *Quercus* spp. grown on serpentinitic (ferrallitic) and non-serpentinitic soils. Moreover, our results (i.e. 12 lineages in FE soils compared to 10 lineages in VS soils) confirm that, despite their large contents in potentially toxic metals, low contents in nutrients (P, K) and strongly unbalanced Ca/Mg ratio, FE soils do not limit the diversity of the ectomycorrhizal community associated with *A. spirorbis*. Such a conclusion is in agreement with the results already reported for serpentinitic (ferrallitic) soils by Branco [11] and Branco and Ree [12]. These results are in agreement with those from previous studies focused on the ectomycorrhizal status and ECM fungal species richness associated with other dominant ECM plants in New Caledonia

such as *Melaleuca* spp., *Nothofagus* spp., *Tristaniopsis* spp. and *Sannantha* spp. [8, 9, 33, 34]. Moreover, when *A. spirorbis* grow in association with *Melaleuca* spp. or *Tristaniopsis* spp., it shares the same ECM lineages such as */tomentella-thelephora*, */russula-lactarius* and */pisolithus-sclerotium* [8, 9, 33, 34]. Regarding the presence of */cortinari* lineage only found in FE soils, this result is in agreement with the recurring occurrence of *Cortinariaceae* as ectomycorrhizal fungi reported for plants such as *Tristaniopsis* spp. and *Nothofagus* spp. only growing on soils developed upon ultramafic rocks that are equivalent to our Fe soils [33, 34]. On the opposite, the diversity of ECM communities associated with *A. spirorbis* on CA soils is very low and significantly different from those found on FE and VS soils; this low diversity may be linked to high soil fertility (e.g. [35, 36]). Notwithstanding, it is important to consider that CA soils were sampled in one of the Loyalty Islands, Lifou that emerged during the Miocene, while the soils of the main island developed on bedrocks aged of 35 MA [1]. So, the low ECM fungal diversity associated with *A. spirorbis* on CA soils may result as a weak fungal colonisation of these soils due to the island isolation. This would be in agreement with the island biogeographical theory regarding dynamics of fungi species: the fungal island colonisation is mainly driven by spore dispersion but plant host colonisation is limited by distance and so impacts the ECM richness [37]. On such isolated CA soils, the results showed also the dominance of Basidiomycota as observed in UF and VS soils but only four lineages were found in association with *A. spirorbis* dominated by */thelephora-tomentella* and */sebacina* lineages. The presence of */thelephora-tomentella* lineages in these CA soils is in agreement with the results of previous studies that reported the occurrence of *Tomentella* species as ECM symbionts for plants growing on coral reef island [38]. Moreover and not surprisingly the */thelephora-tomentella* lineage is dominant: such lineage is known to host ubiquitous taxa (e.g. [39]) that are common and dominant ECM fungi, colonizing a large spectrum of diverse environments, especially in primary successional habitats [40, 41]. Altogether, our results about the diversity of the ECM communities associated with *A. spirorbis* in the three studied soil categories indicated that this legume has the capacity to develop symbiotic associations with a large spectrum of ECM fungi regardless the contrasted edaphic parameters.

Ectomycorrhizal Diversity in Relation with Edaphic Parameters

The diversity of the ECM communities associated with *A. spirorbis* showed significant correlations with some major edaphic parameters for each of the three soil categories (Fig. 4). First, the distribution of the ECM diversity between sites is correlated with soil pH, the highest diversity being

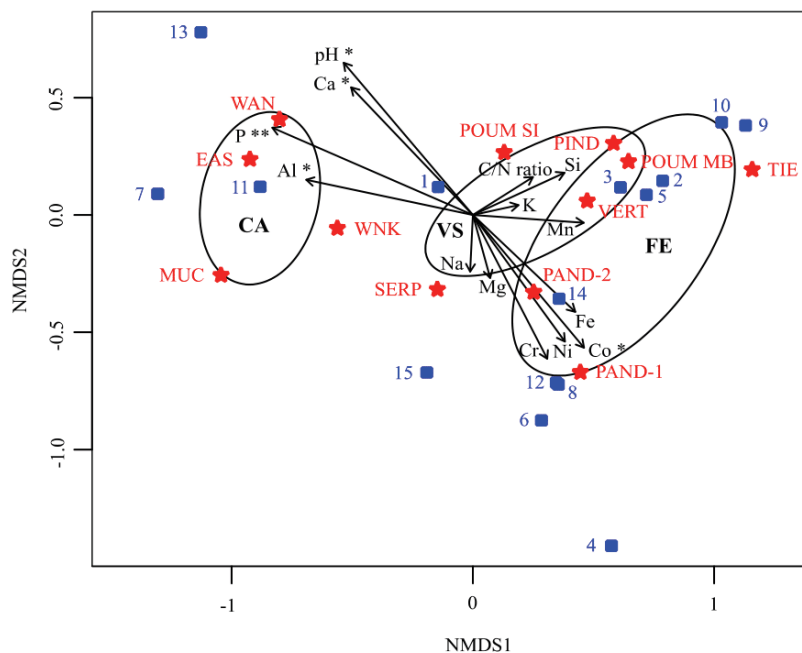


Fig. 5 Two-dimensional NMDS ordination of the OTU distribution (without singletons) as fungal lineage patterns according to the sampling sites and the geochemical soil parameters including the pH, the C/N ratio and the total element contents. Blue squares represent OTUs grouped into lineages according Tedersoo et al. [24], numbers are lineage code. Red stars represent the 12 sites (Table 1) with a specific position in the graph according to their fungal lineages. Edaphic parameters are positioned with arrow according to the Permanova calculation, and asterisks indicate the level of significant

relationship with the lineage distribution (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). Confidence ellipses (95%, R package) group lineages according soil category i.e. calcareous (CA), ferrallitic (FE) and volcano-sedimentary (VS). Lineages codes: 1 /*tomentella-thelephora*; 2 /*boletus*; 3 /*pisolithus-scleroderma*; 4 /unspecified Boletaceae; 5 /*russula-lactarius*; 6 /*cortinarius*; 7 /*inocybe*; 8 /*amanita*; 9 /*tricholoma*; 10 /unspecified Agaricales; 11 /*sebacina*; 12 /*clavulina*; 13 /*peziza*; 14 /unspecified Ascomycota; 15 /*dothideomycetes incertae sedis*

found in the most acidic soils (i.e. $\text{pH} = 5.7 \pm 1.1$ for VS soils and $\text{pH} = 6.1 \pm 0.5$ for FE soils compared to $\text{pH} = 7.6 \pm 0.8$ for CA soils). This result is in agreement with previous results of a larger-scale study on the description of forest fungal diversity, which showed a negative correlation between the fungal richness and the number of OTUs for most fungal taxonomic groups and the increase in soil pH [42]. Second, in our study, the diversity of the ECM communities was found to negatively correlate with the Ca and P contents of the selected soils, with a larger diversity of the ECM communities in the soils with the lowest Ca and P contents (i.e. VS and FE soils). Such a negative correlation between the P contents of the soil and the ECM diversity might be explained by the fact that the limitation of phosphorous in soils is known to promote the growth of ECM fungi since a major role of ECM fungi is to provide P to their host plants [43, 44]. Similarly, the negative correlation between the Ca contents of the soil and the ECM diversity might be explained by the fact that a low Ca content in soil is known to enhance the occurrence and diversity of ECM fungi [45, 46], mechanisms supporting these enhancement are still unknown. Altogether, our results are in agreement with the recent hypothesis that major edaphic parameters such as Ca, P and pH play a key role in structuring the soil fungal diversity at the global scale [15]. Moreover, our results

also show some significant correlations between the diversity of the ECM communities and the contents in potentially toxic elements in the soils, as already reported by De Beeck et al. [47]. Indeed, in FE soils, the diversity of the ECM community is positively correlated with the Co content, while in CA soil, it is negatively correlated with the Al content. Such correlations between (i) edaphic parameters and (ii) the ECM communities associated with *A. spirorbis* suggest that ECM fungi might play a significant role in the adaptation of the plant to the various soils as already demonstrated when the ECM fungus *P. albus* was inoculated on *A. spirorbis* grown on an artificial substrate similar to Fe soils [8].

Acknowledgments This work was conducted as part of an industrial agreement through the French program of PhD training research CIFRE with grant number N° 2013/1434 involving the industrial company Koniambo Nickel SAS. In addition, this work was supported by the French National Agency for Research (ANR) financial support through the BIOADAPT Program 2012 [grant number ANR-12-ADAP-0017 ADASPIR].

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Fritsch E (2012) Les sols. In: Bonvallot J, Gay JC, Habert E (eds) Atlas de la Nouvelle-Calédonie. IRD, Marseille, pp 73–76
- Morat P, Jaffré T, Tronchet F, Munzinger J, Pillon Y, Veillon JM, Chalopin M, Birnbaum P, Rigault F, Dagostini G, Tinel J, Lowry IIPP (2012) The taxonomic reference base Florical and characteristics of the native vascular flora of New Caledonia. *Adansonia* 34: 179–221
- Labillardière JJ (1825) Sertum austro-caledonum. *Parisiis, ex Typographia domine Huzard (née Vallat la Chapelle), via de l'Eperon Saint-André-des-Arts* 7:69
- Brown GK, Murphy DJ, Kidman J, Ladiges PY (2012) Phylogenetic connections of phylloidinous species of *Acacia* outside Australia are explained by geological history and human-mediated dispersal. *Aust Syst Bot* 25:390–403
- Jaffré T, Rigault F, Sarraillh JM (1994) La végétalisation des anciens sites miniers. *Bois For Trop* 242:45–57
- Grangeteau C, Ducouso M, Fritsch E, Juillot F, Jourand P, Acherar S, Lebrun M, Klonowska A (2012) Diversity of nitrogen fixing bacteria associated to the new Caledonian ubiquitous tree *Acacia spirorbis*. In: EGU General Assembly (ed) Abstracts of European Geosciences Union, Vienna, Austria, 4892
- Ducouso M, Galiana A, Prin Y, Hannibal L, Jourand P, Klonowska A, Carriconde F, Lebrun M, Fritsch E, Juillot F, Amir H (2014) *Acacia spirorbis* a model plant to study the contribution of symbiotic root microorganisms in plant adaptation to soil constraints: news and prospects. In: Griffin R (ed) Proceedings of Acacia 2014 conference—sustaining the future of Acacia plantation forestry. IUFRO Acacia 2014, Hue city, Vietnam, p 51
- Jourand P, Hannibal L, Majorel C, Mengant S, Ducouso 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. *J Plant Physiol* 171:164–172
- Jourand P, Ducouso M, Loulergue-Majorel C, Hannibal L, Santoni S, Prin Y, Lebrun M (2010) Ultramafic soils from New Caledonia structure *Pisolithus albus* in ecotype. *FEMS Microbiol Ecol* 72: 238–249
- Moser MA, Frank JL, D'Allura JA, Southworth D (2009) Ectomycorrhizal communities of *Quercus garryana* are similar on serpentine and nonserpentine soils. *Plant Soil* 315:185–194
- Branco S (2010) Serpentine soils promote ectomycorrhizal fungal diversity. *Mol Ecol* 19:5566–5576
- Branco S, Ree RH (2010) Serpentine soils do not limit mycorrhizal fungal diversity. *PLoS One* 5:e11757
- Peay KG, Kennedy PG, Davies SJ, Tan S, Bruns TD (2010) Potential link between plant and fungal distributions in a dipterocarp rainforest: community and phylogenetic structure of tropical ectomycorrhizal fungi across a plant and soil ecotone. *New Phytol* 185:529–542
- Roy M, Rochet J, Manzi S, Jargeat P, Gryta H, Moreau PA, Gardes M (2013) What determines *Alnus*-associated ectomycorrhizal community diversity and specificity? A comparison of host and habitat effects at a regional scale. *New Phytol* 198:1228–1238
- Tedersoo L, Bahram M, Pöhlme S et al (2014) Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346:6213 1266688/1–10
- Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes. Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2:113–118
- Chesworth W, Arbustain MC, Macias F, Spaargaren O, Mualen Y, Morel-Seytoux HJ, Horwath WR, Almendros G, Grossl PR, Sparks DL, Fairbridge RW, Singer A, Eswaran H, Micheli E (2008) Classification of soils: world reference base (WRB) for soils resources. In: Chesworth W (ed) Encyclopedia of Soil Science. Springer, Netherland ISBN: 978-1-4020-3995-9
- White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic, London, pp 315–322
- Perrier N, Amir H, Colin F (2006) Occurrence of mycorrhizal symbioses in the metal-rich lateritic soils of the Koniambo massif, New Caledonia. *Mycorrhiza* 16:449–458
- Bengtsson-Palme J, Ryberg M, Hartmann M, Branco S, Wang Z, Godhe A, De Wit P, Sánchez-García M, Ebersberger I, de Sousa F, Amend A, Jumpponen A, Unterseher M, Kristiansson E, Abarenkov K, Bertrand YJK, Sanli K, Eriksson KM, Vik U, Veldre V, Nilsson RH (2013) Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods Ecol Evol* 4:914–919. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12073>
- Li W, Godzik A (2006) Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22:1658–1659
- Abarenkov K, Tedersoo L, Nilsson RH et al (2010) PlutoF a web based workbench for ecological and taxonomic research, with an online implementation for fungal ITS sequences. *Evol Bioinformatics Online* 6:189–196
- Smith ME, Henkel TW, Uehling JK, Fremier AK, Clarke HD, Vilgalys R (2013) The ectomycorrhizal fungal community in a neotropical forest dominated by the endemic dipterocarp *Pakaraïmaea dipterocarpacea*. *PLoS One* 8:e55160
- Tedersoo L, May TW, Smith ME (2010) Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20:217–263
- Chao A, Chiu CH, Jost L (2016) Statistical challenges of evaluating diversity patterns across environmental gradients in mega-diverse communities. *J Veg Sci* 27:434–438
- Hsieh TC, Ma KH, Chao A (2016) iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (hill numbers). *Methods Ecol Evol* 7:1451–1456. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12613>
- Zack JC, Willig MR (2004) Fungal biodiversity and patterns. In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS (eds) Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. Elsevier Academic, San Diego, pp 59–75
- Anderson MJ (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol* 26:32–46
- R Development Core Team (2011) “R: a language and environment for statistical computing”. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>
- Reddell P, Warren RM (1987) Inoculation of acacias with mycorrhizal fungi potential benefits in Australian acacias in developing countries. *ACIAR Proceedings* 16:50–53
- Smith ME, Douhan GW, Rizzo DM (2007) Ectomycorrhizal community structure in a xeric *Quercus* woodland based on rDNA sequence analysis of sporocarps and pooled roots. *New Phytol* 174:847–863
- Ducouso M, Duponnois R, Thoen D, Prin Y (2012) Diversity of ectomycorrhizal fungi associated with *Eucalyptus* in Africa and Madagascar. *Internat J For Res* ID 450715
- Waseem M, Ducouso M, Prin Y, Domergue O, Hannibal L, Majorel C, Jourand P, Galiana A (2017) Ectomycorrhizal fungal diversity associated with endemic *Tristaniopsis* spp. (Myrtaceae) in ultramafic and volcano-sedimentary soils in New Caledonia. *Mycorrhiza* 27(4):407–413
- Prin Y, Ducouso M, Tassin J, Béna G, Jourand P, Dumontet V, Moulin L, Contesto C, Ambrosi JP, Chaintreuil C, Dreyfus B,

- Lebrun M (2012) Ectotrophic mycorrhizal symbioses are dominant in natural ferrallitic forest ecosystems of New Caledonia. In: Hafidi M, Duponnois R (eds) *The mycorrhizal symbioses in Mediterranean environment*. Nova Science, New York, pp 25–48
35. Marx DH, Hatch AB, Mendicino JF (1977) High soil fertility decreases sucrose content and susceptibility of loblolly pine roots to ectomycorrhizal infection by *Pisolithus tinctorius*. *Can J Bot* 55(12):1569–1574
36. Kranabetter JM, Friesen J, Gamiet S, Kroeger P (2009) Epigeous fruiting bodies of ectomycorrhizal fungi as indicators of soil fertility and associated nitrogen status of boreal forests. *Mycorrhiza* 19(8): 535–548
37. Peay KG, Schubert MG, Nguyen NH, Bruns TD (2012) Measuring ectomycorrhizal fungal dispersal: macroecological patterns driven by microscopic propagules. *Mol Ecol* 21:4122–4136
38. Chambers SM, Hitchcock CJ, Cairney JWG (2005) Ectomycorrhizal mycobionts of *Pisonia grandis* on coral cays in the Capricorn-bunker group, Great Barrier Reef, Australia. *Mycol Res* 109:1105–1111
39. Hilszczanska D, Sierota Z (2006) Persistence of ectomycorrhizas by *Thelephora terrestris* on outplanted Scots pine seedlings. *Acta Mycologica* 41(2):313–318
40. Jakucs E, Erős-Honti Z (2008) Morphological-anatomical characterization and identification of *Tomentella* ectomycorrhizas. *Mycorrhiza* 18:277–285
41. Peintner U, Dämmrich F (2012) *Tomentella alpina*, an important mycobiont of alpine ectotrophic plants. *Mycol Prog* 11:109–119
42. Geml J, Pastor N, Fernandez L, Pacheco S, Semenova TA, Becerra AG, Wicaksono CY, Nouhra ER (2014) Large-scale fungal diversity assessment in the Andean Yungas forests reveals strong community turnover among forest types along an altitudinal gradient. *Mol Ecol* 23:2452–2472
43. Smith SE, Read D (2008) *Mycorrhizal symbiosis* 3rd edn. Academic, London
44. Laliberte E, Lambers H, Burgess TI, Wright SJ (2014) Phosphorus limitation, soil-borne pathogens and the coexistence of plant species in hyperdiverse forests and shrublands. *New Phytol* 206:507–521
45. Pölme S, Bahram M, Yamanaka T, Nara K, Dai YC, Grebenc T, Kraigher H, Toivonen M, Wang PH, Matsuda Y, Naadel T, Kennedy PG, Kõljalg U, Tedersoo L (2013) Biogeography of ectomycorrhizal fungi associated with alders (*Alnus* spp.) in relation to biotic and abiotic variables at the global scale. *New Phytol* 198: 1239–1249
46. Teste FP, Veneklaas EJ, Dixon KW, Lambers H (2014) Complementary plant nutrient-acquisition strategies promote growth of neighbour species. *Funct Ecol* 28:819–828
47. De Beeck MO, Lievens B, Busschaert P, Rineau F, Smits M, Vangronsveld J, Colpaert JV (2015) Impact of metal pollution on fungal diversity and community structures. *Environ Microbiol* 17: 2035–2047