



Altération microbienne de l'apatite et de l'orthoclase chez les Pinaceae

Mémoire

Laurent Fontaine

Maîtrise en sciences forestières
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Laurent Fontaine, 2016

Résumé

Dans la forêt boréale, l'activité des microorganismes de la mycorhizosphère peut jouer un rôle important dans la nutrition des plantes et dans le développement de l'écosystème et des cycles biogéochimiques par l'altération des minéraux. Dans la présente étude, quelques champignons ectomycorhiziens (ECM) communément associés aux Pinacées ont été mis à l'épreuve en conditions *in vitro* pour démontrer leur capacité à dissoudre la fluorapatite, un phosphate de calcium, et l'orthoclase, un feldspath potassique. Ces minéraux ont été dissouts par les souches ECM sélectionnées et certaines ont montré une croissance significativement plus grande par rapport aux témoins sans phosphore ou potassium lorsque ces nutriments étaient disponibles sous forme de minerai. La présence de bactéries solubilisatrices de minéraux phosphatés (BSP) a été confirmée dans la mycorhizosphère de *Picea glauca*. Quatre cent cinquante-cinq souches solubilisant le phosphate tricalcique ont été isolées d'ectomycorhizes de l'ascomycète ECM *Wilcoxina* sp., lequel dominait la communauté ECM d'un peuplement de *P. glauca*. Parmi ces centaines d'isolats, vingt-sept d'entre eux étaient aptes à dissoudre la fluorapatite. Des études ultrastructurales ont montré la capacité de ces bactéries BSP à dissoudre complètement des cristaux de fluorapatite en moins d'une journée. Ces mêmes bactéries BSP s'associent avec le champignon ECM *Laccaria bicolor* en conditions oligotrophiques. Les colonies de BSP présentaient un diamètre significativement plus élevé lorsque le basidiomycète ECM *L. bicolor* était contraint d'alimenter les bactéries pour obtenir son phosphore d'une source insoluble. Ces résultats supportent le modèle de l'association tripartite «plante-champignon-bactérie» qui expliquerait la mise en disponibilité des nutriments à partir du sol minéral en forêt boréale.

Abstract

In boreal forests, mycorrhizospheric microorganisms can play an important role in plant nutrition, ecosystem development and biogeochemical cycles through mineral weathering. In this study, a few ectomycorrhizal (ECM) fungal species commonly found in association with Pinaceae were tested *in vitro* for their ability to weather fluorapatite, a calcium phosphate, and orthoclase, a potassium feldspar. These minerals were dissolved by the selected ECM strains and some of them produced significantly greater biomasses when supplied with the above-mentioned minerals as opposed to controls lacking phosphorus or potassium. The presence of phosphate solubilising bacteria (PSB) has been confirmed in the mycorrhizosphere of *Picea glauca*. Four hundred fifty-five strains solubilising tricalcium phosphate were isolated from the ECM Ascomycete *Wilcoxina* sp., which dominated the ECM community of a *P. glauca* stand. Among these isolates, twenty-seven dissolved fluorapatite. Ultrastructural studies revealed the ability of the PSB to completely dissolve fluorapatite crystals within a day. The same bacteria associated with the ECM fungus *Laccaria bicolor* in oligotrophic conditions. The PSB colonies displayed significantly greater diameters when the Basidiomycete *L. bicolor* was forced to sustain their growth in order to obtain phosphorus from an insoluble source. These results support the model of tripartite association among trees, ECM fungi and bacteria which seeks to explain the mobilization of nutrients from mineral soil in boreal forests.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	xi
Remerciements.....	xiii
Introduction générale	1
Chapitre 1 : Mise en disponibilité du phosphore et du potassium à partir de roches ignées : des champignons ectomycorhiziens associés aux Pinaceae solubilisent la fluorapatite et l'orthoclase	7
Introduction	7
Méthodes	8
Résultats	12
Discussion.....	18
Chapitre 2 : Évidence d'une association étroite des bactéries solubilisatrices de phosphates au mycélium ectomycorhizien de <i>Picea glauca</i>	21
Introduction	21
Matériel et Méthodes.....	23
Résultats	31
Discussion.....	40
Conclusions générales.....	43
Bibliographie.....	47

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1.1 Résultats des contrastes orthogonaux comparant les biomasses sèches et densités optiques pour les extraits de protéines de *H. crustuliniforme*, *S. granulatus*, *T. sculpturatum* et *C. finlandia* après huit semaines d'incubation dans les milieux sans phosphore (P-), phosphate tricalcique (TCP), complet (P soluble) et fluorapatite..... 14

Tableau 1.2 Résultats des contrastes orthogonaux comparant les biomasses sèches et des densités optiques pour les extraits de protéines de *H. crustuliniforme*, *S. granulatus*, *S. tomentosus*, *T. sculpturatum*, *C. finlandia*, *P. involutus* et *B. ornatipes* après 8 semaines d'incubation dans les milieux sans potassium (K-), complet (K soluble) et orthoclase..... 17

Tableau 1.3 Résultats des contrastes orthogonaux comparant les concentrations en potassium des milieux contenant l'orthoclase après 8 semaines d'incubation selon la présence ou absence de champignon. 18

Chapitre 2

Tableau 2.1 Nombre de souches bactériennes cultivées sur milieu solide ayant solubilisé les amendements qui étaient le phosphate tricalcique (TCP), l'hydroxyapatite et la fluorapatite..... 31

Tableau 2.2 Contrastes orthogonaux à priori comparant les diamètres des colonies *Burkholderia* sp. souche 205, espèce inconnue souche 260 et *Curtobacterium* sp. souche 168 croissant en présence de *L. bicolor* sur les compartiment distaux contenant des sources de phosphore soluble, insoluble ou les deux simultanément. Les valeurs de P inférieures à 0.05 indiquent des différences significatives dans les diamètres de colonies en fonction des sources de phosphore offertes à *L. bicolor*..... 39

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1 Clarification de milieu amendé en fluorapatite par *C. finlandia*. (a) Milieu de culture au moment de l'inoculation. Les particules de fluorapatite en suspension rendent le milieu trouble. (b) Colonies de *C. finlandia* après huit semaines d'incubation en présence de fluorapatite. L'amendement minéral a été dissout et le milieu est clair. 13

Figure 1.2 Biomasses sèches de *H. crustuliniforme*, *S. granulatus*, *T. scalpturatum* et *C. finlandia* après huit semaines d'incubation dans les milieux sans phosphore, phosphate tricalcique (TCP), complet (P soluble) et fluorapatite. Les barres d'erreur représentent l'écart-type. 14

Figure 1.3 Densités optiques pour les extraits de protéines de *H. crustuliniforme*, *S. granulatus*, *T. scalpturatum* et *C. finlandia* après huit semaines d'incubation. Les barres d'erreur représentent l'écart-type. 15

Figure 1.4 Biomasses sèches de *H. crustuliniforme*, *S. granulatus*, *S. tomentosus*, *T. scalpturatum*, *C. finlandia*, *P. involutus* et *B. ornatipes* après 8 semaines d'incubation. Les barres d'erreur représentent l'écart-type. 16

Figure 1.5 Densités optiques pour les extraits de protéines de *H. crustuliniforme*, *S. granulatus*, *S. tomentosus*, *T. scalpturatum*, *C. finlandia*, *P. involutus* et *B. ornatipes* après 8 semaines d'incubation. Les barres d'erreur représentent l'écart-type. 17

Figure 1.6 Concentrations en potassium des milieux de culture de *H. crustuliniforme*, *S. granulatus*, *S. tomentosus*, *T. scalpturatum*, *C. finlandia*, *P. involutus* et *B. ornatipes* après 8 semaines d'incubation. Les lettres correspondent aux groupes de moyennes selon le test de Tukey (Tukey's HSD). Les barres d'erreur représentent l'écart-type. 18

Chapitre 2

Figure 2.1 Racines de *P. glauca* (Moench) portant le morphotype mycorhizien source de BSP. Noter les ectomycorhizes (astérisques) et le mycélium extraracinaire émanant des manchons fongiques (flèches). 24

Figure 2.2 Dispositif expérimental des milieux de culture bicompartimentés contraignant *L. bicolor* à explorer les deux compartiments pour obtenir tous les nutriments essentiels à sa croissance. Compartiment proximal : milieu gélosé sans phosphore (P), inoculum *L. bicolor* représenté par des ronds gris. Compartiment distal : milieu gélosé avec seulement 1- du phosphore soluble (P soluble), 2- de l'hydroxyapatite (HA), 3- du phosphore soluble + hydroxyapatite (P soluble+HA). Inoculums bactériens affichés par un rectangle noir : souches 168, 205 et 260. 29

Figure 2.3 Halos de clarification observables au pourtour et sous les colonies bactériennes. Les amendements sont le TCP (a) et le minerai de fluorapatite (b). Notez la différence de clarification obtenue entre les deux minerais. 32

- Figure 2.4 Migration des produits PCR des séquences 16S des BSP sur gel d'agarose pour les souches ayant solubilisé le minerai de fluorapatite sur milieu solide. L'amplification a été un succès pour 26 des 27 souches..... 33
- Figure 2.5 Arbre phylogénique illustrant les relations entre les souches de BSP associées à *Wilcoxina* sp., isolées sur milieux solide et liquide sélectifs, capables de solubiliser la fluorapatite..... 33
- Figure 2.6 Photographies en microscopie électronique à balayage montrant des cristaux de fluorapatite. (a) et (c) Cristaux de fluorapatite vierge présentant des arrêtes nettes. (b) et (d) Cristaux de fluorapatite après six heures d'incubation en présence de *Burkholderia* sp. souche 205. Les arrêtes sont corrodées (flèches) et l'attaque ne suit pas les plans atomiques avec la méthode de la goutte..... 35
- Figure 2.7 Cristaux de fluorapatite avant (a, c) et après (b, d) incubation en immersion pendant 22 heures en présence de *Burkholderia* sp. souche 205. L'image b montre le cristal de fluorapatite entièrement solubilisé. Les restes de la particule encore présentes sur le ruban conducteur sont des oxydes complexes. Dans l'image 2.7 d, les particules non altérées sont entièrement composées d'oxydes complexes. Ces cristaux de fluorapatite contiennent 1 % de fluor..... 36
- Figure 2.8 Spectre de réémission d'un cristal de fluorapatite observé par spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X. La particule de fluorapatite est majoritairement composée de calcium, phosphore et oxygène. Les traces de fer et de silice correspondent aux nanoparticules d'oxydes complexes présentes à la surface du cristal. Le signal du carbone provient de substitutions carbonatées. 37
- Figure 2.9 Cristaux de fluorapatite avant (a) et après (b) incubation en immersion pendant 23 heures en présence de *Burkholderia* sp. souche 205. Ces cristaux proviennent d'un minerai contenant 4 % de fluor. Les cristaux sont partiellement altérés et les patrons d'altération suivent les plans atomiques des cristaux. 37
- Figure 2.10 Reconstitution d'association entre *L. bicolor* et *Burkholderia* sp. souche 205. (a) *L. bicolor* en présence de *Burkholderia* sp. souche 205 dans le compartiment distal avec le traitement P soluble, hydroxyapatite. Encart, les hyphes de *L. bicolor* exemptes de BSP (b) *L. bicolor* en présence de *Burkholderia* sp. souche 205 sur le compartiment distal du traitement hydroxyapatite. Encart, les hyphes de *L. bicolor* recouvertes de BSP. 38
- Figure 2.11 Diamètre moyen des colonies de *Burkholderia* sp. souche 205, espèce inconnue souche 260 et *Curtobacterium* sp. souche 168 croissant en présence de *L. bicolor* sur les compartiment distaux contenant des sources de phosphore soluble (KH_2PO_4), insoluble (hydroxyapatite) ou les deux simultanément. Les barres d'erreur représentent l'écart-type. 39

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu mon directeur, le docteur Yves Piché, qui m'a accueilli dans son équipe au cours de mes études de premier cycle pour ensuite m'offrir l'opportunité de compléter mes études de deuxième cycle sous sa direction. Je le remercie de m'avoir accordé beaucoup de liberté dans la réalisation de ce projet. En second lieu, je tiens à exprimer ma gratitude envers mon codirecteur, le docteur J. André Fortin, pour la vision et la conviction dont il a fait preuve et qui ont été déterminantes dans l'initiation et la réalisation du projet.

Je souhaite souligner la contribution considérable du docteur Jean-Guy Catford, dont les connaissances techniques et théoriques ont été précieuses dans la réalisation de mes travaux. Je dois également mentionner les apports techniques inestimables de la docteure Salma Taktek et de madame Véronique Cloutier qui ont été déterminants dans l'orientation de mes expériences. Je souhaite aussi exprimer ma gratitude au Dr Nelson Thiffault pour son implication étroite dans le projet et particulièrement pour son assistance dans ma rédaction. Je dois de plus souligner l'aide de Chloé Vincent-Ageron, Mathieu Paradis et Gwenola Plougoulen pour leurs contributions au projet au cours de leurs stages au sein de notre équipe.

L'assistance des personnes suivantes a été grandement appréciée : Dr David Paré, Dr Hani Antoun, Dre Francine Tremblay, Dr Serge Sokolski, Dr Jean Bérubé, Dre Aïda Azaiez, Marie-Ève Beaulieu, André Gagné, Patrick Gagné, François Laroche, Marie-Andrée Paré, Alain Brousseau, Julien Ponchart, Martin Beaudoin Nadeau et François Couderc.

Je tiens à souligner la contribution financière du Centre d'étude de la forêt (CEF) pour son soutien à ma participation au congrès annuel de la Soil Science Society of America (SSSA 2015 annual meeting) et au colloque du CEF 2015. L'appui financier de l'association des étudiants en foresterie de l'Université Laval (AFOR) a été apprécié pour l'acquisition d'équipements utiles à mes travaux.

Finalement, je souhaite remercier ma famille pour leur support et leur encouragement au cours de la réalisation de ce projet.

Introduction générale

Symbiose ECM

La symbiose ectomycorhizienne (ECM) est une association entre un champignon supérieur et une plante vasculaire, habituellement ligneuse. Ce type de symbiose est apparu il y a environ 250 millions d'années (Fortin et al. 2015). Cette relation tire son nom de l'ectomycorhize, une structure comprenant trois éléments : un manchon de tissu fongique entourant la racine courte, une masse mycélienne proliférant entre les cellules épidermiques et corticales connue sous le nom de réseau de Hartig, puis un réseau mycélien extraracinaire, lequel connecte les racines de l'hôte végétal au sol et aux sporocarpes du partenaire fongique (Smith & Read 2008).

À nos latitudes, les essences hôtes majoritairement ectomycorhiziennes appartiennent aux *Pinaceae*, *Fagaceae*, *Salicaceae*, *Tiliaceae*, *Ulmaceae*, *Juglandaceae* et *Rosaceae*. Du côté du partenaire fongique, les taxons ectomycorhiziens sont surtout retrouvés chez les basidiomycètes laissant peu de place pour les associations avec les ascomycètes et les zygomycètes (Fortin et al. 2015). Il est fréquent de retrouver des dizaines d'espèces fongiques colonisant un seul système racinaire et qu'une seule plante hôte puisse être associée à des centaines d'espèces dans l'ensemble de son aire de distribution (Smith et Read 2008). De la même façon, une seule espèce fongique est capable de s'associer avec plusieurs essences végétales (*Ibid*). Par conséquent, autant les hôtes végétaux que les partenaires fongiques font preuve d'une faible spécificité. Les avantages de la symbiose ECM pour l'hôte végétal résident dans l'amélioration de la nutrition minérale (Landeweert et al. 2001), d'une meilleure tolérance à la sécheresse (Courty et al. 2010) et d'une résistance accrue aux agents pathogènes (Marx 1972). En échange, la plante doit transloquer au champignon une partie des sucres de la photosynthèse. L'allocation des produits photosynthétiques aux racines dépend de l'état nutritionnel de la plante. Plus spécifiquement, une carence en phosphore des parties aériennes favorise l'accumulation de sucres dans le phloème et ainsi un transfert vers les racines. À l'opposé, les carences en potassium et en magnésium causent une diminution de l'allocation en composés glucidiques (Rosenstock 2009). À l'échelle d'un peuplement, l'allocation en carbone aux racines et partenaires fongiques atteint son maximum lors de la fermeture de la voûte forestière, ce qui coïncide avec un pic de la croissance et des besoins en nutriments (Wallander et al. 2010). Par exemple, l'horizon organique d'un

peuplement de *Picea abies* contient approximativement 1000 kg de mycélium ECM par hectare alors que la biomasse racinaire s'élève à 2700 kg pour la même superficie (Wallander et al. 2001). Une telle biomasse fongique ECM concorde très bien avec l'allocation des sucres aux racines ectomycorhizées de l'ordre de 10 à 50 % de la quantité de carbone fixé par la photosynthèse (Wallander et al. 2010).

Absorption des nutriments par les champignons ECM

Les champignons ECM contribuent à la nutrition des arbres par leur capacité à explorer un grand volume de sol, accéder aux pores les plus fins, solubiliser et absorber les éléments nutritifs puis transporter ces derniers ainsi que l'eau sur de grandes distances (Garbaye 2013). La mise en disponibilité de l'azote et des éléments minéraux à partir de matière organique se fait au moyen de la libération d'enzymes extracellulaires telles les cellulases, phosphatases, chitinases et protéases (Pritsch et Garbaye 2011). Plusieurs champignons ECM auraient la faculté de se développer seuls en conditions axéniques. Il semble que cette capacité à puiser le carbone de la matière organique soit assez bien conservée compte tenu de l'étude rapportée chez *S. granulatus* en symbiose avec *Pinus contorta* (Cullings et al. 2008).

Par ailleurs, dans la matière organique, l'azote est présent sous forme de protéines, nucléotides, chitine et polypeptides complexés avec des substances phénoliques. L'azote de ces composés est accessible aux champignons ECM au moyen d'une dégradation enzymatique par les protéases et les chitinases (Uroz et al. 2013). Les champignons ECM assimileraient ainsi une large part de l'azote suite à la dégradation des acides aminés, sans avoir à compter sur l'absorption du nitrate et de l'ammonium présents en faibles quantités dans les sols forestiers (Smith et Read 2008). Quant au phosphore, celui-ci est disponible aux champignons ECM sous forme de phytates, nucléotides et phospholipides. L'accès aux phosphates présents dans ces substances organiques requière la libération de phosphatases dans le substrat puisque les champignons peuvent seulement absorber le phosphore sous forme d'ion phosphate (Smith et Read 2008).

Altération minérale par les champignons ECM

Les champignons ECM peuvent dissoudre les minéraux par la libération de protons, de dioxyde de carbone, d'acides organiques de faible poids moléculaire et par la production de sidérophores (Hoffland et al. 2004). Les acides organiques de faible poids moléculaire remplissent un rôle de ligand. Ils forment des précipités avec les cations bi et

trivalents tels Ca^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} et désaturent de cette façon la solution de sol en ces éléments, ce qui favorise la dissolution additionnelle des minéraux. Les sidérophores remplissent un rôle semblable pour les cations trivalents. Cette immobilisation des cations limite également la reprécipitation des phosphates libérés suite à l'altération d'apatite (van Schöll et al. 2008). Le relâchement d'acides organiques favorise la libération de K et Mg de leurs couches atomiques et change ainsi la structure et composition des minéraux qui contiennent ces éléments (Landeweert et al. 2001). Les sources d'azote disponibles aux champignons ECM influencent la libération d'acides organiques et de protons lors d'essais d'altération *in vitro* (Jentschke & al. 2001; Mahmood et al. 2001, Reyes et al. 1998). L'ammonium provoque une libération automatique de protons dans le milieu afin de maintenir le potentiel de membrane cytoplasmique, tandis que les nitrates inhibent le relâchement d'acides organiques. Les attaques chimiques produisent des altérations caractéristiques des minéraux. Pour les feldspaths, les hyphes des champignons ECM creusent des tunnels (Hoffland et al. 2003) et des tranchées (Saccone et al. 2012) visibles en microscopie électronique à balayage.

Altération minérale par les bactéries

Certaines bactéries du sol sont aptes à coloniser et dissoudre les minéraux au même titre que les champignons ECM. Elles accomplissent ce rôle au moyen de la libération d'acide gluconique et de sidérophores (Uroz et al. 2009). Ces bactéries altératrices sont typiquement retrouvées concentrées dans l'environnement immédiat d'hyphes fongiques et de racines (Uroz et al. 2011).

Associations champignons ECM-bactéries

Plusieurs espèces de champignons ECM ayant démontré une capacité faible ou inexistante à dissoudre des minéraux en conditions axéniques sont fréquemment retrouvés en milieu naturel (Calvaruso et al. 2010). Dans de telles conditions, il serait plausible que ces espèces à mobilisation restreinte des nutriments soient limitées à un rôle d'absorption et de transport. Un exemple d'espèce phare remplissant cette fonction écologique est nul autre que celui du champignon modèle ECM *Laccaria bicolor*. Gardons en mémoire que la dominance observée chez *L. bicolor* en milieu naturel semble être reliée à sa capacité d'héberger des souches bactériennes capables de solubiliser l'apatite (Frey-Klett et al. 2005). En condition symbiotique, les champignons ECM reçoivent de l'hôte végétal le carbone fixé par la photosynthèse et une partie de celui-ci est retransmis

aux bactéries de l'hyphosphère (Rygielwicz et Andersen, 1994). Les champignons ECM contribueraient ainsi à l'altération des minéraux en alimentant le microbiote solubilisateur de minéraux associé étroitement aux hyphes. En effet, ce phénomène a été confirmé par une amélioration de la nutrition en magnésium de *Pinus sylvestris* colonisé par *Scleroderma citrinum*, lui-même associé à la bactérie *Collimonas* sp., lorsque la biotite est la seule source de magnésium disponible (Koele et al. 2009). Cette même expérience a montré un effet similaire entre *L. bicolor* et *Burkholderia glathei*. Par ailleurs, les expériences d'isolement de bactéries solubilisatrices des sols forestiers montrent que les genres *Collimonas* et *Burkholderia* sont les plus performants en altération minérale et qu'ils sont retrouvés en plus grandes concentrations dans la rhizosphère d'arbres ectomycorhiziens (Uroz et al. 2011). En plus de posséder des capacités d'altération minérale, certaines espèces du genre *Burkholderia* influencent l'évolution des communautés bactériennes hyphosphériques. Par exemple, *Burkholderia terrae* produit un biofilm sur les hyphes de *Lyophyllum* sp. et entraîne avec elle un cortège d'espèces bactériennes (Warmink et al. 2010). Cette capacité d'assister la comigration d'autres espèces bactériennes est répandue chez le genre *Burkholderia* (Nazir et al. 2012).

Il est évident de prétendre ici que les champignons ECM et leurs bactéries associées sont ubiquitaires dans les forêts de conifères dominant les paysages québécois. Plusieurs études *in vitro* effectuées sur les associations ectomycorhiziennes suggèrent que la nutrition phosphatée et potassique des *Pinaceae* doit impliquer en plus des ectomycorhizes une association étroite avec les bactéries du sol. En principe, cette association tripartite « arbre-champignon-bactérie » favorise l'accès aux nutriments à partir du sol minéral en autant que l'arbre puisse fournir les produits photosynthétiques à ses partenaires fongiques et bactériens. À notre connaissance, aucune étude n'a été conduite dans l'Est du Canada pour montrer la mobilisation du P et du K des sols forestiers par les arbres en faisant appel à l'altération fongique et bactérienne de l'apatite et de l'orthoclase. Ce contexte original nous a amené à mettre au point quelques approches *in vitro* afin de montrer l'efficacité des champignons ECM et de leurs bactéries associées à solubiliser et à utiliser le P et le K directement sous sa forme minérale.

Ainsi, les objectifs de notre étude étaient i) d'observer *in vitro* le rôle de quelques champignons ECM communément associés aux *Pinaceae* dans l'altération de la fluorapatite et de l'orthoclase et ii) de caractériser la diversité taxinomique et fonctionnelle des bactéries solubilisatrices de phosphates associées aux partenaires fongiques de

Picea glauca. Deux approches expérimentales ont été employées. La culture axénique de champignons ECM en milieu liquide sélectif a permis d'observer l'altération des minéraux et l'utilisation des nutriments mobilisés à partir de ces derniers. Une diversité de bactéries solubilisatrices de phosphates a été obtenue par isolement sur milieu sélectif solide et par enrichissement en milieu liquide. Les souches bactériennes sélectionnées ont été identifiées et leur capacité à solubiliser l'apatite a été documentée en microscopie électronique à balayage. Finalement, le caractère indispensable de l'association en conditions oligotrophiques d'un champignon ECM et de bactéries solubilisatrices de phosphates a été démontré en microcosme.

Chapitre 1 : Mise en disponibilité du phosphore et du potassium à partir de roches ignées : des champignons ectomycorhiziens associés aux Pinaceae solubilisent la fluorapatite et l'orthoclase

Introduction

Depuis deux décennies, l'altération minérale par les champignons ectomycorhiziens (ECM) s'est imposée comme mécanisme dominant la mise en circulation de nutriments essentiels en forêt boréale (Finlay et al. 2009). Le potassium, calcium, phosphore et magnésium de sources insolubles (apatite, feldspath, biotite, microcline, phlogopite) sont rendus disponibles aux champignons ECM lorsque ceux-ci libèrent des protons, des acides organiques et du dioxyde carbone (Hoffland et al. 2004; Rosling et Finlay 2005; Rosling 2009; Courty et al. 2010). Les ions libérés sont rapidement absorbés par le champignon ECM puis transmis à l'hôte végétal. Ce dernier octroie selon ses besoins des produits de la photosynthèse au champignon (Rosenstock 2009).

Dans les sols, la réactivité des minéraux aux attaques chimiques est fonction de leur chimie et de leurs propriétés cristallines (Elliott 2013). Parmi les minéraux phosphatés retrouvés en conditions naturelles, la fluorapatite est la moins soluble (Dorozhkin 2011) et représente le minéral de sa famille le plus résistant à la dissolution par les microorganismes. Pour cette raison, la fluorapatite devrait être employée dans les tests de dissolution afin d'obtenir des résultats pertinents pour l'ensemble des apatites. D'autre part, les silicates sont la principale source de potassium dans les roches ignées. Dans cette famille figurent les feldspaths potassiques, spécialement la microcline et l'orthoclase, lesquels sont aisément dégradés par les champignons ECM (Hoffland et al. 2003). Outre la composition chimique, la susceptibilité des minéraux à l'altération par les organismes dépend initialement de la taille des particules, de la rugosité de leurs surfaces, et de la présence d'égratignures et de microporosités (Courty et al. 2010).

Les champignons ECM associés aux *Pinaceae* jouent un rôle prépondérant dans l'altération minérale en conditions naturelles (Landeweert et al. 2001; Hoffland et al. 2004; Rosenstock 2009). Parmi les espèces fongiques ECM réputées pour altérer les minéraux, quelques unes d'entre elles présentent tous les mécanismes actifs impliqués dans la dissolution des roches. Par exemple, *Paxillus involutus* exsude de grandes quantités d'acides organiques (Van Scholl 2006) et altère des silicates potassiques et des minéraux phosphatés (Paris et al. 1996; Arvieu et al. 2003; Rosling et Finlay 2005). Quant à

Hebeloma crustuliniforme il s'est avéré utile comme source d'exsudats pour solubiliser le γ - Al_2O_3 , un minéral représentatif des minéraux aluminiques tels le feldspath potassique (Ochs et al. 1993). Vient ensuite *Suillus granulatus* qui a également montré une aptitude à dissoudre l'apatite en milieu naturel (Wallander et al. 2003) et en conditions *in vitro* (Courty et al. 2010). Ajoutons à cette liste courte de champignons ECM *Tricholoma scalpturatum* et *Cadophora finlandia* qui sont des candidats ignorés jusqu'ici quant à leurs capacités d'altération, mais potentiellement efficaces à cette fin puisqu'ils proviennent de sites perturbés au stade initial de succession primaire (Nadeau 2015).

Sur la base de notre hypothèse que les minéraux du sol minéral sont des sources de P et K largement accessibles aux champignons ECM associés aux *Pinaceae*, nous avons prédit que *H. crustuliniforme*, *S. granulatus*, *T. scalpturatum* et *C. finlandia* seraient aptes à solubiliser la fluorapatite et l'orthoclase et à utiliser les nutriments libérés pour leur croissance. Le développement des souches aptes à l'altération de ces minéraux sera possible lorsque l'élément limitant la croissance est seulement disponible sous forme insoluble. La capacité à utiliser les sources insolubles de P et K se traduirait par une production de biomasse supérieure au témoin sans sources de P et de K. Ainsi, notre objectif général était de vérifier, en conditions *in vitro*, les capacités de solubilisation de la fluorapatite et de l'orthoclase par des espèces ECM communément retrouvées en association avec les *Pinaceae*. Les objectifs spécifiques étaient, pour les souches ECM sélectionnées, de i) observer la solubilisation de fluorapatite et d'orthoclase, ii) quantifier la biomasse produite en fonction de la source de P ou K disponible dans le milieu, et iii) quantifier la quantité de protéines produites en fonction de la source de P ou K disponible dans le milieu.

Méthodes

Altération de la fluorapatite par les champignons ECM

Nous avons effectué des essais d'altération de la fluorapatite avec quatre souches ECM provenant de la collection du Centre d'étude de la forêt (CEF-Université Laval). Les champignons ECM sélectionnés de la collection CEF *H. crustuliniforme* 5247, *S. granulatus* 9521, *T. scalpturatum* MBN 0213 et *C. finlandia* MBN 0213 ont été préalablement propagés sur un milieu GYME en boîtes de Petri. À température de la pièce, l'incubation s'est faite en milieu liquide et sous agitation réglé à 100 tpm (agitateur orbital G10 Gyrotory Shaker (New-Brunswick Scientific, Einfield, Connecticut). Le milieu

expérimental employé pour observer une dissolution était basé sur le Melin-Norkrans modifié (MNM) (Marx 1969). Ce milieu était constitué de 0.15 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.025 g/L NaCl, 5 g/L glucose, 0.26 g/L KCl, 0.05 g/L $CaCl_2$, 1 ml/L de solution mère de microéléments, 0.5 ml/L FeEDTA, 100 μ g/L thiamine HCl et 0.340 g/L l-alanine. Pour les besoins expérimentaux, la source de phosphore apportée au milieu MNM comprenait respectivement trois traitements i) 0.5 g/L KH_2PO_4 , ii) 2.5 g/L phosphate tricalcique (TCP) ou iii) ou 2.5 g/L fluorapatite micronisée à 50 μ m (Ariane Phosphate, Saguenay) contenant 1 % de fluor.

Les milieux ont été stérilisés à l'autoclave avec un cycle liquide de 20 minutes, après quoi une solution d'alanine filtrée a été ajoutée (Mahmood et al. 2001). Les amendements minéraux ont été lavés à l'eau distillée avant incorporation dans les milieux de culture. L'unité expérimentale était un erlenmeyer de 125 ml rempli à 50 ml. Ces flacons étaient obturés avec des bouchons autoclavables et poreux afin de permettre les échanges gazeux avec l'atmosphère. Le minerai de fluorapatite a d'abord été ajouté à la solution d'éléments minéraux destinée aux témoins sans phosphates insolubles. Cette solution était ensuite autoclavée et le minerai retiré. Cette précaution visait à assurer que le titrage des composés insolubles par le milieu destiné aux témoins non amendés libère une quantité d'élément limitatif égale à celle retrouvée dans les unités contenant l'inoculum et les sources insolubles de phosphore.

Chaque traitement a été répété quatre fois. Les milieux ont été inoculés avec chacun deux pastilles de 5 mm de diamètre prélevés au pourtour d'une colonie âgée d'un mois et déposées dans les milieux de culture. Chaque espèce de champignon était mise en culture dans les quatre milieux MNM différents selon la source de phosphore, pour un total de 16 combinaisons. Une manipulation préliminaire a été menée pour confirmer que la simple acidité du milieu est insuffisante pour titrer l'amendement jusqu'à provoquer sa dissolution complète.

Après huit semaines d'incubation, les biomasses fongiques ont été récoltées et lyophilisées afin de quantifier la biomasse produite et son contenu protéique. Les protéines ont été extraites avec un tampon phosphate (Cold Spring Harbor Protocols 2006) dans un ensemble mortier et pilon après fragilisation à l'azote liquide. Le contenu en protéines a été estimé à l'aide d'une trousse « Bio-Rad Protein Assay » reproduisant l'approche de la méthode de Bradford (Microassay Bio-Rad, Hercules California) avec

l'utilisation d'un spectrophotomètre de modèle Ultrospec II (Pharmacia LKB Biochrom, Cambridge). Une précipitation des protéines a été employée dans le but d'éliminer les pigments fongiques. Les protéines ont été précipitées à l'aide d'acide trichloroacétique et d'acide déoxycholique, à des concentrations finales de 60 mg/mL et 250 µg/mL respectivement. Les précipités ont ensuite été remis en solution dans le tampon phosphate.

Une évaluation visuelle de la dissolution des cristaux permettait de valider que les souches étaient aptes à altérer l'amendement minéral. Toutefois, cette méthode n'était pas concluante lorsque la solution demeurait trouble en raison d'une dissolution incomplète. Afin d'observer l'usage des éléments libérés par la solubilisation des minéraux, les biomasses sèches et densités optiques à 595 nm des extraits de protéines ont été utilisées comme proxy de la croissance et ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA) selon un plan d'expérience en blocs complets. Un dosage des protéines à l'aide d'un standard tel l'albumine n'était pas possible en raison de la présence persistante de pigments dans les échantillons. Les densités optiques des échantillons de protéines fongiques correspondaient parfois à des concentrations dépassant la solubilité maximale du standard. Les données ont été examinées pour en vérifier la normalité et l'homogénéité des variances à l'aide des méthodes graphiques standards. Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide de la procédure GLM du logiciel SAS v.9.32 (SAS Institute Inc.). Un seuil $\alpha = 0.05$ a été utilisé pour déterminer si les effets étaient significatifs. En présence d'un F significatif de l'ANOVA, les moyennes ont été comparées à l'aide de contrastes orthogonaux a priori afin de répondre aux trois questions suivantes : les espèces sélectionnées présentent-elles des différences de croissance en fonction de i) la présence ou absence de phosphore soluble dans le milieu? ii) la présence ou absence de phosphore insoluble dans le milieu? iii) la composition et de la structure de sources insolubles de phosphore dans le milieu? Une masse de matière sèche moyenne significativement plus élevée pour les traitements «TCP» et «fluorapatite» que pour le traitement «sans phosphore» était interprétée comme confirmant indirectement qu'il y avait eu altération puisque l'élément limitant la croissance fongique était obtenu de la source insoluble.

Altération de l'orthoclase par les champignons ECM

En plus des quatre champignons ECM testés dans la partie «fluorapatite», *H. crustuliniforme*, *S. granulatus*, *T. scalpturatum* et *C. finlandia*, trois autres souches ECM de la collection CEF, *Paxillus involutus* UAMH 8235, *Suillus tomentosus* UAMH 6252 et *Boletus ornatipes* ont été ajoutées lors des essais avec le feldspath potassique monoclinique ou orthoclase. *B. ornatipes* a été récemment isolé d'un carpophore provenant d'une pinède grise (lat. 49°20'57.5" N; long. 71°58'23.2" O) de la région de Dolbeau-Mistassini (Québec). La propagation des souches et l'incubation des unités expérimentales a été menée de la même façon que pour l'expérience d'altération de la fluorapatite. Le milieu expérimental employé pour observer une dissolution était également basé sur le Melin-Norkrans modifié (MNM) (Marx 1969). Ce milieu était constitué de 0.15 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.025 g/L NaCl, 5 g/L glucose, 0.5 g/L NaH_2PO_4 , 0.05 g/L $CaCl_2$, 1 ml/L de solution microéléments, 0.5 ml/L FeEDTA, 100 µg/L thiamine HCl et 0.340 g/L l-alanine. Pour répondre aux besoins de l'expérience la source de potassium apportée au milieu MNM comprenait respectivement deux traitements i) 0.26 g/L KCl, ii) 2.5 g/L orthoclase micronisée à 45 µm (Ceramco, Ottawa, Ontario).

Chaque traitement a été répété quatre fois. Chaque espèce de champignon était mise en culture dans les trois milieux MNM différents selon la source de potassium, pour un total de 21 combinaisons. Une manipulation préliminaire a été menée pour confirmer que la simple acidité du milieu est insuffisante pour titrer l'orthoclase jusqu'à provoquer sa dissolution complète. La préparation des biomasses fongiques à des fins de pesée et de quantification du contenu en protéines a été faite de la même façon que pour l'expérience de solubilisation de fluorapatite.

Brièvement, une évaluation visuelle de la dissolution des cristaux permettait de valider que les souches étaient aptes à altérer l'orthoclase. Les biomasses sèches et densités optiques à 595 nm des extraits de protéines ont été utilisées comme proxy de la croissance et analysées à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) selon un plan d'expérience en blocs complets. En présence d'un F significatif de l'ANOVA, les moyennes ont été comparées à l'aide de contrastes orthogonaux a priori afin de répondre aux deux questions suivantes : les espèces ECM sélectionnées présentent-elles des différences de croissance en fonction de i) la présence ou absence de potassium soluble

dans le milieu? ii) la présence d'une source insoluble de potassium ou de l'absence de potassium dans le milieu?

Une analyse du contenu en potassium des milieux de culture a été effectuée après huit semaines d'incubation. Les concentrations en potassium ont été déterminées par spectrométrie de masse par torche à plasma (Optima 4300 DV, Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts) et analysées à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) selon un plan d'expérience en blocs complets. En présence d'un F significatif de l'ANOVA, les moyennes ont été comparées à l'aide des contrastes orthogonaux a priori afin de discerner la présence de différences significatives entre la concentration en potassium des milieux orthoclase + champignon et celle du milieu orthoclase sans champignon pour les sept espèces ECM étudiées. Les données ont été examinées pour en vérifier la normalité et l'homogénéité des variances à l'aide des méthodes graphiques standards. Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide de la procédure GLM du logiciel SAS v.9.32 (SAS Institute Inc.). Un seuil $\alpha = 0.05$ a été utilisé pour déterminer si les effets étaient significatifs. Afin de comparer les comportements de mise en disponibilité et d'absorption du potassium entre les espèces, le test HSD de Tukey a été effectué entre les concentrations de potassium des milieux orthoclase + champignon des différentes espèces.

Résultats

Altération de la fluorapatite par quatre souches ECM

Les quatre espèces ECM, *H. crustuliniforme*, *S. granulatus*, *T. sculpturatum* et *C. finlandia*, ont poussé dans les milieux sans phosphore (P-), phosphate tricalcique (TCP), complet (P soluble) et fluorapatite. Les milieux TCP et fluorapatite ont été entièrement clarifiés (Fig. 1.1) par les quatre mêmes espèces qui se sont développées. Les contrastes des biomasses (Tableau 1.1) produites dans les milieux sans phosphore vs. avec phosphore soluble montrent que *H. crustuliniforme* et *S. granulatus* ont des développements semblables peu importe la présence ou l'absence de phosphore dans le milieu. À l'inverse, *T. sculpturatum* et *C. finlandia* ont produit une biomasse significativement plus élevée (Fig. 1.2) lorsqu'ayant accès à une source de phosphore soluble par rapport à aucune source. Les quatre espèces s'étant développées ont produit des quantités de biomasse significativement plus élevées lorsque la seule source de

phosphore disponible était le minéral de fluorapatite par rapport à une absence complète de phosphore. Le type de source insoluble de phosphore n'a pas d'influence sur la croissance fongique. En effet, il n'y a pas de résultat significatif pour les contrastes entre les biomasses produites selon que la source de phosphore est le TCP ou la fluorapatite (Tableau 1.1).

Les effets significatifs observés pour les analyses de protéines (Tableau 1.1, Fig. 1.3) sont une densité optique plus faible chez *S. granulatus* en présence de phosphore soluble par rapport à sans phosphore, et l'inverse de cet effet chez *T. sculpturatum*. Également, *C. finlandia* présentait une densité optique significativement plus faible lorsque cultivé en présence de TCP plutôt que de fluorapatite.

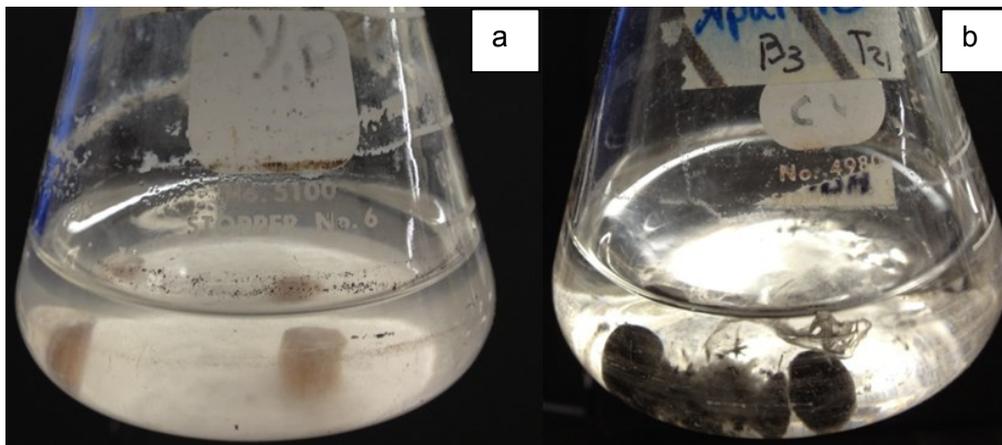


Figure 1.1 Clarification de milieu amendé en fluorapatite par *C. finlandia*. (a) Milieu de culture au moment de l'inoculation. Les particules de fluorapatite en suspension rendent le milieu trouble. (b) Colonies de *C. finlandia* après huit semaines d'incubation en présence de fluorapatite. L'amendement minéral a été dissout et le milieu est clair.

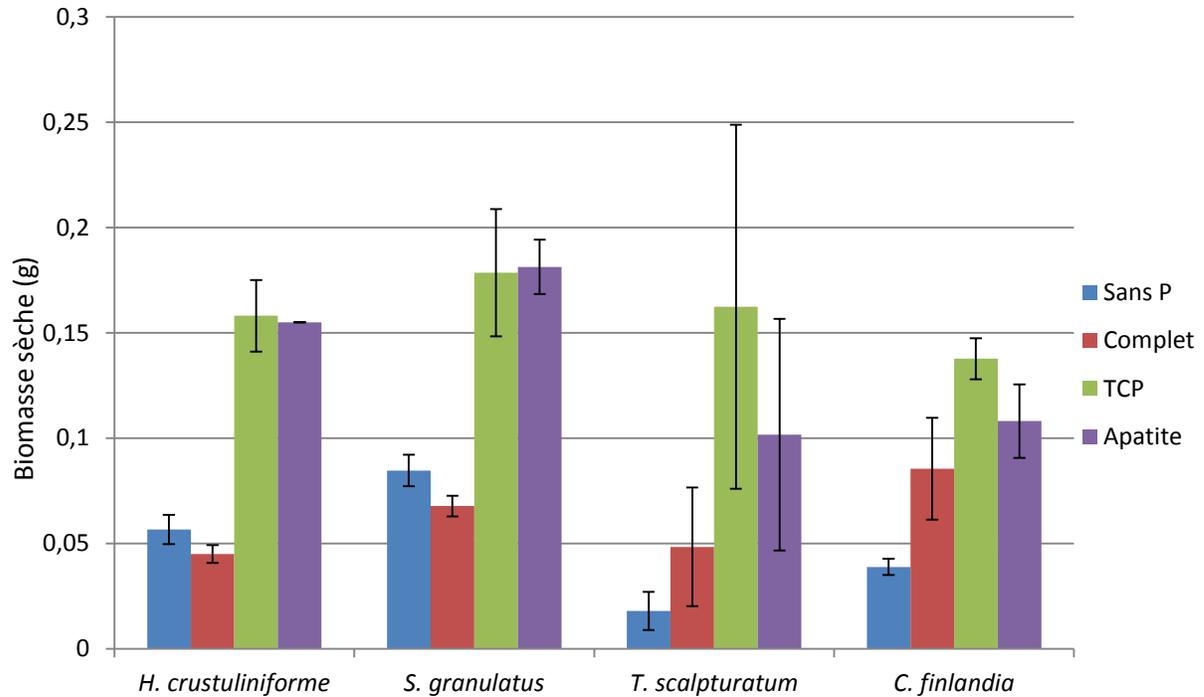


Figure 1.2 Biomasses sèches de *H. crustuliniforme*, *S. granulatus*, *T. scalpturatum* et *C. finlandia* après huit semaines d'incubation dans les milieux sans phosphore, phosphate tricalcique (TCP), complet (P soluble) et fluorapatite. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Tableau 1.1 Résultats des contrastes orthogonaux comparant les biomasses sèches et densités optiques pour les extraits de protéines de *H. crustuliniforme*, *S. granulatus*, *T. scalpturatum* et *C. finlandia* après huit semaines d'incubation dans les milieux sans phosphore (P-), phosphate tricalcique (TCP), complet (P soluble) et fluorapatite.

Contraste	Espèce	Biomasse Pr > F	Densité optique Pr > F
P- vs. P soluble	<i>H. crustuliniforme</i>	0.3376	0.3132
	<i>S. granulatus</i>	0.3521	0.0349
	<i>T. scalpturatum</i>	0.0004	0.0429
	<i>C. finlandia</i>	0.0022	0.3361
P- vs. fluorapatite	<i>H. crustuliniforme</i>	0.0242	0.5101
	<i>S. granulatus</i>	0.0022	0.6271
	<i>T. scalpturatum</i>	<.0001	0.0550
	<i>C. finlandia</i>	<.0001	0.5286
TCP vs. fluorapatite	<i>H. crustuliniforme</i>	0.6766	0.5587
	<i>S. granulatus</i>	0.9179	0.5147
	<i>T. scalpturatum</i>	0.1554	0.6786
	<i>C. finlandia</i>	0.2801	0.0447

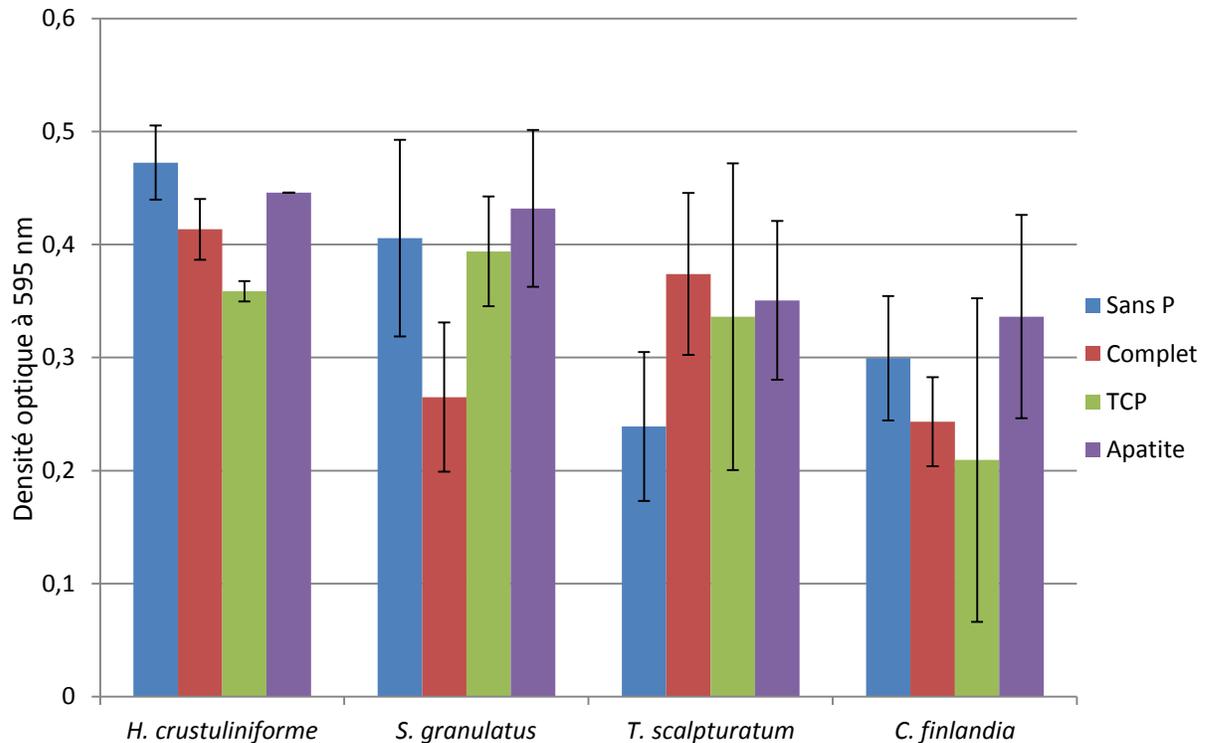


Figure 1.3 Densités optiques pour les extraits de protéines de *H. crustuliniforme*, *S. granulatus*, *T. sculpturatum* et *C. finlandia* après huit semaines d'incubation. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Altération de l'orthoclase par sept souches ECM

Les sept espèces *H. crustuliniforme*, *S. granulatus*, *S. tomentosus*, *T. sculpturatum*, *C. finlandia*, *P. involutus* et *B. ornatipes* ont poussé dans les milieux sans potassium (K-), orthoclase et complet (K soluble). Toutes ces espèces ont clarifié le milieu amendé en orthoclase. *H. crustuliniforme* a produit significativement plus de biomasse lorsque cultivé dans un milieu sans potassium par rapport au milieu contenant du potassium soluble (Fig. 1.4, Tableau 1.2). L'effet inverse a été observé chez *B. ornatipes*, lequel a produit significativement plus de biomasse lorsque le potassium était disponible sous forme soluble, et *S. tomentosus* et *P. involutus* lorsque l'orthoclase était la source de potassium. Les extraits de protéines de *C. finlandia* présentaient une densité optique significativement plus élevée lorsque le milieu était déficient en potassium. La présence de potassium influençait les densités optiques pour cette dernière espèce (Fig. 1.5), mais sans que la nature soluble ou insoluble de la source de potassium n'ait d'effet.

Il y avait des différences significatives entre les espèces ECM quant aux concentrations en potassium retrouvées dans les milieux contenant l'orthoclase. *S. granulatus* a libéré les plus grandes quantités de potassium (Fig. 1.6), suivi par *B. ornatipes*, et les valeurs obtenues pour ces espèces diffèrent significativement (Tableau 1.3) de celles retrouvées dans le milieu témoin orthoclase sans champignon. L'autre espèce se distinguant significativement des valeurs du témoin sans champignon est *T. sculpturatum*, cette fois significativement inférieure. *H. crustuliniforme*, *S. tomentosus* et *C. finlandia* ne présentaient pas de concentrations en potassium significativement différentes du témoin sans champignon.

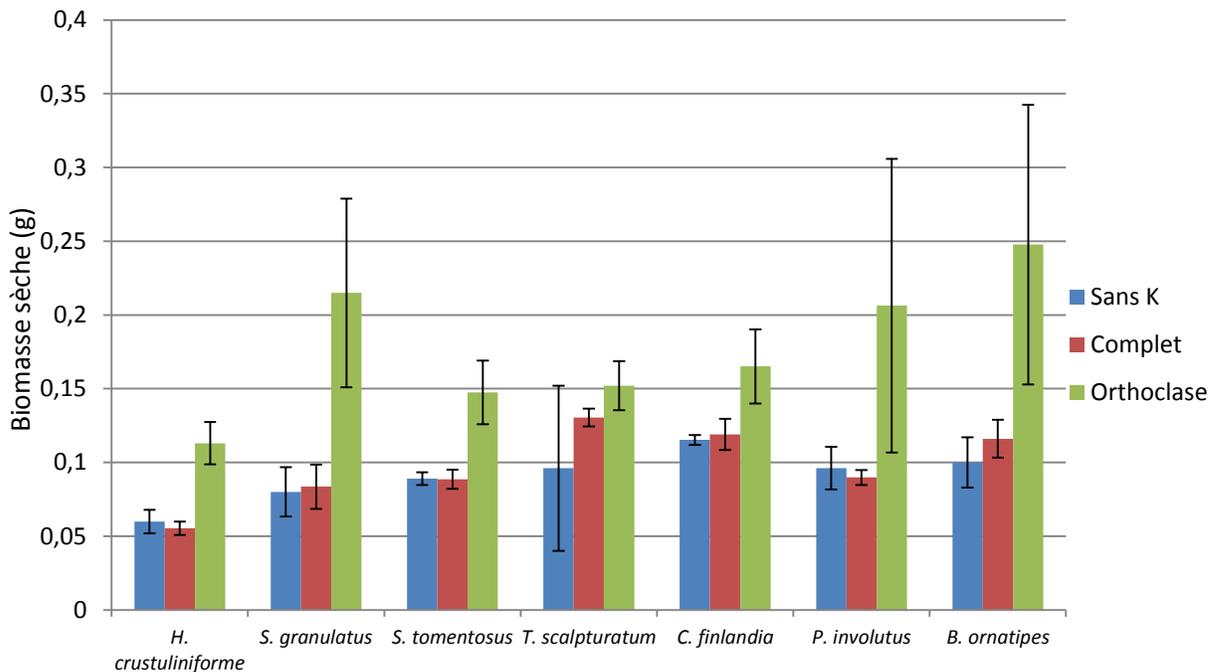


Figure 1.4 Biomasses sèches de *H. crustuliniforme*, *S. granulatus*, *S. tomentosus*, *T. sculpturatum*, *C. finlandia*, *P. involutus* et *B. ornatipes* après 8 semaines d'incubation. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Tableau 1.2 Résultats des contrastes orthogonaux comparant les biomasses sèches et des densités optiques pour les extraits de protéines de *H. crustuliniforme*, *S. granulatus*, *S. tomentosus*, *T. scalpturatum*, *C. finlandia*, *P. involutus* et *B. ornatipes* après 8 semaines d'incubation dans les milieux sans potassium (K-), complet (K soluble) et orthoclase.

Contraste	Espèce	Biomasse Pr > F	Densité optique Pr > F
K- vs. K soluble	<i>H. crustuliniforme</i>	0.0237	0.2976
	<i>S. granulatus</i>	0.3692	0.9625
	<i>S. tomentosus</i>	0.7595	0.5233
	<i>T. scalpturatum</i>	0.1189	0.5450
	<i>C. finlandia</i>	0.3855	0.0187
	<i>P. involutus</i>	0.3345	0.5199
	<i>B. ornatipes</i>	<.0001	0.2002
K- vs. orthoclase	<i>H. crustuliniforme</i>	0.0925	0.2839
	<i>S. granulatus</i>	0.2640	0.3118
	<i>S. tomentosus</i>	<.0001	0.6284
	<i>T. scalpturatum</i>	0.5147	0.9096
	<i>C. finlandia</i>	0.2112	0.2803
	<i>P. involutus</i>	0.0056	0.2695
	<i>B. ornatipes</i>	0.1184	0.4015

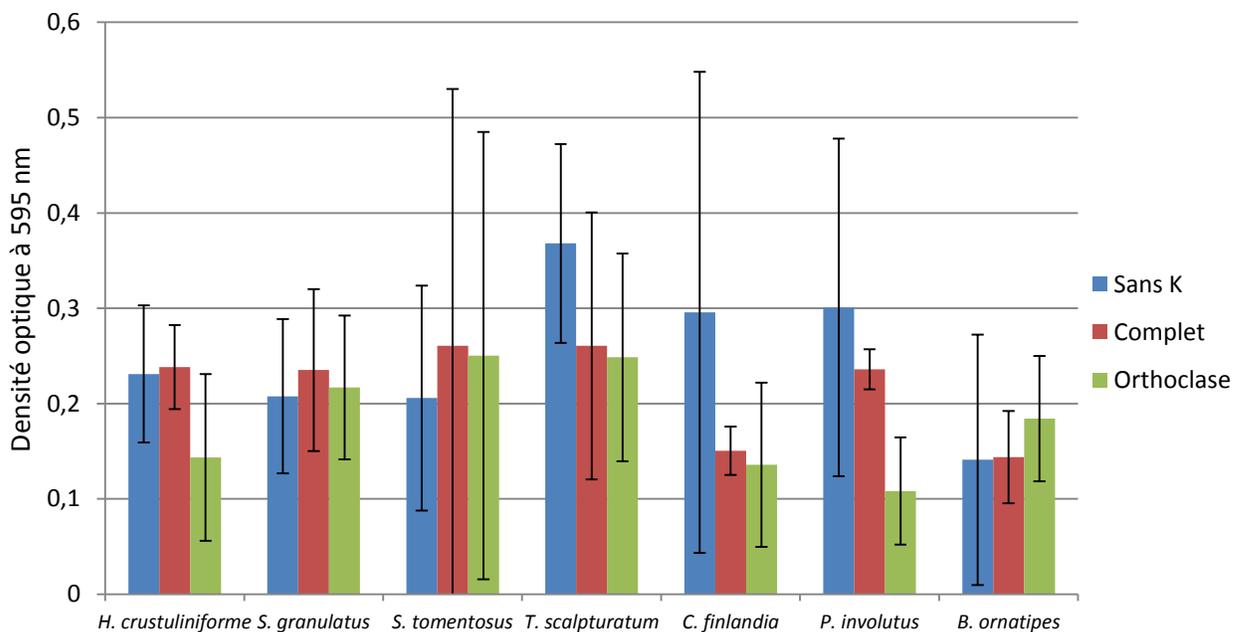


Figure 1.5 Densités optiques pour les extraits de protéines de *H. crustuliniforme*, *S. granulatus*, *S. tomentosus*, *T. scalpturatum*, *C. finlandia*, *P. involutus* et *B. ornatipes* après 8 semaines d'incubation. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

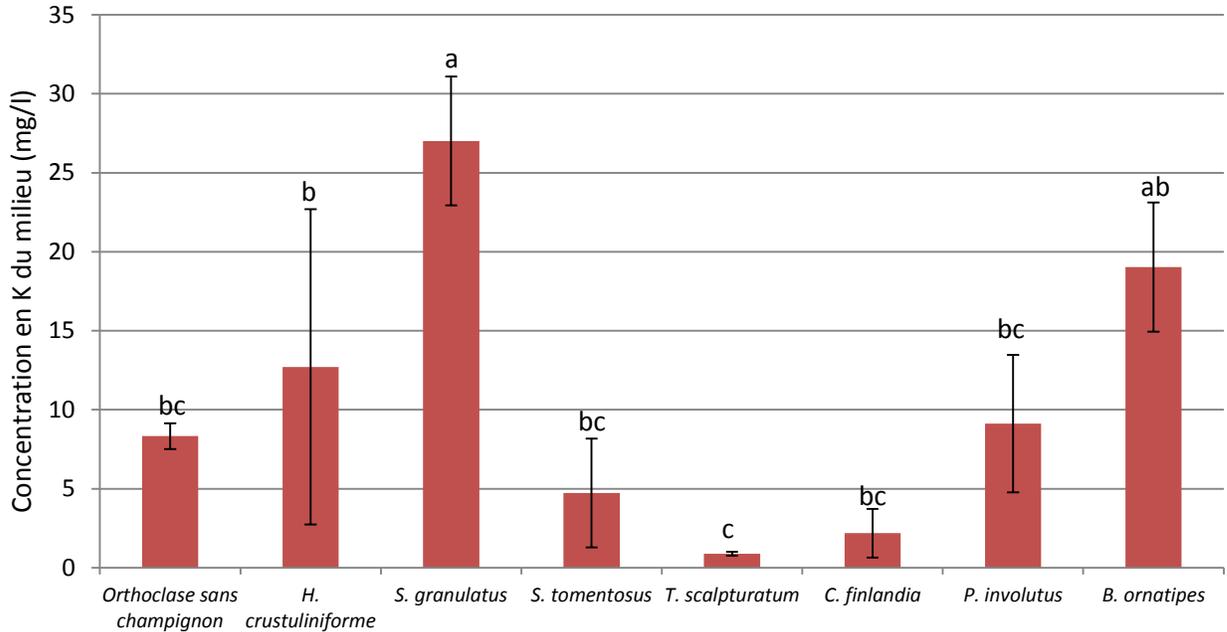


Figure 1.6 Concentrations en potassium des milieux de culture de *H. crustuliniforme*, *S. granulatus*, *S. tomentosus*, *T. scalpturatum*, *C. finlandia*, *P. involutus* et *B. ornatipes* après 8 semaines d'incubation. Les lettres correspondent aux groupes de moyennes selon le test de Tukey (Tukey's HSD). Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Tableau 1.3 Résultats des contrastes orthogonaux comparant les concentrations en potassium des milieux contenant l'orthoclase après 8 semaines d'incubation selon la présence ou absence de champignon.

Contraste	Espèce	Pr > F
Champignon vs. sans champignon	<i>H. crustuliniforme</i>	0.2012
	<i>S. granulatus</i>	<.0001
	<i>S. tomentosus</i>	0.4439
	<i>T. scalpturatum</i>	0.0367
	<i>C. finlandia</i>	0.0793
	<i>P. involutus</i>	0.8824
	<i>B. ornatipes</i>	0.0044

Discussion

Nous avons déterminé que les champignons ECM communément associées aux *Pinaceae* sont aptes à altérer la fluorapatite et l'orthoclase et d'utiliser les nutriments relâchés pour leur propre croissance. La solubilisation de la fluorapatite en milieu liquide a révélé que *H. crustuliniforme*, *S. granulatus*, *T. scalpturatum* et *C. finlandia* clarifient complètement un milieu amendé en minéraux phosphatés insolubles peu importe la nature

cristalline ou non de l'amendement. En effet, il n'y avait pas de résultat significatif pour les contrastes entre les biomasses produites selon que la source de phosphore était le TCP ou la fluorapatite. Cela s'expliquerait par le fait que les espèces ECM à l'étude sont aussi aptes à solubiliser la fluorapatite que le TCP, malgré la résistance du minerai cristallin aux attaques chimiques dépassant largement celle du solide amorphe (Dorozhkin 2011). La démonstration a été faite que *H. crustuliniforme* et *S. granulatus* mettent en disponibilité à partir de sources insolubles des quantités de phosphore dépassant leurs besoins. Ainsi, ces espèces peuvent être qualifiées de microtrophiques pour le phosphore puisque la quantité disponible dans leurs pastilles d'inoculum suffisait à atteindre une croissance limitée par d'autres nutriments du milieu de culture. Cela fait en sorte que la libération d'acides organiques par ces deux espèces dans les conditions de notre expérience n'était pas nécessaire à l'obtention de phosphore pour supporter leur nutrition phosphatée. Pour cette raison, l'activité de dissolution du TCP et de la fluorapatite observée dans notre étude peut être interprétée comme étant constitutive chez ces organismes. Dans une perspective écologique, la solubilisation superflue observée en culture pure pourrait ne pas l'être en milieu naturel où l'hôte végétal constituerait un puits pour le phosphore excédentaire rendu disponible par l'activité de solubilisation du champignon.

L'altération de l'orthoclase par les sept souches ECM sélectionnées semble être un phénomène constitutif pour six d'entre elles puisque seul *B. ornatipes* nécessitait une source de potassium pour atteindre une pleine croissance par rapport à un témoin sans potassium. Par ailleurs, l'acidification du milieu qui résulte du métabolisme des champignons ECM pourrait suffire à dissoudre l'orthoclase. Deux des sept souches étudiées, *S. granulatus* et *B. ornatipes*, ont libéré plus de potassium en solution que ne le faisait la dissolution spontanée de l'orthoclase dans le milieu en absence de champignon. À l'opposé, *T. scalpturatum* maintenait la concentration en potassium du milieu inférieure à celle résultant d'une dissolution spontanée de l'orthoclase en milieu aqueux. Ce dernier résultat suggère que cette espèce a entièrement solubilisé l'orthoclase disponible et est efficace dans l'absorption du potassium en solution. D'un point de vue écologique, *T. scalpturatum* pourrait jouer un rôle moins primordial pour la nutrition potassique de l'hôte végétal puisque immobilisant entièrement le potassium disponible de sources insolubles. Par opposition, l'hôte végétal aurait avantage à héberger des espèces solubilisatrices efficaces comme *B. ornatipes* et à la fois microtrophiques comme *S. granulatus*. Considérant les différences significatives des concentrations en potassium des

milieux orthoclase avec champignon, il était pertinent de comparer par test de comparaison multiple les souches entre elles pour comparer leur capacité de solubilisation ainsi que l'immobilisation du potassium mis en disponibilité dans le milieu. Le test de Tukey a révélé qu'il existait trois moyennes distinctes classées en trois comportements, a) solubilisateur microtrophe avec le champignon ECM *S. granulatus* b) solubilisateur-immobilisateur neutre pour les souches ECM *H. crustuliniforme*, *S. tomentosus*, *C. finlandia*, *P. involutus* et *B. ornatipes* et finalement c) solubilisateur fortement immobilisateur obtenu avec la souche ECM *T. scalpturatum*.

Les biomasses sèches significativement plus élevées et systématiquement observées pour les traitements amendés en fluorapatite, TCP et orthoclase, pourraient résulter de deux causes possibles autres que l'obtention de nutriments à la suite de l'altération des minéraux. La première serait qu'une portion insoluble du minerai, par exemple les impuretés d'oxydes complexes retrouvés dans la fluorapatite, auraient résisté aux attaques chimiques des champignons et auraient été incluses dans les masses mycéliennes, exagérant ainsi à la hausse les valeurs de biomasse sèche. Une seconde possibilité a trait au pouvoir tampon des minéraux employés. En effet, une fois dissocié, l'ion phosphate est une base conjuguée. Cela signifie que l'acidification inévitable du milieu, par des mécanismes comme la respiration, est retardée et contribue à maintenir le pH du milieu de culture plus propice à la croissance des champignons s'y développant.

Le peu de résultats concluants pour les dosages de protéines pourrait avoir deux causes. La première est la présence de pigments absorbant les mêmes longueurs d'ondes que le bleu de Coomassie utilisé pour colorer les protéines selon la méthode de Bradford. De cette façon, il n'est plus possible de séparer l'effet des traitements sur les protéines de celui des traitements sur la production de pigments dans les masses mycéliennes. L'autre possibilité expliquant une absence d'effets significatifs serait que l'azote est un nutriment limitant pour tous les traitements et qu'ainsi la quantité de protéines retrouvées dans les masses mycéliennes est la même partout peu importe les traitements et espèces.

Chapitre 2 : Évidence d'une association étroite des bactéries solubilisatrices de phosphates au mycélium ectomycorhizien de *Picea glauca*

Introduction

Les conditions édaphiques de la forêt boréale constituent un des facteurs importants qui orientent la composition des communautés végétales et par le fait même, permet d'établir une flore diversifiée de champignons ectomycorhiziens (ECM) et de bactéries associées à la mycorrhizosphère. En un sens, la présence d'éléments essentiels à la croissance végétale dans les minéraux du sol prédispose non seulement le développement des champignons ECM (Rosling et al. 2004) mais favorise aussi la diversité des bactéries de la mycorrhizosphère (Uroz et al. 2012). Par exemple, les ectomycorhizes formées par *Pinus sylvestris* et *P. involutus* montrent, qu'en milieu naturel, l'allocation de carbone au mycélium ECM était significativement plus grande aux zones amendées en phosphate de calcium par rapport à une zone inerte (quartz) (Smits et al. 2012). Par ailleurs, le champignon *P. involutus* libère des quantités élevées d'acides organiques lorsque la croissance de son hôte est limitée par la rareté du phosphore (Van Schöll et al. 2006). L'exsudation de ces acides organiques par le mycélium ECM devrait avoir pour effet de procurer aux bactéries associées une source non négligeable de carbone (Campbell et al. 1997). C'est sûrement la raison pour laquelle les bactéries altératrices des minéraux peuvent se retrouver en plus grand nombre dans l'hyphosphère ECM que dans le reste du sol (e.g. *Scleroderma citrinum*; Uroz et al. 2007). De ce fait, ces bactéries associées étroitement aux hyphes ECM sont plus efficaces dans l'altération de minéraux que celles isolées du sol non hyphosphérique (Calvaruso et al. 2007). Cela suggère une relation tripartite où le champignon ECM reçoit des produits de photosynthèse de l'arbre pour ensuite les libérer notamment sous forme d'acides organiques, des substrats assimilables par certaines bactéries du sol. En échange, ces mêmes bactéries libéreraient des ions issus des minéraux, qui seraient immédiatement absorbés par le champignon ECM puis retransmis à l'hôte végétal (Calvaruso et al. 2010). Selon ce modèle, la fertilité des sols de la forêt boréale serait reliée à la teneur en éléments d'intérêt de la roche mère et aux aptitudes d'altération minérale des communautés fongiques et bactériennes associées aux peuplements d'espèces ligneuses.

Parmi les éléments minéraux essentiels au développement des arbres, la composition et l'abondance des minéraux phosphatés de la roche mère définissent la

fertilité d'un site (Hahm et al. 2014). Les propriétés cristallines des minéraux phosphatés déterminent ainsi sur le plan physico-chimique leur réactivité (Elliott 2013) et donc, leur disponibilité comme source de phosphore pour les organismes du sol. Ainsi, un minéral amorphe tel le phosphate tricalcique (TCP) est facilement altérable par les microorganismes tandis que les minéraux phosphatés et cristallins composant les apatites sont bien plus résistants à la corrosion (Bashan et al. 2012). La structure du réseau cristallin d'une apatite est définie par les substitutions du calcium, du phosphate et du fluor (McDonnell 1973). Les apatites d'origine ignée se divisent en trois sous-groupes selon l'association internationale de minéralogie: les hydroxyapatites, les chlorapatites et les fluorapatites. Parmi les espèces les plus communes d'apatites, les fluorapatites s'avèrent être les plus réfractaires aux attaques chimiques (Bashan et al. 2012). L'accès au sol minéral par les végétaux et leurs microorganismes associés est un phénomène important dans les régions nordiques et montagneuses en raison des conditions de succession primaire résultant du retrait des glaciers (Milner et al. 2007). Par conséquent, nous avons choisi d'étudier la flore microbienne de l'épinette blanche (*P. glauca*) connue d'une part pour être une espèce forestière typique de la zone boréale et d'autre part pour sa sensibilité à la disponibilité du phosphore en particulier (Quesnel et Côté 2009).

Sur la base de notre hypothèse de la relation tripartite entre l'hôte, les champignons ECM et les bactéries solubilisatrices de phosphates (BSP), nous avons prédit que les champignons ECM les plus abondants de la rhizosphère de l'épinette blanche sont associés à des BSP pouvant être mises en culture. Notre hypothèse suggère également que ces BSP reçoivent leur carbone organique de mycéliums ECM lorsque la seule source de phosphore disponible est insoluble. Finalement, elle prédit que l'altération *in vitro* de la fluorapatite par les BSP peut être observée en moins d'une journée après l'incubation de cristaux micronisés dans une suspension bactérienne.

Par conséquent, notre objectif général était de vérifier le rôle du microbiote bactérien associé aux champignons ECM dans l'altération de la fluorapatite, une source importante de phosphore dans le sol minéral d'origine ignée. Pour ce faire, les objectifs spécifiques étaient de i) isoler et identifier des BSP à partir de mycélium d'un champignon ECM omniprésent chez *P. glauca*, ii) démontrer *in vitro* la capacité de BSP à solubiliser rapidement la fluorapatite iii) valider en culture *in vitro* l'association étroite entre quelques BSP et un champignon ECM modèle.

Matériel et Méthodes

Provenance des BSP

Des BSP potentiellement solubilisatrices de fluorapatite ont été isolées à partir de la rhizosphère de quatre plants de *P. glauca* récoltés en milieu forestier. Les plantes hôtes étaient âgées entre 5 et 15 ans et situées dans des plantations forestières de la sapinière à bouleau blanc (Saucier et al. 2009) à environ 75 km au nord de la ville de Québec (Canada) (lat. 46°57'55.3" N; long. 71°30'55.9" O). Les plants, accompagnés d'une couche de matière organique de type MOR d'environ 3 cm d'épaisseur ont été prélevés en bordure de chemins forestiers. L'horizon B du sol de la forêt environnante (podzol humo-ferrique; Soil Classification Working Group 1998) a été prélevé pour constituer le sol minéral de transplantation en pots de 8 L.

Maintien des plants hôtes

Après leur transplantation, les plants ont été conservés en serre pendant 18 mois (septembre 2012 à avril 2014). Les épinettes ont été maintenues en serre selon une photopériode de 16h et une température variant de 18 à 23 °C. Les plants ont été arrosés une fois par semaine avec de l'eau du robinet. Nous n'avons effectué aucun désherbage pendant cette période; ainsi, les herbacées (e.g. *Chamaerion angustifolia*, *Poa pratense*, *Hieracium aurantiacum*) ont proliféré dans les pots. Après un trimestre en serre, les plants sont entrés en dormance et cette dernière a été levée par un transfert des plants à 4 °C dans l'obscurité complète.

Caractérisation des morphotypes ECM porteurs de bactéries

Nous avons prélevé des morphotypes ECM dans le but d'obtenir un inoculum porteur de BSP pouvant être mises en culture sur milieux solide et liquide. Les morphotypes mycorhiziens ont été prélevés en juin 2013 pour les cultures liquides et en février 2014 pour les cultures solides. Pendant leur croissance en serre, les plants d'épinette blanche ont produit une quantité importante de longues racines qui ont proliféré sur le pourtour des pots et produit une quantité de racines courtes pouvant être récoltées sans déranger le substrat. Les morphotypes ECM les plus abondants ont été identifiés à l'œil nu puis récoltés avant d'être examinés à la loupe binoculaire pour valider qu'une seule espèce était visiblement présente dans l'échantillonnage (Fig. 2.1).

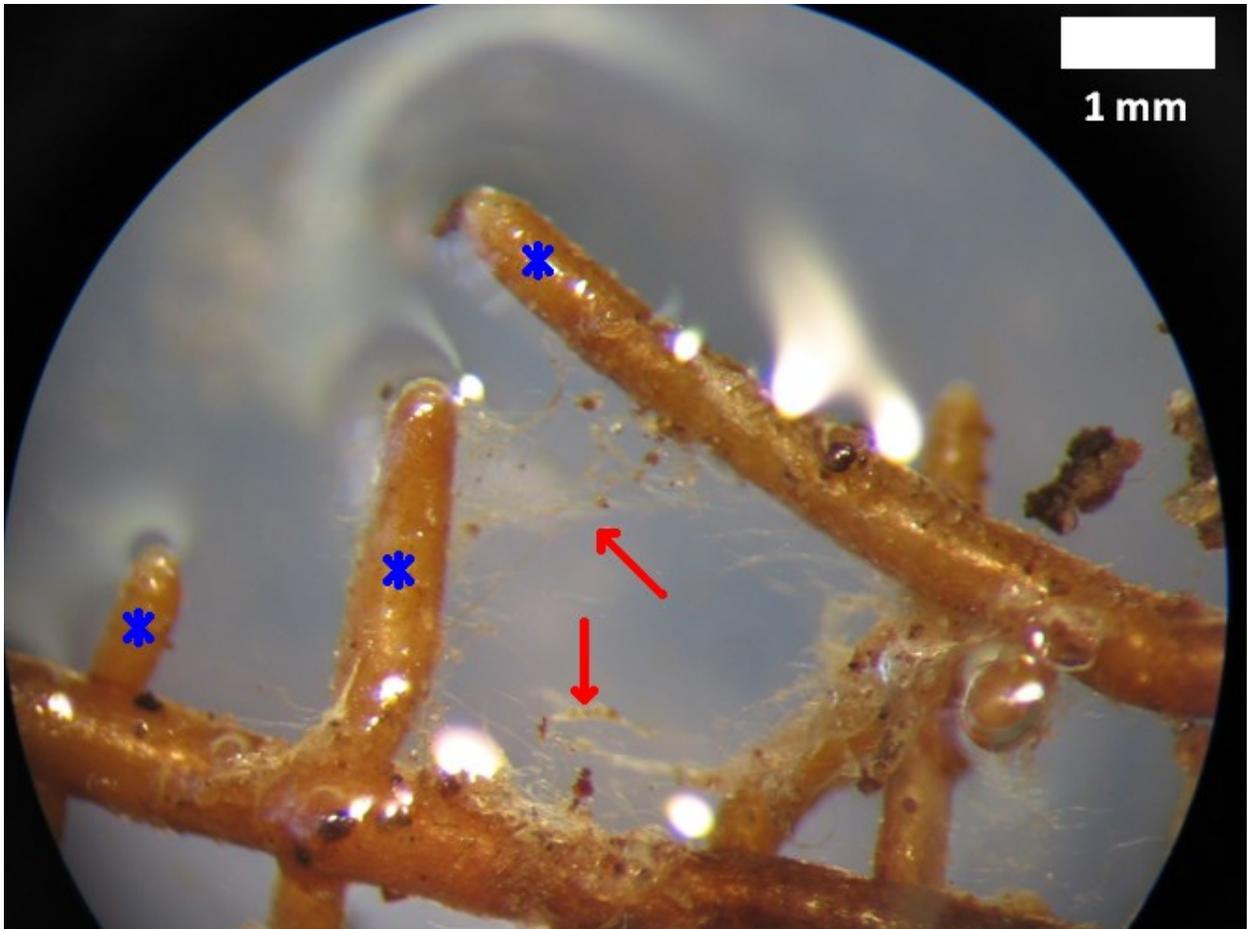


Figure 2.1 Racines de *P. glauca* (Moench) portant le morphotype mycorhizien source de BSP. Noter les ectomycorhizes (astérisques) et le mycélium extraracinaire émanant des manchons fongiques (flèches).

Identification moléculaire du principal morphotype ectomycorhizien

Cinq ectomycorhizes du morphotype dominant ont été sélectionnées au hasard sur trois plants d'épinette blanche en culture pour procéder à l'extraction d'ADN du champignon ECM. Elles ont été broyées avec mortier et pilon dans 100 μ l de tampon TTE (0.002 M EDTA, 0.02 M Tris, 0.0008 M Triton X-100), puis chauffées à 95 °C pour 10 min. Le produit résultant a été centrifugé et le surnageant conservé en tant qu'ADN total.

La réaction de polymérisation en chaîne (Saiki et al. 1988) a été effectuée sur les espaceurs internes transcrits (ITS) des gènes ribosomiaux dans un volume réactionnel de 25 μ l et comprenait 0.2 mM de mélange de dNTP, 0.5 μ M d'amorces ITS-1F et ITS-4, 2.5 μ l de tampon à PCR (Qiagen, Hilden, Allemagne), 1.5 mM $MgCl_2$, BSA 0.2 mg/ml, 3 U Taq (Qiagen) et 2 μ l d'ADN total. L'amplification a été faite avec un PTC-225 Thermal Cycler

(MJ Research, Waltham, Massachusetts) selon les conditions suivantes : 94 °C pour 4 min, suivi par 34 cycles de 94 °C, 55 °C, 72 °C pour 1 min, puis 72 °C pour 10 min.

Le succès de l'amplification a été validé par une migration du produit PCR sur gel d'agarose, avant d'être séquencé. Nous avons effectué le séquençage sur un appareil d'analyse génétique à 16 capillaires (modèle 3130XL, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc., Burlington, ON).

Isolement de BSP sur milieu sélectif solide

L'approche qui a été privilégiée dans un premier temps a été d'isoler les bactéries fortement associées aux ectomycorhizes prédominantes des plants de *P. glauca* disposées sur un milieu gélosé contenant seulement des sources insolubles de phosphore. Un sous-échantillon des ectomycorhizes soumis aux analyses moléculaires a été sélectionné pour constituer l'inoculum bactérien. Les ectomycorhizes ont été lavées vigoureusement sous un jet d'eau du robinet pour éliminer les particules et bactéries non fermement retenues par le manchon fongique. L'opération a été faite dans un tamis avec mailles de 1 mm. Les fragments ectomycorhiziens fraîchement nettoyés sont ensuite transférés dans 9 fois leur masse de solution aqueuse stérile de NaCl à 8.5 g/L. Dans cette solution saline, les ectomycorhizes ont été finement broyées avec un ensemble stérile de mortier et pilon. La suspension résultante a été considérée en tant que dilution 10^{-1} . Des dilutions sériées ont été effectuées dans cette même solution saline de façon à obtenir une suspension bactérienne d'un facteur 10^{-4} . Cette dilution 10^{-4} a servi d'inoculum pour un étalement en surface sur milieu sélectif à raison de 300 µl par boîte de Petri. Il faut bien remarquer ici que l'étalement du milieu sélectif se fait en double couche afin de faciliter l'observation de halos de clarification. La couche inférieure, inspirée du milieu NBRIP (Nautiyal 1999), contenait, par litre de milieu, 10 g de glucose, 5 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 250 mg de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 200 mg de KCl, 200 mg de KH_2PO_4 , 100 mg de $(NH_4)_2SO_4$, 200 mg d'extrait de levure (Difco laboratories, Detroit, Michigan), 50 mg de cycloheximide (Sigma Chemical Co, St-Louis, Missouri) et 10 g d'agarose (Amresco, Solon, Ohio). La couche supérieure contenait, par litre de milieu, 2.5 g de Ca_3PO_4 (TCP) (Fisher Science Education, Hannover Park, Illinois) et 10 g d'agarose. Les milieux ont été coulés en boîtes de Petri de 80 mm à raison de 20 ml pour la couche inférieure et 5 ml pour la couche supérieure. L'isolement initial de souches altératrices a été effectué sur un milieu contenant du TCP comme source de phosphore insoluble. La stabilité du phénotype d'altération a été vérifiée avec trois repiquages sur TCP. Les repiquages des colonies

présentant une expression stable du phénotype d'altération ont été effectués avec une couche amendée contenant 2.5 g/L d'hydroxyapatite (Sigma-Aldrich, St-Louis, Missouri) puis 2.5 g/L de fluorapatite carbonatée de la province géologique de Grenville (Arianne Phosphate, Saguenay) contenant 1 % de fluor.

Isolement de BSP par enrichissement en milieu sélectif liquide

Cette fois-ci nous avons obtenu l'inoculum de BSP par enrichissement en milieu liquide de la même manière que pour la méthode sur milieu solide, à la différence que 200 µl de dilution 10^{-2} a été utilisé pour démarrer l'enrichissement et que l'amendement de départ était constitué de minerai de fluorapatite. Ainsi le milieu sélectif NBRIP (Nautiyal 1999) a été utilisé avec la fluorapatite plutôt que le TCP comme amendement phosphaté afin de distinguer tout de suite les souches bactériennes capables d'altérer cette apatite d'origine ignée. Pour y arriver, les milieux liquides étaient contenus dans des fioles de 125 ml obturées par un bouchon mousse recouvert de papier d'aluminium. Les fioles ont été incubées à 26 °C en agitation à 100 tours par minute. Chaque fiole contenait 50 ml de milieu. Le milieu a été stérilisé à l'autoclave avec un cycle pour liquides de 20 minutes. Une solution de benomyl a été ajoutée après autoclavage à chaque unité expérimentale de manière à obtenir une concentration de 3 mg/L de milieu.

Après l'ajout de l'inoculum, les fioles ont été incubées une semaine pour ensuite être repiquées. Le repiquage a été effectué avec une boucle à inoculer, de telle sorte que le prélèvement favorise la souche la plus abondante lors de la sélection des unités formatrices de colonies inoculant le milieu frais et que la perpétuation des souches les plus performantes soit encouragée.

Après sept repiquages, les communautés bactériennes ont été transférées sur milieu solide afin de permettre l'isolement de souches. Les souches n'altérant pas le TCP une fois sur milieu solide ont été rejetées.

Observation ultrastructurale de l'altération de fluorapatite par une BSP performante

Nous avons observé l'altération de fluorapatite par une souche bactérienne préalablement isolée sur milieu solide en microscopie électronique à balayage et déterminé la composition minéralogique du minerai. La souche bactérienne BSP 205, sélectionnée en raison de son efficacité de dissolution de la fluorapatite, a été propagée en fioles contenant le milieu liquide Tryptic Soy Broth (Difco laboratories, Detroit,

Michigan) agité à 180 tours minutes à 26 °C. Les cultures ont été centrifugées, le surnageant éliminé, puis un lavage des bactéries a été effectué en suspendant les cellules bactériennes dans une solution de NaCl à 0.15 M. Cette suspension a été centrifugée afin d'éliminer à nouveau le surnageant. Le culot bactérien a ensuite été resuspendu dans une quantité de milieu NBRIP liquide sans phosphore produisant une concentration de $1 \cdot 10^6$ unités formatrices de colonies par ml. Deux minerais de fluorapatite ont été utilisés. Un contenait 1 % de fluor (Ariane Phosphate, Saguenay, Québec) et l'autre 4 % (Mine Arnaud, Sept-Îles, Québec). Le minerai de fluorapatite a été lavé à l'eau distillée, séché à l'air libre puis stérilisé à l'autoclave avec un cycle pour solides de 20 minutes. Les particules magnétisées ont été retirées du minerai à l'aide d'un aimant. Le porte-échantillon pour le minerai était un ruban conducteur adhérent à un support d'acier inoxydable. La fluorapatite a été déposée sur le ruban conducteur et l'excédent retiré avec un jet d'air.

Deux méthodes ont été employées pour incuber la fluorapatite en présence de bactéries BSP 205. La première se résumait à recouvrir le minerai fixé au support métallique (Goldstein 2003) avec une goutte de suspension bactérienne préalablement remise en suspension à l'aide d'un vortex. La seconde méthode consistait à déposer le montage portant la fluorapatite dans une cavité d'une plaque multipuits stérile 24 Well MultiWell (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey) pour ensuite remplir le puits avec la suspension bactérienne jusqu'à recouvrir la fluorapatite. Ce montage a été mis en agitation à 60 tours par minute. La première méthode a été employée avec une incubation de six heures et la seconde de 22 heures.

Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope JEOL, modèle JSM-7600F équipé d'un spectromètre RX en sélection d'énergie. Il possédait une résolution de 1 nm à 15 kV et de 1.4 nm à 1 kV. Le détecteur d'électrons secondaire conventionnel (LEI) a été utilisé. Aucun dépôt conducteur (tels Au ou C) n'a été appliqué lors de la préparation des échantillons. Les observations initiales ont été menées sur les cristaux de fluorapatite vierge. Les cristaux aux formes les plus reconnaissables ont été repérés dans le but de les retrouver plus aisément après incubation en présence des bactéries BSP 205. Des photos ont ainsi été prises des cristaux entiers ainsi que de leurs arrêtes. Une fois l'incubation terminée, la fluorapatite a été lavée sous un filet d'eau distillée pendant une minute. Le montage a été séché sous vide avant d'être inséré dans le microscope. Les cristaux observés à leur état vierge ont été retrouvés puis photographiés à nouveau et ont fait

l'objet d'une observation qualitative. La composition minéralogique a aussi été déterminée par spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X.

Reconstitution d'associations étroites entre trois souches bactériennes BSP et un champignon ECM.

L'utilisation du champignon ECM *L. bicolor* B3-25#2 s'est imposée dans cette expérience pour ses qualités symbiotiques et surtout pour son inaptitude d'altérer l'apatite. Contrairement au *L. bicolor*, la sélection des trois souches BSP (168, 205 et 260) a été faite justement cette fois-ci selon leur capacité d'altérer les apatites. Le rapprochement des souches BSP avec le champignon *L. bicolor* s'est concrétisé dans le système de culture en boîte de Petri bicompartimentée. Dans un premier temps, il fallait inoculer seul *L. bicolor* dans la partie proximale pour ensuite le contraindre à explorer le compartiment distal contenant une source unique de phosphore lorsque son compartiment proximal contenait les éléments essentiels à sa croissance à l'exception du phosphore (Fig. 2.2). La rencontre du champignon ECM avec chacune des souches BSP s'est produite dans le compartiment distal comprenant une des trois sources de phosphore suivantes : i) phosphore soluble (P soluble), ii) hydroxyapatite (HA), et iii) phosphore soluble + hydroxyapatite (P soluble+HA). Chacun des traitements a été inoculé ou non avec trois souches bactériennes solubilisant la fluorapatite. L'expérience comprenait deux témoins comportant les bactéries sans champignon croissant sur un milieu de phosphore soluble ou sur hydroxyapatite. Chaque traitement a été répété trois fois.

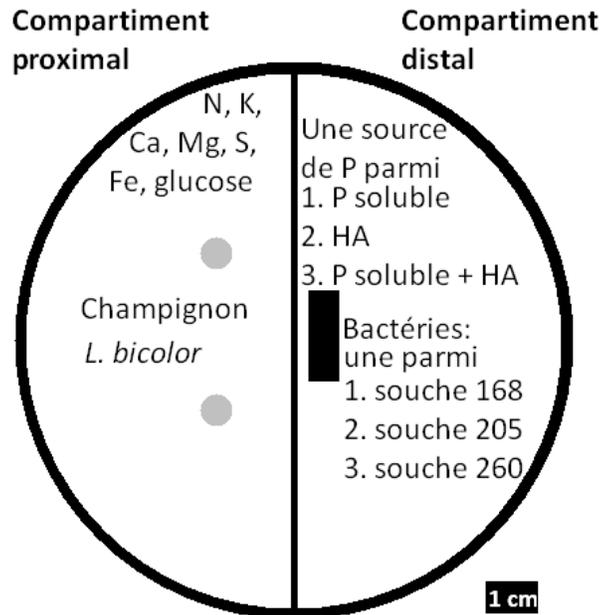


Figure 2.2 Dispositif expérimental des milieux de culture bicompartimentés contraignant *L. bicolor* à explorer les deux compartiments pour obtenir tous les nutriments essentiels à sa croissance. Compartiment proximal : milieu gélosé sans phosphore (P), inoculum *L. bicolor* représenté par des ronds gris. Compartiment distal : milieu gélosé avec seulement 1- du phosphore soluble (P soluble), 2- de l'hydroxyapatite (HA), 3- du phosphore soluble + hydroxyapatite (P soluble+HA). Inoculum bactériens affichés par un rectangle noir : souches 168, 205 et 260.

Le compartiment proximal contenait un milieu MNM modifié (Marx 1969) sans phosphore. Ce milieu était constitué de 0.15 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.025 g/L NaCl, 5 g/L glucose, 0.26 g/L KCl, 0.05 g/L $CaCl_2$, 1 ml/L de solution microéléments, 0.5 ml/L FeEDTA, 100 μ g/L thiamine HCl, 0.340 g/L alanine, et 10 g/L agar. Les compartiments distaux contenaient 10 g/L agar et respectivement 0.5 g/L KH_2PO_4 (P soluble), 2.5 g/L hydroxyapatite (HA) ou 0.5 g/L KH_2PO_4 (P soluble) et 2.5 g/L hydroxyapatite (HA). Les milieux ont été stérilisés à l'autoclave avec un cycle liquide de 20 minutes.

Les milieux ont été inoculés avec chacun deux pastilles de 5 mm de diamètre prélevés au pourtour d'une colonie de *L. bicolor* âgée d'un mois sur un milieu GYME en boîtes de Petri. Ces pastilles obtenues à l'aide d'un emporte-pièce sont déposées au centre du compartiment proximal. Les souches bactériennes BSP 168, 205 et 260, distinctes sur le plan morphologique, ont été déposées sur le compartiment distal au moyen d'une boucle à inoculer. Les inoculations ont été effectuées sous une hotte à flux laminaire.

Les diamètres des colonies bactériennes ont été utilisés comme proxy de la croissance et analysés à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) selon un plan d'expérience en blocs complets. En présence d'un F significatif de l'ANOVA, les moyennes ont été comparées à l'aide de contrastes orthogonaux a priori afin de discerner des différences significatives de croissance pour les souches bactériennes 168, 205 et 260 en fonction de : i) la nature soluble ou insoluble de la source de phosphore offerte à *L. bicolor* dans le compartiment distal ii) la présence ou absence d'une source de phosphore soluble lorsqu'une source de phosphore insoluble est toujours disponible à *L. bicolor* dans le compartiment distal.

Les données ont été examinées pour en vérifier la normalité et l'homogénéité des variances à l'aide des méthodes graphiques standards. Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide de la procédure GLM du logiciel SAS v.9.32 (SAS Institute Inc.). Un seuil $\alpha = 0.05$ a été utilisé pour déterminer si les effets étaient significatifs.

Identification moléculaire des souches bactériennes solubilisatrices

Les souches de BSP sélectionnées par culture sur milieu solide et en milieu liquide ont été identifiées sur la base des gènes d'ARN ribosomal 16S. L'identification moléculaire a été effectuée sur les 27 souches de BSP ayant produit des halos de clarification sur le minerai de fluorapatite en milieu solide et les neuf souches au phénotype d'altération stable provenant de l'enrichissement en milieu liquide. Les souches ont été mises en culture sur milieu liquide Tryptic Soy Broth (Difco laboratories, Detroit, Michigan) pour une durée de sept jours, à 26 °C, en agitation à 180 tours/min. Nous avons prélevé et centrifugé 100 µl de milieu de culture contenant les bactéries. Le surnageant a été éliminé et le culot remis en suspension dans 100 µl de tampon TTE. Cette suspension a ensuite été chauffée à 95 °C pour 10 min. Le produit résultant a été centrifugé et le surnageant conservé en tant qu'ADN total. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été effectuée de la même façon que pour le morphotype ectomycorhizien, à l'exception des amorces (358F et 907R, Weidner et al. 1996) et de l'utilisation de 3 U de Taq au lieu de une. Après validation du succès d'amplification, les séquences ont été éditées à l'aide du logiciel Bioedit v.7.1.3 (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA). L'identité des taxa a été déterminée en comparant les séquences obtenues à celles déposées sur GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Un arbre phylogénique a été créé avec le logiciel

Mega5 (Tamura et al. 2011) en employant la méthode UPGMA avec 100 répliqués de bootstrap.

Résultats

Isolement des BSP étroitement associées au morphotype ECM dominant chez P. glauca

Le morphotype ECM le plus abondant chez *P. glauca* a servi de point de départ pour isoler le plus grand nombre de souches BSP. Ce morphotype ectomycorrhizien ainsi sélectionné correspondait au champignon *Wilcoxina* sp. avec 95-98 % de similarité pour les espaceurs internes transcrits des gènes ribosomaux avec les séquences retournées par GenBank.

L'étalement du broyat de mycorhizes du *Wilcoxina* sp. a produit 455 colonies présentant un halo de clarification dans la couche amendée en TCP sur milieu solide (Fig. 2.3a). Le repiquage de ces souches jusqu'à obtention d'un phénotype stable a fait chuter le nombre de colonies à 140 (Tableau 2.1). De ces 140 souches altératrices stables, 98 ont clarifié le milieu amendé en hydroxyapatite. Finalement, 27 souches ont produit des halos de clarification sur l'amendement de minerai de fluorapatite (Fig. 2.3b).

Tableau 2.1 Nombre de souches bactériennes cultivées sur milieu solide ayant solubilisé les amendements qui étaient le phosphate tricalcique (TCP), l'hydroxyapatite et la fluorapatite.

Amendement	Repiquage	Nb. Colonies
TCP	-	455
TCP	1	428
TCP	2	203
TCP	3	140
Hydroxyapatite	-	98
Fluorapatite (<45µm)	-	27

L'enrichissement en milieu liquide a produit 39 souches qui ont été mises en culture sur milieu solide. De ces 39 souches, neuf ont présenté un phénotype d'altération stable sur trois repiquages sur milieu amendé en TCP. La stabilité des phénotypes a été maintenue après mise en culture sur un milieu riche.

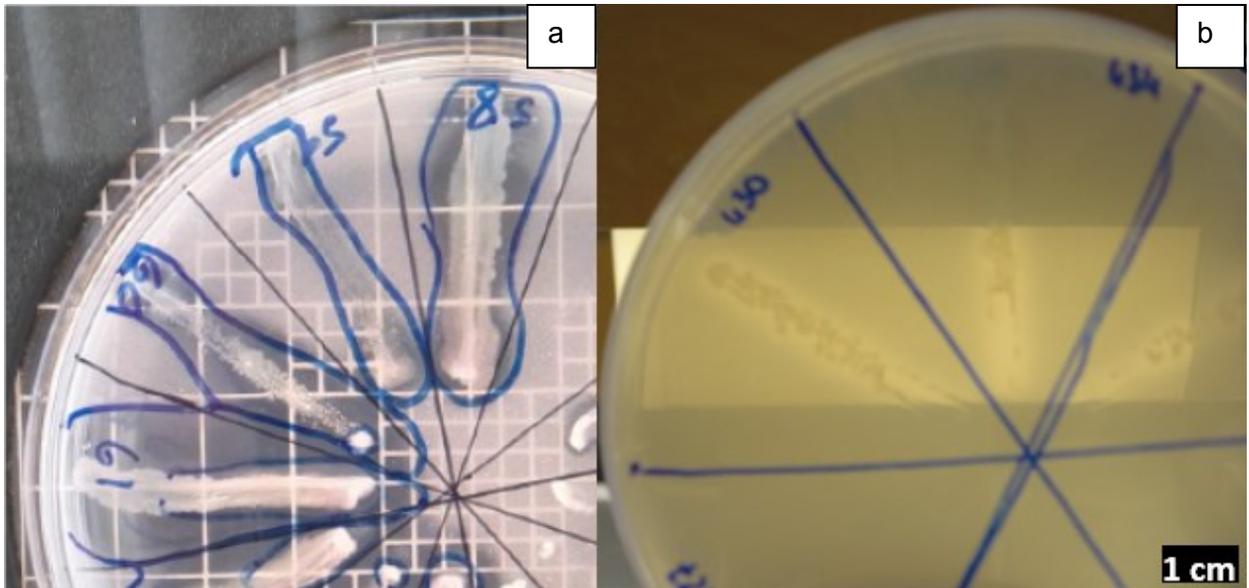


Figure 2.3 Halos de clarification observables au pourtour et sous les colonies bactériennes. Les amendements sont le TCP (a) et le minéral de fluorapatite (b). Notez la différence de clarification obtenue entre les deux minerais.

Identité des taxa bactériens BSP

Les souches sélectionnées sur milieu solide et dont l'ADN a été amplifié avec succès appartiennent surtout au genre *Burkholderia* sp. (Fig. 2.4). Les *Burkholderia* spp. sont divisées en deux taxons avec un support de 1 (Fig. 2.5). Les autres souches bactériennes obtenues par enrichissement appartiennent aux genres *Curtobacterium* sp. et *Leifsonia* sp. L'arbre phylogénique est enraciné par *Pseudozyma aphidis*, une levure environnementale isolée lors de l'enrichissement en milieu liquide.

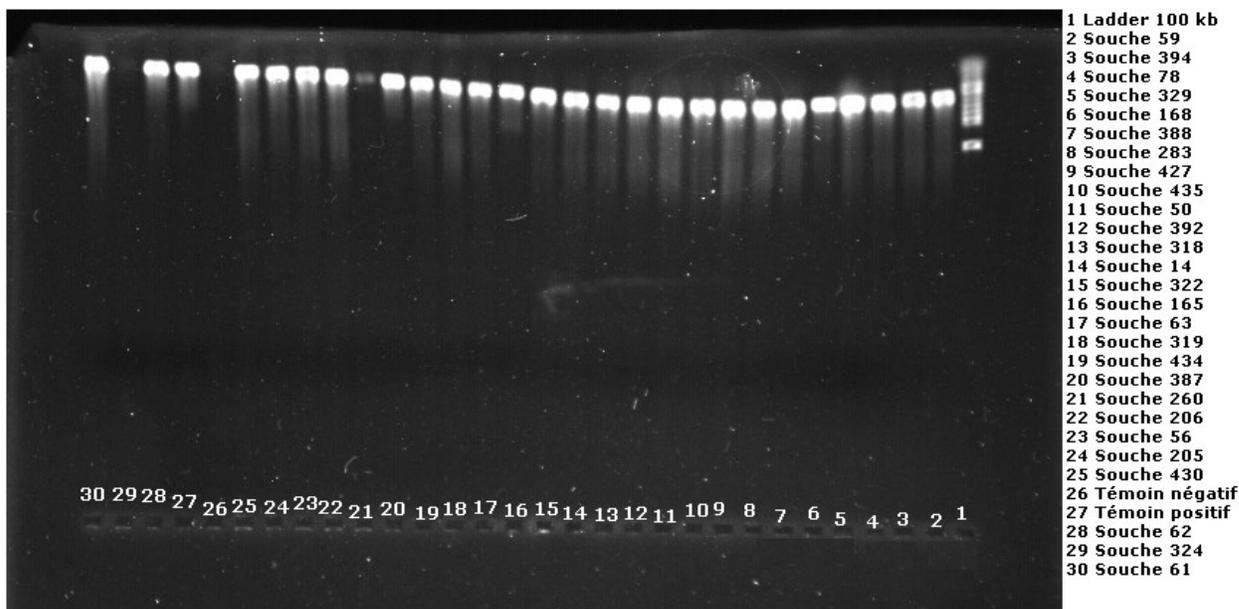


Figure 2.4 Migration des produits PCR des séquences 16S des BSP sur gel d'agarose pour les souches ayant solubilisé le minéral de fluorapatite sur milieu solide. L'amplification a été un succès pour 26 des 27 souches.

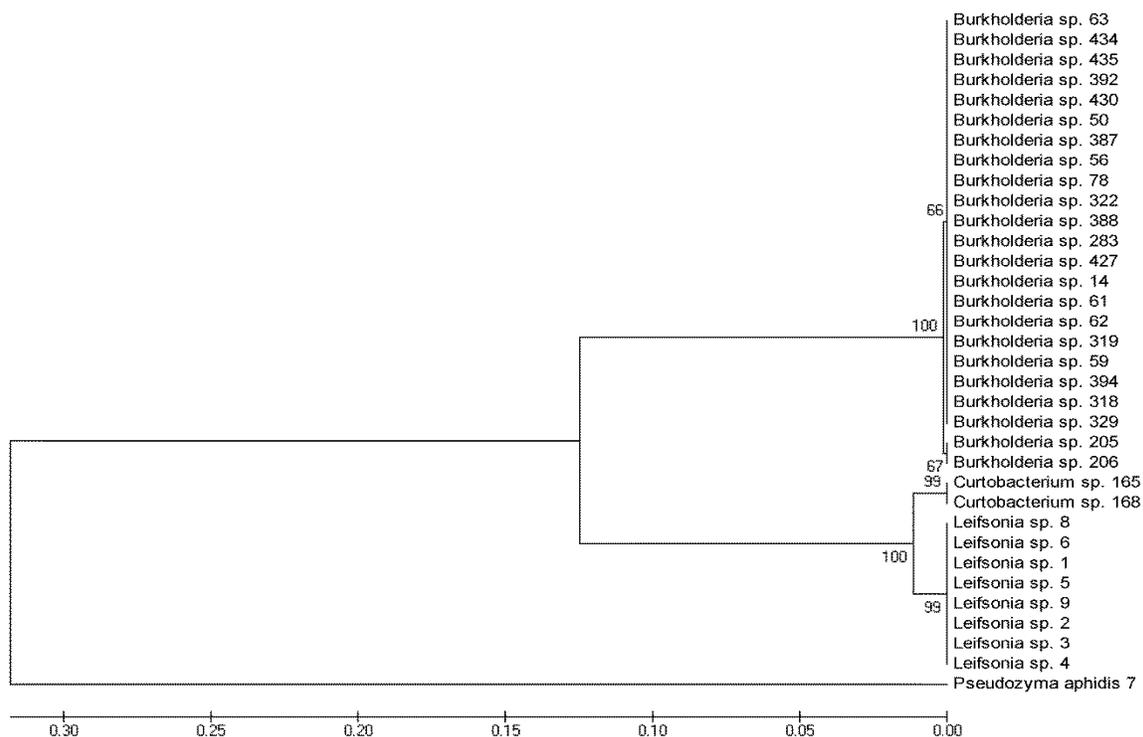


Figure 2.5 Arbre phylogénique illustrant les relations entre les souches de BSP associées à *Wilcoxina* sp., isolées sur milieux solide et liquide sélectifs, capables de solubiliser la fluorapatite.

L'altération de la fluorapatite par la souche *Burkholderia sp. 205* s'est révélée particulièrement réussie en comparaison avec les essais des autres BSP et cela, autant avec la méthode de la goutte qu'avec l'incubation en immersion. Pour la méthode de la goutte, les arrêtes des cristaux de fluorapatite contenant 1 % de fluor ont montré des signes de corrosion après seulement 6 heures d'incubation (Figs. 2.6 b, 2.6 d) comparé à la fluorapatite intacte (Figs. 2.6 a, 2.6 c). Une dissolution complète des cristaux de fluorapatite contenant 1 % de fluor (Figs. 2.7 a, 2.7 c) a été observée après 22 heures d'incubation avec la méthode d'immersion (Figs. 2.7 b, 2.7 d). L'étude de surface d'un cristal de fluorapatite montre une architecture atomique composée majoritairement de phosphore, de calcium et d'oxygène tout en montrant des traces de fluor, de silice et de fer (Fig. 2.8). Les cristaux de fluorapatite souvent désignés par la formule $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ sont amalgamés avec des poussières et des couches d'oxydes complexes résistant à l'altération (Fig. 2.8). Par ailleurs, les cristaux de fluorapatite contenant 4 % de fluor (Fig. 2.9 a) sont plus résistants à l'altération (Fig. 2.9b) et présentent des patrons d'attaque chimique différents du minerai contenant 1 % de fluor (Figs. 2.7 b; 2.7 d).

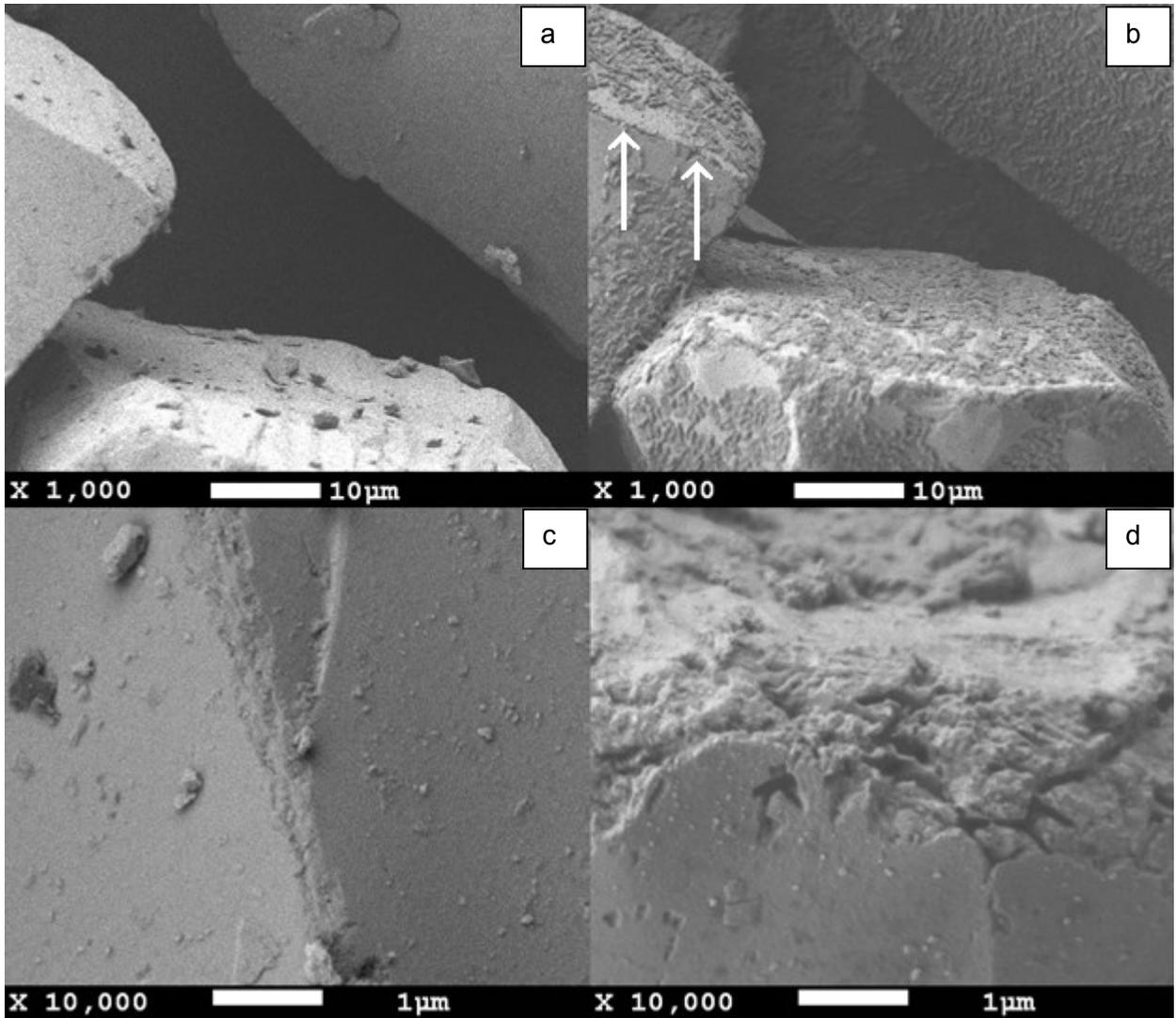


Figure 2.6 Photographies en microscopie électronique à balayage montrant des cristaux de fluorapatite. (a) et (c) Cristaux de fluorapatite vierge présentant des arrêtes nettes. (b) et (d) Cristaux de fluorapatite après six heures d'incubation en présence de *Burkholderia* sp. souche 205. Les arrêtes sont corrodées (flèches) et l'attaque ne suit pas les plans atomiques avec la méthode de la goutte.

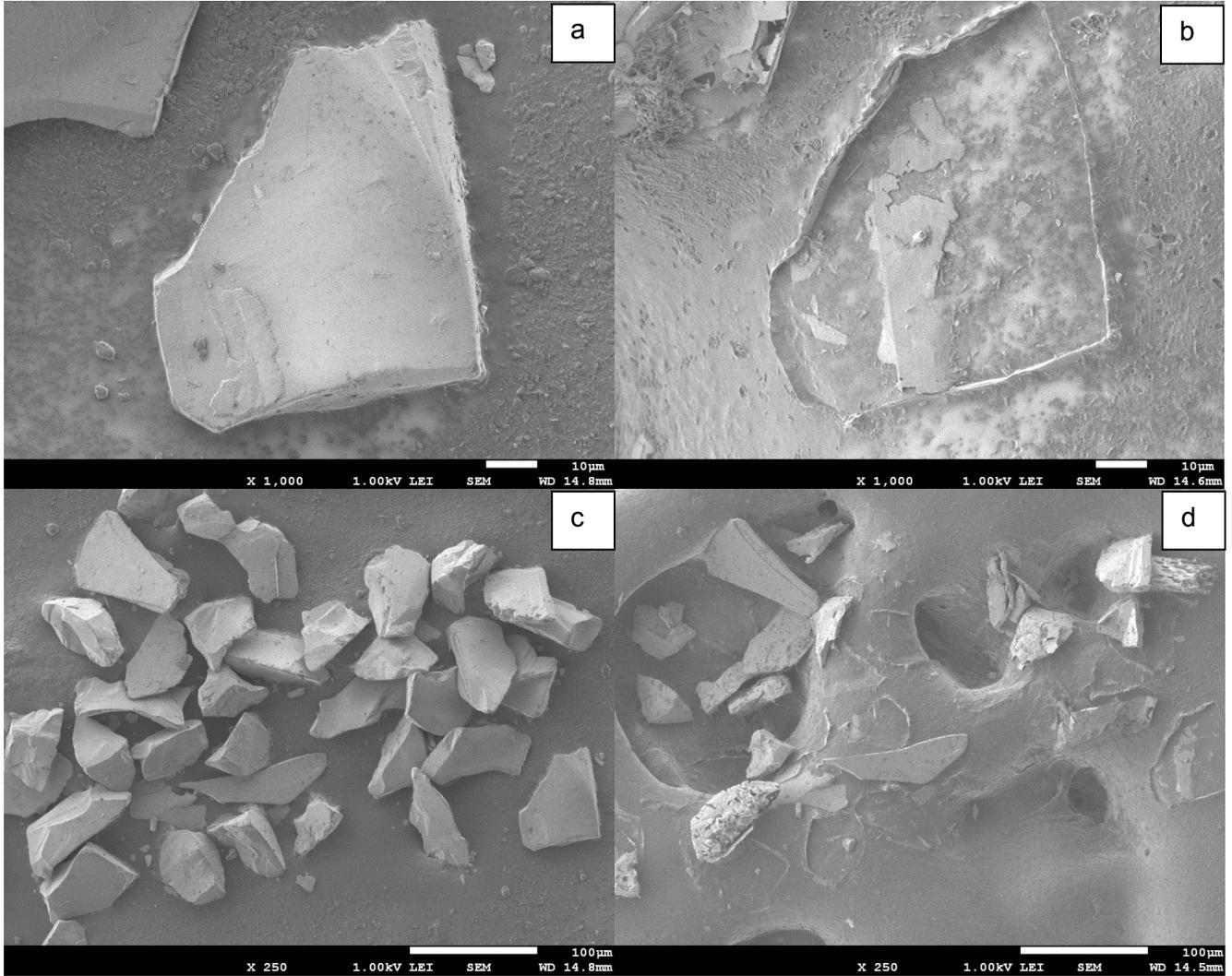


Figure 2.7 Cristaux de fluorapatite avant (a, c) et après (b, d) incubation en immersion pendant 22 heures en présence de *Burkholderia* sp. souche 205. L'image b montre le cristal de fluorapatite entièrement solubilisé. Les restes de la particule encore présentes sur le ruban conducteur sont des oxydes complexes. Dans l'image 2.7 d, les particules non altérées sont entièrement composées d'oxydes complexes. Ces cristaux de fluorapatite contiennent 1 % de fluor.

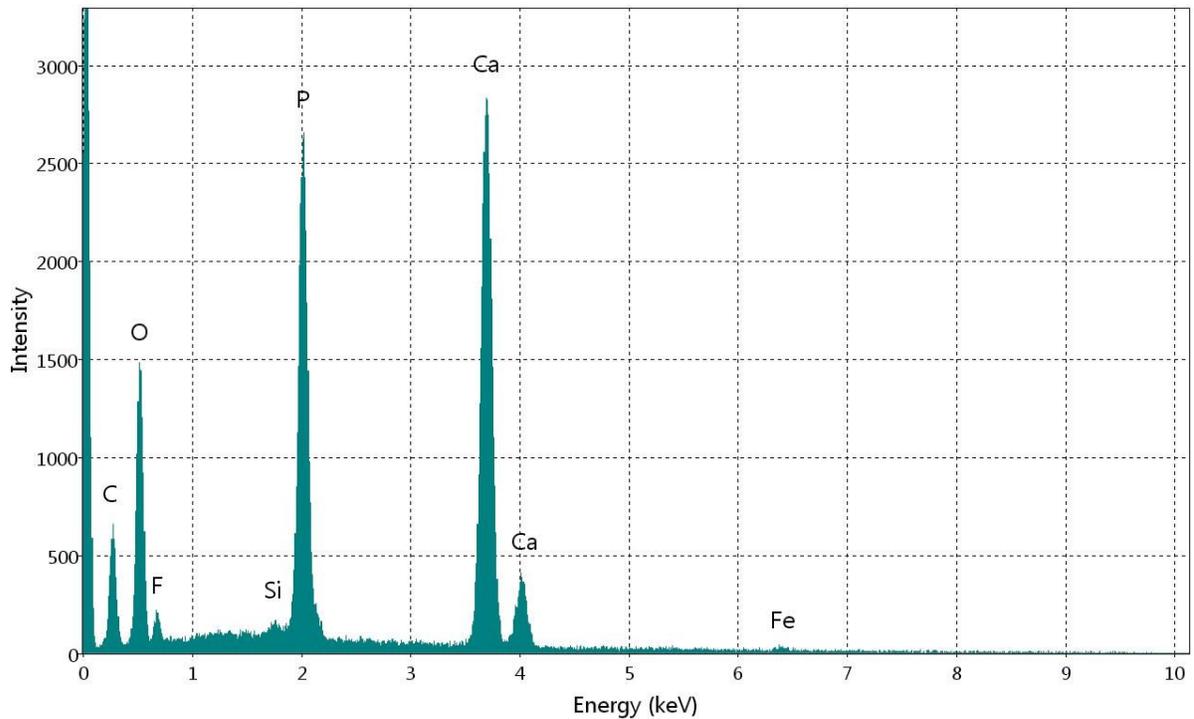


Figure 2.8 Spectre de réémission d'un cristal de fluorapatite observé par spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X. La particule de fluorapatite est majoritairement composée de calcium, phosphore et oxygène. Les traces de fer et de silice correspondent aux nanoparticules d'oxydes complexes présentes à la surface du cristal. Le signal du carbone provient de substitutions carbonatées.

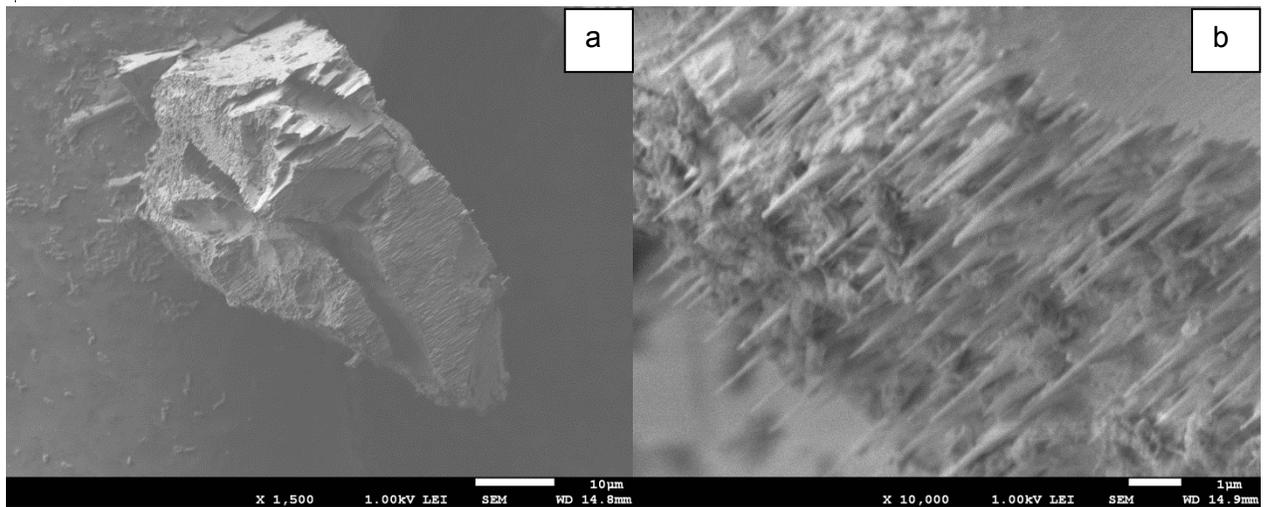


Figure 2.9 Cristaux de fluorapatite avant (a) et après (b) incubation en immersion pendant 23 heures en présence de *Burkholderia* sp. souche 205. Ces cristaux proviennent d'un minerai contenant 4 % de fluor. Les cristaux sont partiellement altérés et les patrons d'altération suivent les plans atomiques des cristaux.

Association étroite entre les BSP et un champignon ECM

Dans la partie distale des Petri bicompartimentés, l'association entre le champignon ECM *L. bicolor*, inapte à l'altération de l'apatite, et les souches BSP (205, 260 et 168) s'est révélée différente selon la source en phosphore. En effet, lorsque *L. bicolor* assure sa propre acquisition en phosphore soluble (Fig. 2.10 a), la croissance de la souche *Burkholderia* sp. 205 n'est pas observable sur les hyphes du champignon ECM localisées dans la partie distale (Fig. 2.10 a encart). À l'opposé, lorsque *L. bicolor* est privé d'une source soluble en phosphore (Fig. 2.10 b), *Burkholderia* sp. 205 manifeste une croissance sur les hyphes du champignon symbiotique (Fig. 2.10 b encart). Ainsi, la présence d'hydroxyapatite en absence de phosphore soluble module significativement la croissance de la souche *Burkholderia* sp. 205 et aussi celle de l'inconnu 260 et à un degré non significatif celle de la souche *Curtobacterium* sp. 168 (Fig. 2.11, Tableau 2.2).

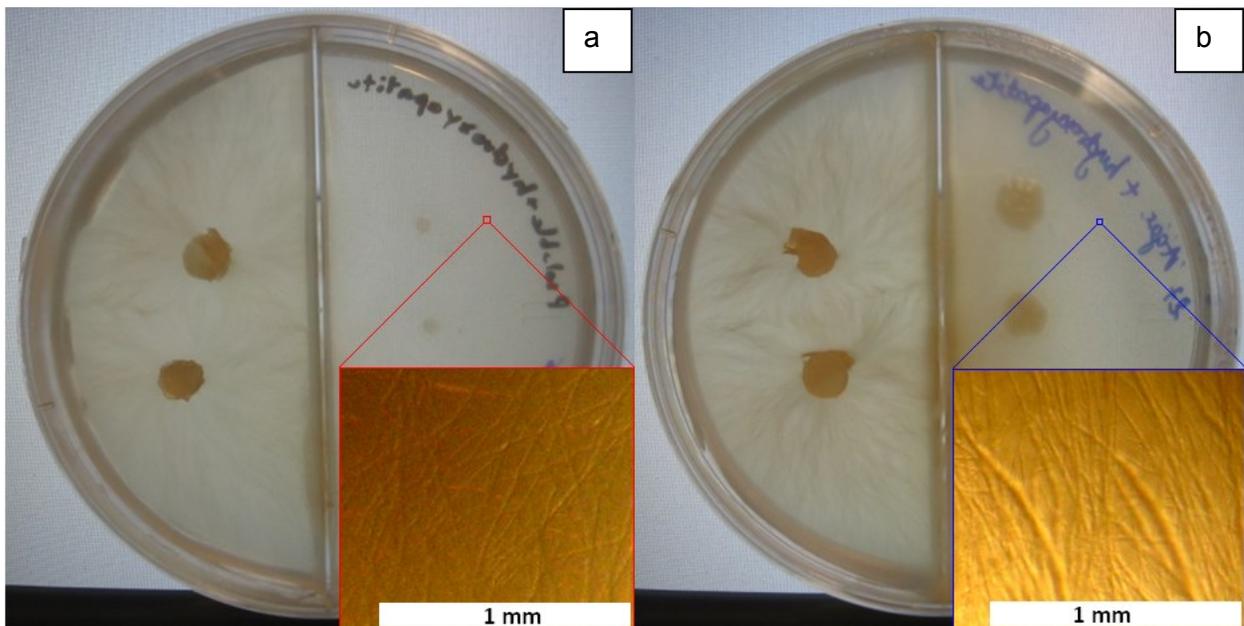


Figure 2.10 Reconstitution d'association entre *L. bicolor* et *Burkholderia* sp. souche 205. (a) *L. bicolor* en présence de *Burkholderia* sp. souche 205 dans le compartiment distal avec le traitement P soluble, hydroxyapatite. Encart, les hyphes de *L. bicolor* exempts de BSP (b) *L. bicolor* en présence de *Burkholderia* sp. souche 205 sur le compartiment distal du traitement hydroxyapatite. Encart, les hyphes de *L. bicolor* recouvertes de BSP.

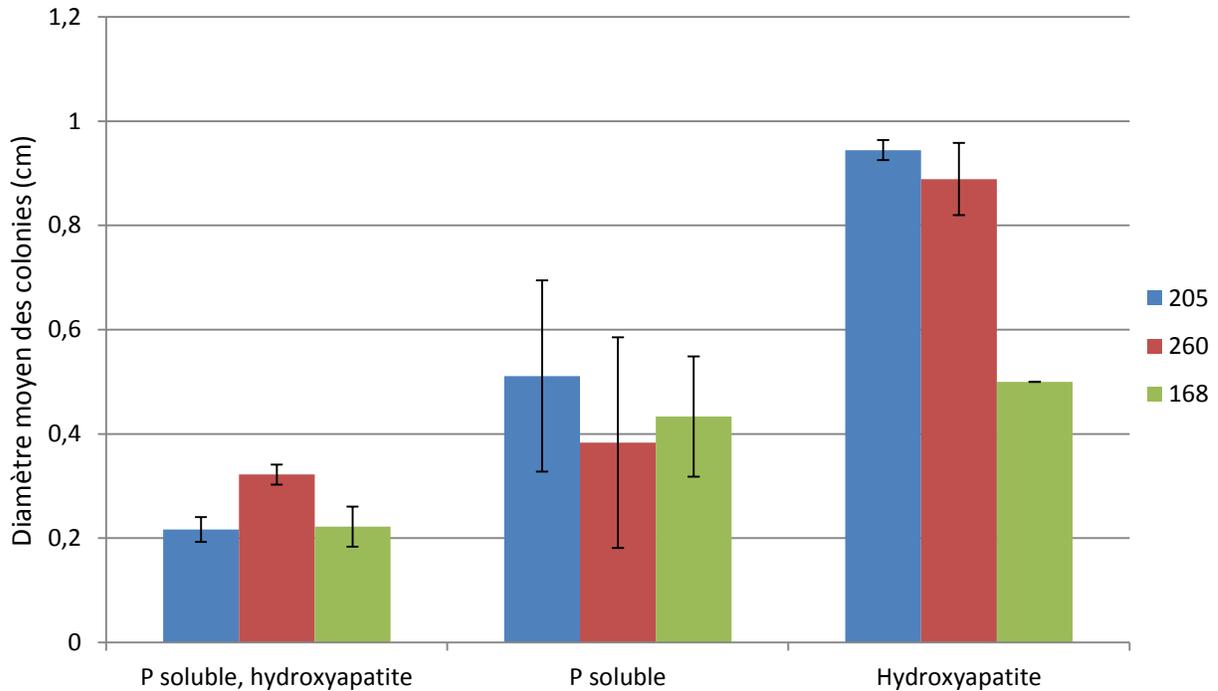


Figure 2.11 Diamètre moyen des colonies de *Burkholderia* sp. souche 205, espèce inconnue souche 260 et *Curtobacterium* sp. souche 168 croissant en présence de *L. bicolor* sur les compartiment distaux contenant des sources de phosphore soluble (KH_2PO_4), insoluble (hydroxyapatite) ou les deux simultanément. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Tableau 2.2 Contrastes orthogonaux à priori comparant les diamètres des colonies *Burkholderia* sp. souche 205, espèce inconnue souche 260 et *Curtobacterium* sp. souche 168 croissant en présence de *L. bicolor* sur les compartiment distaux contenant des sources de phosphore soluble, insoluble ou les deux simultanément. Les valeurs de P inférieures à 0.05 indiquent des différences significatives dans les diamètres de colonies en fonction des sources de phosphore offertes à *L. bicolor*.

Source de phosphore	Souche	P
P soluble vs. Hydroxyapatite	205	<.0001
	260	<.0001
	168	0.0691
P soluble + hydroxyapatite vs Hydroxyapatite	205	<.0001
	260	<.0001
	168	0.0143

Discussion

Nous avons isolé des BSP étroitement associées aux champignons ECM capables de solubiliser rapidement la fluorapatite. L'enrichissement en milieu liquide a permis d'obtenir les souches les plus compétitives pour la croissance en milieu défini ayant pour seule source de phosphore un minerai de fluorapatite. Par contraste, l'enrichissement sur milieu solide offrait un meilleur portrait de la diversité des espèces aptes à croître dans ces mêmes conditions. Toutefois, le faible nombre de souches bactériennes obtenu autant avec les méthodes d'isolement sur milieu solide que par enrichissement en milieu liquide détonne avec la complexité des communautés bactériennes typiquement retrouvées dans les sols (Sharma et al. 2005). La communauté de BSP susceptible d'être isolée est également limitée du fait qu'elle provient de l'environnement immédiat des hyphes d'un seul champignon ECM *Wilcoxina* sp. (Scheublin et al. 2010). L'usage d'un milieu sélectif et l'élimination des souches bactériennes ne produisant pas de halos de clarification restreignent également l'isolement de souches compétentes pour solubiliser les phosphates. Les souches BSP obtenues devaient nécessairement être performantes dans l'altération de phosphates insolubles en conditions *in vitro* pour être identifiées grâce aux méthodes moléculaires. Ces résultats confirment la présence de bactéries solubilisatrices dans l'hyphosphère de *Wilcoxina* sp., un champignon ectomycorhizien dominant et abondant dans les peuplements de *P. glauca* (Résultats non publiés (Stefani et Sokolski 2015)). Évidemment, le rôle de solubilisation des phosphates en forêt boréale n'est pas seulement limité aux trois genres isolés dans cette étude. Par ailleurs, les souches altératrices les plus performantes isolées en conditions *in vitro* ne présentent pas automatiquement une activité d'altération aussi importante lorsque cultivées au sein de communautés hyphosphériques maintenues en microcosme (Uroz et al. 2009). La compétition pour accéder aux exsudats fongiques ainsi que la disponibilité des ions mis en solution par l'activité des bactéries solubilisatrices peuvent stimuler la croissance de microorganismes ne contribuant pas à la nutrition végétale. Une estimation semi-quantitative de la biomasse présente en conditions naturelles des *Burkholderia* sp. isolées dans la présente étude pourrait être établie en quantifiant la fraction d'ADN bactérien qu'elles représentent au sein des communautés hyphosphériques.

Dans la présente étude, les souches bactériennes solubilisant la fluorapatite sont moins nombreuses que celles parvenant à dissoudre le TCP. Cette variation de la communauté BSP semble être modulée par la réactivité chimique des apatites

caractérisée par la présence d'un réseau cristallin qui résiste davantage aux attaques chimiques bactériennes par rapport aux précipités amorphes phosphatés tel que le TCP (Zhao et al. 2011). Des 203 souches solubilisant le TCP, 98 solubilisaient l'hydroxyapatite et 27 le minerai de fluorapatite. La fluorapatite est donc l'apatite la plus résistante à l'altération (Bashan et al. 2012).

Les observations ultrastructurales de l'altération de la fluoroapatite par *Burkholderia* sp. révèlent que les facteurs biotiques contribuant à l'altération des minéraux rendent possible l'occurrence de ce phénomène à une vitesse inattendue lorsque les conditions favorables sont réunies. Ainsi, le *Burkholderia* sp. 205 croissant dans une goutte statique de milieu NBRIP parvient à corroder les arrêtes des cristaux de fluorapatite en six heures. Lorsque cette même fluorapatite est incubée en agitation dans une suspension de *Burkholderia* sp. 205 en milieu NBRIP, moins d'une journée suffit pour observer la solubilisation de cristaux entiers avec une teneur en fluor de 1 % en masse. Cependant, quand l'expérience est reprise pendant 23 heures avec une fluorapatite contenant 4 % de fluor, la solubilisation n'est que partielle et l'apparence des cristaux partiellement solubilisés est différente. La teneur en fluor est donc un facteur déterminant quant à l'accessibilité du phosphore contenu dans les cristaux de fluorapatite, bien que l'échelle de temps demeure sensiblement la même. Les premiers signes d'altération sont observés aux arrêtes des cristaux. Cela s'explique par l'énergie du réseau cristallin plus grande aux arrêtes que sur les surfaces planes et ainsi fait des arrêtes les régions les plus réactives des particules (Gilles L'Espérance, comm. pers.).

Bien que certains champignons ECM soient peu efficaces dans l'altération des minéraux en culture axénique *in vitro*, ils sont tout de même abondants en milieu naturel (Calvaruso et al. 2010). Cette contradiction apparente s'explique par un possible rôle écologique largement limité à l'absorption et au transport des nutriments. Ces champignons ECM reçoivent de l'arbre du carbone fixé par photosynthèse qu'ils exsudent ensuite dans l'environnement immédiat d'un minerai contenant un élément utile à la plante (Paris et al. 1996). Ainsi, cette libération soutient l'activité de bactéries pourvues de capacités d'altération minérale. En échange, le champignon absorbe les éléments minéraux et les transfère à son hôte. *Laccaria bicolor* seul est inefficace dans l'altération d'apatite, mais en milieu naturel, ce champignon ECM est associé à des souches bactériennes efficaces en altération d'apatite (Frey-Klett 2005; Uroz et al. 2007). Chez les

glomérormycètes, plusieurs espèces bactériennes s'attachent préférentiellement aux hyphes fongiques actifs (Toljander et al. 2005, Taktek et al. 2015).

Cette situation se produit également chez les basidiomycètes. Par exemple, une bactérie altératrice d'apatite, *Burkholderia terrae*, migre sur les hyphes de *Lyophyllum* sp. et emporte avec elle d'autres espèces bactériennes (Warmink et al. 2010). Cette capacité d'assister la comigration de souches inaptes à y parvenir seules est répandue chez le genre *Burkholderia* (Nazir et al. 2012). L'ubiquité du genre *Burkholderia* dans les sols forestiers (Lepleux et al. 2012) a été confirmée comme s'étendant à la forêt boréale en raison des souches isolées de l'hyphosphère de *Wilcoxina* sp. L'originalité de la présente étude consistait à démontrer la non spécificité de l'hôte fongique pour le *Burkholderia* sp. 205, lequel origine d'un hôte ascomycète (*Wilcoxina* sp.) pour ensuite s'associer avec un basidiomycète (*L. bicolor*). L'hôte fongique a exsudé les substances nécessaires à la croissance des bactéries et à leur activité de solubilisation d'hydroxyapatite, offrant ainsi une source de phosphore accessible à *L. bicolor*. Les bactéries se sont développées et ont rempli leur présumée fonction écologique; elles ont migré sur les hyphes de leur hôte fongique. Cette comigration facilite sans doute la colonisation de grandes quantités de substrats par *Burkholderia* sp. 205 en raison de la capacité d'exploration du champignon bien supérieure à celle de la bactérie.

Conclusions générales

L'objectif général de cette étude était d'observer l'altération d'apatite et d'orthoclase par les microorganismes associés aux *Pinaceae* dans le cadre de la nutrition minérale des arbres en forêt boréale. L'expérience de dissolution en conditions *in vitro* par les champignons ECM (Chapitre 1) montre que les espèces communément associées aux essences résineuses de la forêt boréale sont aptes à dissoudre la fluorapatite et l'orthoclase et à mobiliser les nutriments de ces sources insolubles pour leur propre croissance. Quatre espèces sélectionnées ont produit une clarification des milieux amendés en phosphate tricalcique (TCP) et en fluorapatite. Cette solubilisation complète de la fluorapatite indique que les acides organiques de faible poids moléculaire relâchés par *H. crustuliniforme*, *S. granulatus*, *T. sculpturatum* et *C. finlandia* sont efficaces pour mobiliser le phosphore à partir de toutes les apatites existantes puisque la fluorapatite est le minéral le moins réactif de sa famille. La mise en disponibilité du phosphore au-delà des besoins des champignons ECM a été facilement atteinte chez *H. crustuliniforme* et *S. granulatus*. En effet, ces derniers solubilisent les minéraux phosphatés sans nécessiter plus de phosphore que celui contenu dans l'inoculum de départ afin de produire une biomasse maximale.

Les résultats pour la solubilisation de l'orthoclase en milieu liquide suggèrent que la capacité d'altérer les feldspaths est répandue chez les champignons ECM. En effet, les sept espèces ECM sélectionnées dans cette étude ont clarifié le milieu où la seule source de potassium disponible était l'orthoclase. Tel qu'observé pour la nutrition phosphatée de *H. crustuliniforme* et *S. granulatus*, cinq espèces sur sept ont dissout l'orthoclase alors qu'elles produisaient déjà un maximum de biomasse sans apport en potassium autre que celui provenant de leur pastille d'inoculum. Compte tenu de son comportement constitutif de solubilisation envers P et K, *S. granulatus* présenterait ainsi une prédisposition à la formation d'ectomycorhizes en permettant aux plantes hôtes une absorption accrue en éléments minéraux.

Cette possibilité que *S. granulatus* solubilise les minéraux de manière constitutive est appuyée par les concentrations en potassium ionique retrouvées dans les milieux orthoclase. Avec *B. ornatipes*, *S. granulatus* était l'espèce ayant rendu disponible les plus grandes quantités de potassium. Par opposition, la presque totalité du potassium mobilisé à partir de l'orthoclase est absorbée par *T. sculpturatum*.

L'isolement de bactéries solubilisatrices de phosphates à partir de la mycorrhizosphère de *P. glauca* (Chapitre 2) a démontré la présence de souches aptes à dissoudre la fluorapatite associées à *Wilcoxina* sp., un champignon ECM abondant en milieu naturel. Contrairement à ce qui a été observé chez les souches ECM sélectionnées au chapitre 1, la proportion d'isolats bactériens solubilisant la fluorapatite par rapport au TCP est de l'ordre de 6 %. Ainsi, une faible diversité de la communauté bactérienne cultivable est apte à mobiliser les phosphates à partir de l'apatite la plus résistante à l'altération. Toutefois, les souches accomplissant ce rôle ont fait preuve d'une vitesse largement supérieure à celle observée chez les champignons. En l'espace de 22 heures, *Burkholderia* sp. 205 a complètement dissout des cristaux de fluorapatite contenant 1 % de fluor. Finalement, l'association entre *Laccaria bicolor* et trois souches bactériennes solubilisant la fluorapatite a été reconstituée en conditions *in vitro*. Ce résultat est remarquable puisque *L. bicolor* est un basidiomycète alors que les souches bactériennes employées dans cette expérience provenaient d'un ascomycète. Cette non spécificité entre les bactéries altératrices et l'hôte fongique ECM suggère que la compatibilité existerait entre les microorganismes aux fonctions écologiques synergiques, soit les champignons ECM remplissant des fonction d'absorption et de transport d'une part, et, d'autre part, des bactéries capables de solubiliser les différents minéraux d'intérêt nutritif pour l'hôte végétal.

Bien que cette étude ait montré que des microorganismes de la rhizosphère des *Pinaceae* sont aptes à mobiliser le phosphore et le potassium de sources insolubles, il reste à approfondir la connaissance des mécanismes de mise en disponibilité des nutriments en forêt naturelle. Des avenues de recherche peuvent être considérées, telles les suivantes

1. Les microorganismes démontrent la capacité de solubiliser les minéraux en conditions axéniques et monoxéniques. Il faut maintenant savoir si l'ajout d'orthoclase et de fluorapatite sur le parterre forestier de peuplements de conifères provoque une amélioration de l'état nutritionnel des arbres ainsi qu'une accélération de leur croissance. Ces informations seraient pertinentes dans l'élaboration de pratiques sylvicoles visant à accroître la productivité de plantations ou encore rendre exploitables des sites autrement trop peu productifs.

2. Les microorganismes sélectionnés dans la présente étude étaient cultivables. Or, la majorité des bactéries des sols ne sont pas cultivables et bon nombre de champignons ECM ont résisté aux tentatives de mises en cultures. Il serait intéressant de caractériser les communautés bactériennes sur une base fonctionnelle d'après des gènes candidats liés à la capacité à solubiliser les minéraux et faire de même chez les champignons ECM les plus abondants en milieu naturel. Il serait ainsi possible d'estimer l'ampleur des contributions des divers organismes participant à l'altération des minéraux.

Bibliographie

Arvieu J.C., Leprince F., Plassard C. (2003) Release of oxalate and protons by ectomycorrhizal fungi in response to P-deficiency and calcium carbonate in nutrient solution. *Annals of forest science* 60: 815-821.

Calvaruso C., Turpault M.P., Leclerc E., Frey-Klett P. (2007) Impact of Ectomycorrhizosphere on the Functional Diversity of Soil Bacterial and Fungal Communities from a Forest Stand in Relation to Nutrient Mobilization Processes. *Microbial Ecology* 54: 567-577.

Calvaruso C., Turpault M.P., Leclerc M., Ranger J., Garbaye J., Uroz S., Frey-Klett P. (2010) Influence of forest trees on the distribution of mineral weathering-associated bacterial communities of the *Scleroderma citrinum* mycorrhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 76:4780-4787.

Campbell C. D., Grayston S.J., Hirst D.J. (1997) Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. *Journal of Microbiological Methods* 30: 33-41.

Courty P. E., Buée M., Diedhiou A.G., Frey-Klett P., Le Tacon F., Rineau F., Turpault M.P., Uroz S., Garbaye J. (2010) The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts. *Soil Biology and Biochemistry* 42:679-698.

Elliott J. C. (1994) Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates. *Studies in Inorganic Chemistry*, volume 18. Elsevier. pp. 1-389.

Finlay R., Wallander H., Smits M., Holmstrom S., Van Hees P., Lian B., Rosling A. (2009) The role of fungi in biogenic weathering in boreal forest soils. *Fungal Biology Reviews* 23: 101-106.

Fortin J. A., Plenchette C., Piché Y. (2015) *Les mycorhizes: l'essor de la nouvelle révolution verte* (2e édition). MultiMondes, Québec.

Frey-Klett P., Chavatte M., Clause M.L., Courrier S., Le Roux C., Raaijmakers J., Martinotti M.G., Pierrat J.C., Garbaye J. (2005) Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New phytologist* 165: 317-328.

Garbaye J. (2013) *La symbiose mycorhizienne*. Quae, Versailles.

Hahn W. J., Riebe C. S., Lukens C. E., Araki S. (2014) Bedrock composition regulates mountain ecosystems and landscape evolution. *PNAS* 111: 3338-3343.

Hoffland E., Kuyper T.W., Wallander H., Plassard C., Gorbushina A.A., Haselwandter K., Holmstrom S., Landeweert R., Lundstrom U.S., Rosling A., Sen R., Smits M.M., van Hees P.A.W., van Breemen N. (2004) The role of fungi in weathering. *Frontiers in ecology and the environment* 2:258-264.

- Jentschke G., Brandes B., Kuhn K.J., Schröder W.H., Godbold D.L. (2001) Interdependence of phosphorus, nitrogen, potassium and magnesium translocation by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytologist* 149: 327-337.
- Koele N., Turpault M.P., Hildebrand E.E., Uroz S., Frey-Klett P. (2009) Interactions between mycorrhizal fungi and mycorrhizosphere bacteria during mineral weathering: Budget analysis and bacterial quantification. *Soil Biology & Biochemistry* 41: 1935–1942.
- Landeweert R., Hoffland E., Finlay R.D., Kuyper T.W., van Breemen N. (2001) Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends in Ecology and Evolution* 5: 248-254.
- Lepleux C., Turpault M.P., Oger P., Frey-Klett P., Uroz S. (2012) Correlation of the Abundance of Betaproteobacteria on Mineral Surfaces with Mineral Weathering in Forest Soils. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 7114-7119.
- Mahmood S., Finlay R.D., Erland S., Wallander H. (2001) Solubilisation and colonisation of wood ash by ectomycorrhizal fungi isolated from a wood ash fertilised spruce forest. *FEMS Microbiology Ecology* 35: 151-161.
- McDonnell D. (1973) *Apatite – Its Crystal Chemistry, Mineralogy, Utilization, and Geologic and Biological Occurrences*. Springer-Verlag, Vienne.
- Milner A., Fastie C. L., Chapin F. S., Engström D. R., Sharman L.C. (2007) Interactions and Linkages among Ecosystems during Landscape Evolution. *Bioscience* 57: 237-247.
- Nadeau M.B. (2015) Development of a new green technology for the revegetation of abandoned gold mine tailings using specific symbionts associated with *Picea glauca*. M. Sc., Université Laval.
- Nautiyal C.S., (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170: 265-270.
- Nazir R., Zhang M., de Boer W., van Elsas J.D. (2012) The capacity to comigrate with *Lyophyllum* sp. strain Karsten through different soils is spread among several phylogenetic groups within the genus *Burkholderia*. *Soil Biology & Biochemistry* 50: 221-233.
- Ochs M., Brunner I., Stumm W., Cosovic B (1993) Effects of root exudates and humic substances on weathering kinetics. *Water and air pollution* 68: 213-229.
- Paris F., Botton B. Lapeyrie F. (1996) *In vitro* weathering of phlogopite by ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 179: 141-150.
- Quesnel P.O., Côté B. (2009) Prevalence of Phosphorus, Potassium, and Calcium Limitations in White Spruce across Canada. *Journal of Plant Nutrition*, 32: 1290–1305.
- Reyes I., Bernier L., Simard R.R., Antoun H. (1998) Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiology Ecology* 28: 281-290.

Rosenstock N.P. (2009) Can ectomycorrhizal weathering activity respond to host nutrient demand? *Fungal Biology Reviews* 23:107-114.

Rosling A, (2009) Trees, mycorrhiza and minerals - field relevance of *in vitro* experiment. *Geomicrobiology Journal* 26:389-401.

Rosling A., Finlay R.D. (2005) Response of different ectomycorrhizal fungi to mineral substrates. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 69:2541-2547.

Rosling A., Lindhal B.D., Taylor A., Finlay R.D. (2004) Mycelial growth and substrate acidification of ectomycorrhizal fungi in response to different minerals. *FEMS Microbiology Ecology* 47; 31-37.

Rygiewicz P.T., Andersen C.P. (1994) Mycorrhizae alter quality and quantity of carbon allocated below ground. *Nature* 369:58-60.

Saccone L., Gazzè S.A., Duran A.L., Leake J.R., Banwart S.A., Ragnarsdóttir K.V., Smits M.M., McMaster T.J. (2012) High resolution characterization of ectomycorrhizal fungal-mineral interactions in axenic microcosm experiments. *Biogeochemistry* 111: 411–425.

Saucier, J.P., Robitaille, A., and Grondin, P. 2009. Cadre bioclimatique du Québec. Manuel de foresterie, 2e édition. Édité par R. Doucet and M. Côté. Ordre des ingénieurs forestiers du Québec, Éditions Multimondes, Québec, QC. pp. 186-205.

Scheublin T.R., Sanders I.R., Keel C., van der Meer J.R. (2010) Characterisation of microbial communities colonising the hyphal surfaces of arbuscular mycorrhizal fungi. *International Society for Microbial Ecology Journal* 4: 752-763.

Smits M.M., Bonneville S., Benning L.G., Banwart S.A., Leake J.R. (2012) Plant-driven weathering of apatite – the role of an ectomycorrhizal fungus. *Geobiology* 10: 445-456.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731-2739.

Soil Classification Working Group. (1998) The Canadian System of Soil Classification. 3rd ed. Agriculture and Agri-Food Canada. Publication. 1646.

Stefani F., Sokolski S. (2015) Rapport d'analyse – projet MD 001005. Mycodiagnostic.

Taktek S., Trépanier M., Magallon-Servin P., St-Arnaud M., Piché Y., Fortin J. A., Antoun H. (2015) Trapping of phosphate solubilizing bacteria on hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198 *Soil Biology and Biochemistry* 90: 1-9.

Toljander J.F., Artursson V., Paul L.R., Jansson J.K., Finlay R.D. (2005) Attachment of different soil bacteria to arbuscular mycorrhizal fungal extraradical hyphae is determined by hyphal vitality and fungal species. *Federation of European Microbiological Societies Letters* 254: 34-40.

Uroz S., Calvaruso C., Turpault M.P., Pierrat J.C., Mustin C., Frey-Klett P. (2007) Effect of the Mycorrhizosphere on the Genotypic and Metabolic Diversity of the Bacterial Communities Involved in Mineral Weathering in a Forest Soil. *Applied and environmental microbiology* 79: 3019–3027.

Uroz S., Turpault M. P., Delaruelle C., Mareschal L., Pierrat J.C., Frey-Klett P. (2012) Minerals Affect the Specific Diversity of Forest Soil Bacterial Communities, *Geomicrobiology Journal*, 29: 88-98.

van Schöll L., Hoffland E., van Breemen N., (2006). Organic anion exudation by ectomycorrhizal fungi and *Pinus sylvestris* in response to nutrient deficiency. *New Phytologist* 170: 153–163.

Wallander H., Johansson U., Sterkenburg E., Brandström Durling M., Lindhal B.D. (2010) Production of ectomycorrhizal mycelium peaks during canopy closure in Norway spruce forests. *New Phytologist* 187: 1124-1134.

Wallander H., Mahmood S., Hagerberg D., Johansson L., Pallon J. (2003) Elemental composition of ectomycorrhizal mycelia identified by PCR-RFLP analysis and grown in contact with apatite or wood ash in forest soil. *FEMS Microbiology Ecology* 44: 57-65.

Wallander H., Nilsson L.A., Hagerberg D., Bååth E. (2001) Estimation of the biomass and seasonal growth of external mycelium of ectomycorrhizal fungi in the field. *New phytologist* 151: 753–760.

Warmink J.A., Nazir R., Corten B., van Elsas J.D. (2010) Hitchhikers on the fungal highway: The helper effect for bacterial migration via fungal hyphae. *Soil Biology & Biochemistry* 43: 760-765.

Weidner S., Arnold W., Pühler A. (1996) Diversity of Uncultured Microorganisms Associated with the Seagrass *Halophila stipulacea* Estimated by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 766-771.