



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Collégium Sciences et Technologies
Ecole Doctorale Ressources, Procédés, Produits et Environnement

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université de Lorraine
en Biologie Végétale et Forestière

par Laurence LACERCAT-DIDIER

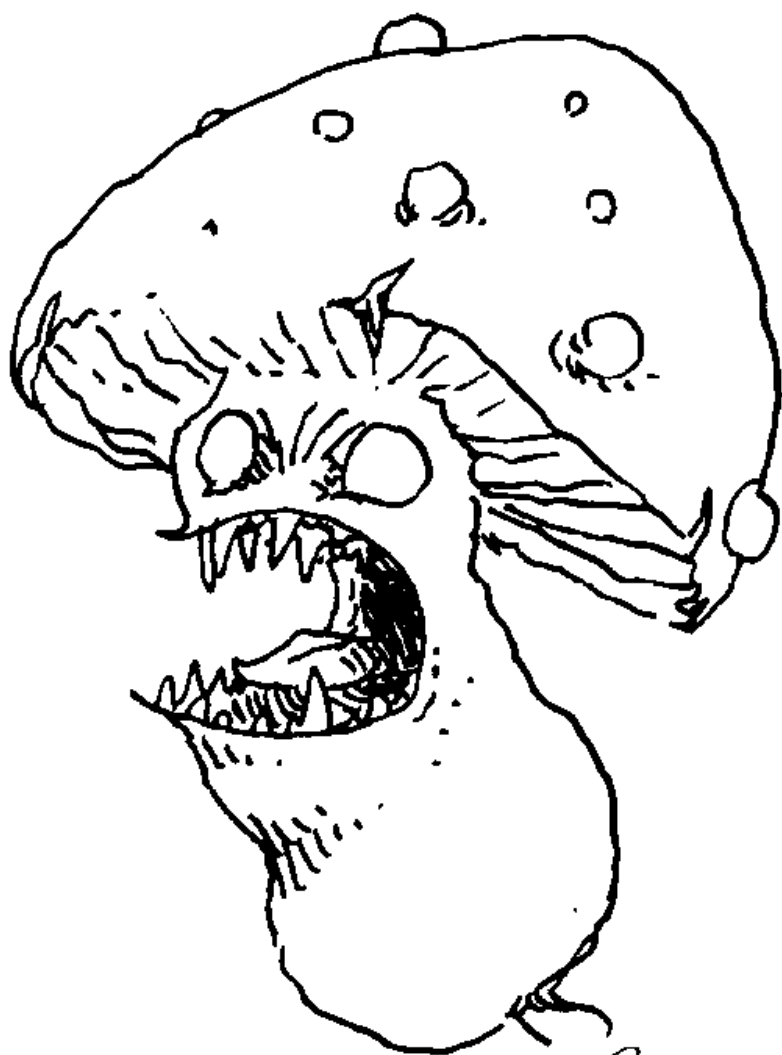
Filtration biologique pour la réduction des éléments traces métalliques dans la biomasse du peuplier

Soutenue publiquement le 5 juin 2013

Directeur de thèse : Pr Michel CHALOT
Co-directeur de thèse : Dr Damien BLAUDEZ

Membres du jury :

Rapporteurs :	M. Pierre BERTHOMIEU	Professeur, SupAgro, Montpellier
	M. Daniel WIPF	Professeur, Université de Bourgogne
Examineurs :	Mme Valérie BERT	Ingénieur de recherche, INERIS, Verneuil-en-Halatte
	M. Damien BLAUDEZ	Maitre de conférences, Université de Lorraine
	Mme Frédérique CADIERE	Ingénieur, ADEME, Angers
	M. Michel CHALOT	Professeur, Université de Franche-Comté



« Tous les champignons sont
comestibles, certains une fois
seulement. »

Coluche

*Jean Laurence
-Bauer-
Nancy 62
18394*

Remerciements

Me voici donc rendue au difficile exercice des remerciements, difficile car il me semble important de trouver les mots justes pour chacun afin d'exprimer au mieux ma gratitude envers toutes les personnes ayant contribué à ce travail, et je ne voudrais oublier ou vexer personne. C'est pourquoi, j'aimerais tout d'abord remercier toutes les personnes qui n'apparaîtraient pas dans ces pages et qui ont participé de près ou de loin à ce travail.

Je souhaiterais tout d'abord remercier la région Lorraine et l'ADEME qui ont permis la réalisation de ce travail en m'apportant un cadre administratif, ainsi qu'un soutien financier sans lesquels rien n'aurait été possible.

Je voudrais également remercier vivement les membres du jury de ma soutenance : Pierre Berthomieu, Daniel Wipf, Valérie Bert, Frédérique Cadière, Michel Chalot et Damien Blaudez, pour avoir accepté de juger mon travail.

Je tiens particulièrement à remercier Michel Chalot et Damien Blaudez, mes directeurs de thèse, pour m'avoir proposé cette thèse et m'avoir fait confiance durant ces quelques années passées ensemble. Merci pour votre soutien, vos conseils avisés et la marge de liberté que vous m'avez accordés au cours de ce travail. Je n'aurais pas pu souhaiter mieux comme encadrants.

Mes remerciements s'adressent également aux personnes ayant participé à mes comités de pilotage de thèse : Valérie Bert, Frédérique Cadière, Eric Gelhaye et Amandine Uhmman. Merci pour vos précieux conseils et votre soutien qui m'auront permis d'améliorer la qualité de mon travail.

Je voudrais ensuite remercier tous mes collègues de l'UMR 1136 IAM et notamment leurs directeurs Eric Gelhaye, Pascale Frey-Klett et Pascal Frey.

Plus particulièrement, je tiens à remercier les membres de l'équipe du « 4 » :

- Elena pour ta gentillesse, ta patience et ton aide précieuse que ce soit pour la rédaction de publis ou m'expliquer des points de protocoles ;
- Didier pour ton travail de thèse qui m'aura apporté des bases solides mais également pour tous les bons moments passés, notamment nos parties de « 7th sea » ;
- Aude pour ton travail sur le peuplier et aussi pour m'avoir grandement aidée à améliorer mon relationnel et à finaliser mon choix professionnel ;
- Hélène pour tes travaux sur les Zips et Cdfs et surtout ta bonne humeur et ton dynamisme ;
- Frédéric pour ces heures de lavage ou de broyage de végétaux passées ensemble où tu n'as jamais manqué de me raconter les derniers potins ;
- Chantal pour ton aide pour m'y retrouver dans les méandres de l'administratif et pour avoir participé à l'animation de notre bureau ;
- M. Botton pour votre gentillesse et l'intérêt porté à mon travail ;
- Eva, Annick et Claire pour m'avoir mis sur les rails pendant mes stages de master ;
- Loïc pour ta curiosité insatiable et tous tes trucs et astuces dignes de Géo Trouvetou ;

- Julie pour ton aide précieuse en fin de thèse et tes délicieux cookies, bon courage pour la suite ;
- Et les stagiaires ayant participé à l'avancement de mes travaux et sans qui je n'aurais pas pu réaliser tout ceci : Leila, Audrey, Denis, Arnaud, Maxime, Charlotte, Aurélien et Louis.

J'aimerais également remercier d'autres membres de l'UMR pour leur aide. Merci à l'équipe du « 3 » pour m'avoir plusieurs fois dépannée quand j'étais à cours de certains produits. Merci également à Valérie pour tes conseils en microscopie et ton énergie, et à Marc et Claude pour votre aide et vos conseils sur l'analyse moléculaire des communautés fongiques. Je n'oublie pas non plus Aurore, Benjamin et Edgar pour toutes les soirées bien sympas passées ensembles.

Un grand merci à Pierre Richaud pour toutes les analyses ICP effectuées dont la rapidité m'a toujours impressionnée.

Merci également à Michel Mench pour m'avoir envoyé des carpophores en début de thèse et m'avoir pris sous son aile à Portland.

Je tiens à remercier chaleureusement tous les membres du projet BIOFILTREE pour vos conseils et les bons moments passés sur le terrain à planter des peupliers et des aulnes.

Un grand merci aux membres du LIMOS/LIEC pour leur accueil chaleureux en cette fin de thèse. Particulièrement, merci à Corinne Leyval pour m'avoir accepté au laboratoire et trouvé une petite place. Merci aussi à l'équipe du LGM/Dynamic pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis d'effectuer six mois d'ATER.

Et merci à Boulet pour m'avoir autorisé à utiliser sa dédicace.

Enfin, ayant parfois réussi à échapper au labo, j'aimerais profiter de ces quelques lignes pour remercier mes proches. Merci à mes parents et à mon frère pour leur soutien et leur intérêt. Un grand merci à mes amis (ils se reconnaîtront) pour avoir su me changer les idées quand j'en avais le plus grand besoin. Et enfin, Rémi, je te remercie du fond du cœur, il y aurait tellement à dire, mais surtout merci pour ta grande patience.

Résumé/Abstract

Résumé : La phytostabilisation est une méthode de gestion de sites pollués par des éléments traces métalliques (ETM) grâce à une approche « verte ». Les champignons mycorhiziens, associés aux racines, peuvent contribuer au potentiel de phytostabilisation d'espèces ligneuses en réduisant notamment le transfert des ETM vers les parties aériennes de la plante.

Dans le cadre du projet BIOFILTREE, plusieurs approches ont été mises en oeuvre afin de sélectionner des espèces fongiques performantes en phytostabilisation. Dans un premier temps, afin de cibler des espèces d'intérêt, les communautés fongiques associées aux racines de plusieurs clones de peupliers sur un site pollué par des ETM ont été analysées. Tous les peupliers étaient colonisés par des champignons ecto-, endomycorhiziens et endophytes. En revanche, des spécificités d'hôtes ont été observées parmi ces communautés, avec par exemple un champignon majoritaire du genre *Hebeloma*, mais ne s'associant pas avec tous les génotypes de peuplier. Dans un deuxième temps, plusieurs campagnes de prélèvements de champignons sur divers sites pollués ont permis d'isoler des souches fongiques particulièrement tolérantes aux ETM. De très fortes variations intra- et interspécifiques ont été observées lors de ces tests. Un test préliminaire en conditions contrôlées a également mis en évidence une légère modification de la répartition des ETM dans la biomasse du peuplier par un inoculum fongique.

En parallèle, des approches ciblées de caractérisation fonctionnelle (complémentation de levures, localisation subcellulaire de protéines chimériques avec la GFP, régulation transcriptionnelle, contenu métallique des cellules) de gènes impliqués dans l'homéostasie et la tolérance au zinc ont été mises en oeuvre chez *Laccaria bicolor*, un champignon ectomycorhizien modèle. L'homéostasie et la tolérance aux ETM sont liées entre autres à l'activité des transporteurs des familles ZIP (*Zrt*-, *Irt*- related Protein) et CDF (*Cation Diffusion Facilitator*). L'étude des membres appartenant à ces deux familles a permis d'affiner la compréhension des mécanismes d'absorption et de séquestration des ETM dans les hyphes des champignons ectomycorhiziens.

Mots clés : phytostabilisation, éléments traces métalliques, champignons mycorhiziens, pollution, tolérance, *Laccaria bicolor*, zinc

Abstract: Phytostabilization is a gentle management option for sites polluted by trace elements (TE). Mycorrhizal fungi could assist plants in stabilizing pollutants by increasing the soil-prospected volume and by immobilizing MTE in their hyphae.

Within the BIOFILTREE project, several approaches were used to select fungal strains that could be used for enhancing the phytostabilization process. Firstly, the mycorrhizal status of roots of three poplar clones from a TE-polluted site and the fungi associated with the roots were analyzed. The roots were colonized by endomycorrhizal, ectomycorrhizal, and endophytic fungi. Our data also revealed some specific trends, *i.e.* *Hebeloma* species was not associated with all poplar genotypes. Secondly, several fungal strains were isolated from polluted sites and their *in vitro* tolerance to TE was tested. There was a strong inter- and intra-specific variation in metal tolerance. In a greenhouse study, two poplar clones were inoculated with an endomycorrhizal inoculum and grown on a TE-polluted soil. A slight modification in TE accumulation in shoots was observed.

In parallel, the role of ZIP (*Zrt-Irt*- like Proteins) and CDF (*Cation Diffusion Facilitator*) proteins in TE homeostasis/tolerance was also studied in the ectomycorrhizal model fungus *Laccaria bicolor*. The corresponding proteins were functionally characterized by the use of different approaches (yeast complementation, GFP-chimeric proteins, transcript analyses, cell metal content analyses). This study allowed us to better understand the mechanisms underlying zinc uptake and compartmentation in the hyphae of this fungus.

Key-words: phytostabilization, trace elements, mycorrhizal fungi, pollution, tolerance, *Laccaria bicolor*, zinc

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Abréviations

Synthèse bibliographique..... 1

1. Les éléments traces métalliques dans les sols..... 3

1.1.	Les éléments traces métalliques	3
1.2.	Origine des éléments traces métalliques dans les sols	5
1.2.1.	Origine naturelle.....	5
1.2.2.	Origine anthropique	7
1.3.	Comportement des éléments trace métalliques dans les sols.....	7
1.4.	La pollution des sols par les éléments trace métalliques.....	11
1.4.1.	Sites et sols pollués en France	11
1.4.2.	Normes de pollution et évaluation des risques.....	13
1.5.	Impacts de la pollution aux ETM sur les organismes terrestres	17
1.5.1.	Effets cellulaires des ETM	17
1.5.1.1.	Altération des membranes cellulaires.....	17
1.5.1.2.	Interactions avec les acides nucléiques	19
1.5.1.3.	Inhibition d'enzymes	19
1.5.2.	Toxicité des ETM au niveau des organismes	21
1.5.2.1.	Toxicité pour l'homme	21
1.5.2.2.	Phytotoxicité	23
1.5.2.3.	Toxicité pour les micro-organismes du sol	23
1.5.2.3.1.	Toxicité pour les champignons	23
1.5.2.3.2.	Toxicité pour les bactéries	25

2. Réhabilitation et remédiation des sites pollués 27

2.1.	Techniques thermiques et physico-chimiques.....	27
2.1.1.	Désorption thermique	27
2.1.2.	Tris physiques ou physico-chimiques	27
2.1.3.	Lavages par agents chimiques ou tensio-actifs	29
2.1.4.	Stabilisation physico-chimique.....	31
2.2.	Techniques biologiques.....	31
2.2.1.	Bio-immobilisation	31
2.2.2.	Biolixiviation	33
2.2.3.	Phytoremédiation.....	33
2.2.3.1.	Phytovolatilisation.....	35
2.2.3.2.	Phytoextraction.....	39
2.2.3.3.	Phytostabilisation.....	43

3. La phytostabilisation 45

3.1.	Choix de l'espèce végétale	45
3.2.	Amélioration du potentiel de phytostabilisation des plantes	49
3.2.1.	Amendements	49
3.2.2.	Association des plantes avec des champignons	51
3.2.2.1.	Les champignons s'associant avec les racines des plantes	53
3.2.2.1.1.	Les champignons endophytes.....	53
3.2.2.1.2.	La symbiose mycorhizienne	53
3.2.2.2.	Apport des champignons mycorhiziens ou endophytes à la phytostabilisation	61
3.2.3.	Association des plantes avec des bactéries.....	65

4. Mécanismes de résistance et tolérance des champignons aux ETM.....	70
4.1. Précipitation extracellulaire des ETM	71
4.2. Fixation des ETM à la paroi fongique	73
4.3. Absorption cellulaire des ETM	75
4.4. Complexation intracellulaire des ETM	77
4.5. Séquestration dans les organites intracellulaires.....	81
4.6. Autres mécanismes de tolérance	83
4.7. Mécanismes de tolérance et résistance et phytostabilisation	83
Objectifs	87
Matériels et méthodes	93
1. Les sites d'études	95
1.1. Le site de Pierrelaye-Bessancourt	95
1.2. Le site de Fresnes-sur-Escaut	97
1.3. Le site de Tavaux	99
1.4. Les sites de Micheville	101
1.5. Le site de Metaleurop	103
2. Matériels biologiques	105
2.1. Matériel végétal	105
2.1.1. Peupliers des dispositifs expérimentaux du projet PHYTOPOP	105
2.1.2. Peupliers et aulnes des sites expérimentaux du projet BIOFILTREE	107
2.1.3. Espèces ligneuses utilisées en conditions contrôlées au laboratoire	111
2.2. Micro-organismes utilisés	111
2.2.1. Souche bactérienne d' <i>Escherichia coli</i>	111
2.2.2. Souches de levures <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	111
2.2.3. Souche de <i>Laccaria bicolor</i>	113
2.2.4. Autres souches de champignons ectomycorhiziens ou endophytes conservées au laboratoire	113
2.3. Plasmides utilisés	113
2.3.1. Plasmides de clonage	113
2.3.1.1. Plasmide pGEM®-T.....	113
2.3.1.2. Plasmide pGEM®-T easy.....	115
2.3.2. Plasmides navette <i>E. coli</i> – <i>S. cerevisiae</i>	115
2.3.2.1. Plasmide pFL61	115
2.3.2.2. Plasmide pYES2-GFP.....	115
3. Méthodes	119
3.1. Quantification du taux de mycorhization.....	119
3.2. Isolement de souches fongiques ectomycorhiziennes.....	119
3.2.1. A partir de carpophores.....	119
3.2.2. A partir de racines d'espèces ligneuses.....	121
3.3. Tests de tolérance des souches fongiques aux éléments traces métalliques	121
3.4. Tests de mycorhization en milieu contrôlé	121
3.4.1. Tests de mycorhization en boîtes de Pétri	121
3.4.2. Tests de mycorhization en pots.....	123
3.5. Techniques d'analyse du sol et de dosage des éléments minéraux.....	125
3.5.1. Prélèvements de sol	125
3.5.2. Détermination de la fraction biodisponible en éléments minéraux du sol	125
3.5.2.1. Extraction par le DTPA (acide Diéthylène Triamine Penta Acétique).....	125
3.5.2.2. Extraction par le NH_4NO_3 (nitrate d'ammonium).....	127
3.5.2.3. Extraction par le $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (nitrate de calcium).....	127
3.5.3. Analyse des teneurs en éléments minéraux dans les tissus végétaux, fongiques et le sol par ICP-AES (<i>Inductively-Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry</i>).....	127
3.5.4. Détermination du pH du sol	129
3.6. Techniques d'extraction et d'analyses des acides nucléiques	129
3.6.1. Techniques d'extraction des acides nucléiques	129

3.6.1.1.	Extraction d'ADN plasmidique d' <i>E. coli</i>	129
3.6.1.2.	Extraction d'ADN génomique.....	131
3.6.1.3.	Extraction d'ARN totaux.....	131
3.6.2.	Séparation d'ADN ou d'ARN par électrophorèse en gel d'agarose	133
3.6.3.	Purification d'ADN	133
3.6.4.	Transcription reverse.....	133
3.6.5.	Amplification de l'ADN par PCR.....	135
3.6.5.1.	Les amorces nucléotidiques	135
3.6.5.2.	Composition d'un mélange réactionnel de PCR.....	137
3.6.5.3.	Différentes enzymes Taq ADN polymérases utilisées et leurs applications.....	137
3.6.5.3.1.	Mesure du taux de transcrits par RT-PCR	137
3.6.5.3.2.	PCR haute-fidélité	139
3.6.5.3.3.	PCR sur colonies.....	141
3.6.5.3.4.	Identification moléculaire de micro-organismes par amplification des régions ITS..	141
3.6.6.	Séquençage de l'ADN	143
3.6.7.	Analyses de séquences à l'aide d'outils de bioinformatique.....	143
3.7.	Techniques de clonage	145
3.7.1.	Préparation du vecteur.....	145
3.7.2.	Préparation du fragment à cloner	147
3.7.3.	Ligation	147
3.7.4.	Transformation des bactéries.....	147
3.7.4.1.	Préparation de bactéries thermocompétentes.....	147
3.7.4.2.	Transformation des bactéries par choc thermique.....	149
3.8.	Expression hétérologue dans la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	149
3.8.1.	Transformation de <i>S. cerevisiae</i>	149
3.8.2.	Complémentation fonctionnelle	151
3.8.2.1.	Test en gouttes.....	151
3.8.2.2.	Suivi de la croissance en milieu liquide	151
3.8.2.3.	Quantification du <i>pool</i> de métaux intracellulaires par ICP-AES	153
3.8.3.	Localisation cellulaire de protéines par fusion GFP (<i>Green Fluorescent Protein</i>).....	153
3.9.	Analyses statistiques	155

Résultats et discussions.....157

1. Identification des communautés fongiques mycorrhiziennes du peuplier sur un sol pollué par des ETM159

1.1.	Quantification du taux de mycorhization.....	159
1.2.	Identification moléculaire des champignons associés aux racines des peupliers	161
1.3.	Discussion	165

2. Sélection de souches fongiques performantes dans la séquestration des éléments traces métalliques177

2.1.	Isolement de souches fongiques ectomycorhiziennes.....	177
2.2.	Caractérisation morphologique et moléculaire des souches fongiques isolées	183
2.2.1.	Caractérisation morphologique.....	183
2.2.2.	Caractérisation moléculaire.....	185
2.3.	Détermination du milieu optimum de croissance.....	187
2.4.	Test de tolérance aux ETM des différentes souches fongiques isolées	191
2.4.1.	Test de tolérance de plusieurs souches de <i>Paxillus involutus</i> aux éléments traces métalliques	191
2.4.2.	Test de tolérance aux ETM de diverses souches isolées des sites expérimentaux de Pierrelaye et Metaleurop	193
2.4.3.	Test de tolérance aux ETM de diverses souches appartenant au genre <i>Hebeloma</i>	195
2.4.4.	Discussion	197
2.5.	Test des souches fongiques d'intérêt en conditions contrôlées	207
2.5.1.	Test en pots	207
2.5.2.	Test des capacités de mycorhization des souches en boîte de Pétri.....	211

2.6.	Etude du potentiel de phytostabilisation de souches fongiques mycorhiziennes sur le terrain ..	215
2.6.1.	Mise en place de parcelles expérimentales.....	215
2.6.2.	Test des souches implantées en conditions contrôlées	217
2.6.3.	Discussion	219
3.	Homéostasie métallique chez le champignon ectomycorhizien <i>Laccaria bicolor</i>	229
3.1.	Détermination de la concentration inhibitrice à 50 % (IC50) de divers ETM chez <i>Laccaria bicolor</i>	229
3.2.	Capacité d'accumulation du zinc par <i>Laccaria bicolor</i>	231
3.3.	Les protéines LbZIPs	233
3.3.1.	Etude phylogénétique et analyse des séquences des transporteurs	233
3.3.1.1.	Sous-famille I : localisation putative à la membrane plasmique.....	235
3.3.1.2.	Sous-famille II : localisation putative à la membrane du réticulum endoplasmique	235
3.3.1.3.	Sous-famille III : localisation putative à la membrane de l'appareil de Golgi	235
3.3.1.4.	Sous-famille IV : localisation putative à la membrane vacuolaire.....	237
3.3.1.5.	Etude de la structure des gènes LbZips	237
3.3.1.6.	Etude de la topologie des protéines LbZIPs	239
3.3.2.	Etude du niveau d'expression des gènes par RT-PCR semi-quantitative	239
3.3.3.	Localisation subcellulaire des protéines de la famille LbZIP	243
3.3.3.1.	Localisation cellulaire des protéines LbZIPA et LbZIPB	243
3.3.3.2.	Localisation cellulaire de LbZIPC	245
3.3.3.3.	Localisation cellulaire de LbZIPD	245
3.3.4.	Complémentation fonctionnelle en système hétérologue, la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	247
3.3.4.1.	Complémentation de levures déficientes en absorption de divers ETM	247
3.3.4.1.1.	Complémentation de la levure déficiente en absorption du zinc : Zrt1-Zrt2Δ	247
3.3.4.1.2.	Complémentation de la levure déficiente en absorption de fer : Fet3-Fet4Δ	251
3.3.4.1.3.	Complémentation de la levure déficiente en absorption du cuivre : Ctr1Δ	251
3.3.4.2.	Surexpression des gènes LbZips chez la levure sauvage en présence de divers ETM	253
3.3.4.3.	Complémentation de la souche de levure mutante Zrt3Δ, incapable de remobiliser le zinc stocké dans la vacuole	253
3.3.5.	Discussion	255
3.4.	Les protéines CDF	269
3.4.1.	Etude phylogénétique et analyse des séquences des transporteurs	269
3.4.1.1.	Sous-famille I : transporteurs putatifs de zinc.....	269
3.4.1.2.	Sous-famille II : transporteurs putatifs de manganèse	271
3.4.1.3.	Sous-famille III : transporteurs putatifs de fer et de zinc	273
3.4.1.4.	Sous-famille IV : transporteurs proches de ScZRG17	273
3.4.1.5.	Etude de la structure des gènes LbCdfs étudiés	273
3.4.1.6.	Etude de la topologie des protéines LbCDFs étudiées	273
3.4.2.	Etude de l'expression des gènes par RT-PCR semi-quantitative	275
3.4.3.	Localisation subcellulaire des protéines LbCDFA, B et C	277
3.4.4.	Complémentation fonctionnelle en système hétérologue.....	277
3.4.5.	Discussion	277
	Conclusions générales et perspectives	285
	Références bibliographiques	305

Liste des figures

Synthèse bibliographique

Figure 1 : Tableau périodique des éléments de Mendeleïev

Figure 2 : L'importance des métaux comme cofacteurs d'enzymes

Figure 3 : Schéma de l'acquisition des teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols

Figure 4 : Influence des variations de pH sur la disponibilité des ETM dans le sol

Figure 5 : Spéciation des ETM dans les sols

Figure 6 : Part des différentes sources de contamination dans l'estimation des quantités totales d'ETM entrant sur les sols agricoles en France

Figure 7 : Les sites et sols pollués en France en 2012

Figure 8 : Origine des différents radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène générées par les ETM et leurs actions sur les biomolécules

Figure 9 : Courbes de réponses « dose-effet biologique » illustrant les effets des changements de concentrations phytodisponibles en oligoéléments (A) ou en éléments non essentiels (B) sur la vitalité de la plante

Figure 10 : Différentes réponses des plantes à l'accroissement de la quantité des ETM dans le sol

Figure 11 : Principaux mécanismes impliqués dans la phytovolatilisation permettant l'absorption, la conversion et la volatilisation des ETM sous forme gazeuse

Figure 12 : Principaux mécanismes impliqués dans la phytoextraction permettant l'absorption, la translocation et la séquestration des ETM dans les parties aériennes

Figure 13 : Principaux mécanismes impliqués dans la phytostabilisation permettant la complexation et la précipitation des ETM dans la rhizosphère et l'adsorption et/ou l'absorption des ETM dans les racines

Figure 14 : Résumé des principaux systèmes de transport et des nutriments échangés lors de la symbiose ecto- ou endomycorhizienne

Figure 15 : Principaux mécanismes de résistance des champignons aux éléments traces métalliques

Figure 16 : Exemples de complexes formés entre un ETM et l'acide oxalique

Figure 17 : Principaux groupements fonctionnels de la paroi, capables de se lier aux ETM, impliqués dans la biosorption des ETM

Figure 18 : Différentes familles de transporteurs d'ETM chez les eucaryotes

Figure 19 : Principaux transporteurs impliqués dans l'homéostasie métallique chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Figure 20 : Caractérisation des gènes ZrfA, ZrfB et ZrfC d'*Aspergillus fumigatus* par complémentation fonctionnelle en levures (A) et chez le champignon (C)

Figure 21 : Localisation par immunofluorescence de protéines ScZRT1 sauvages (WT) et mutantes (K195R, S208A et Δ 205-211)

Figure 22 : Principales molécules impliquées dans la complexation intracellulaire des ETM

Figure 23 : Caractérisation des complexes glutathion-métal transportés par la protéine ScYCF1

Matériels et méthodes

Figure 24 : Différentes zones d'épandage des eaux usées de Paris dans les départements du Val d'Oise et des Yvelines

Figure 25 : Localisation et plan du dispositif expérimental PHYTOPOP de Pierrelaye

Figure 26 : Localisation et plan du dispositif expérimental BIOFILTREE de Pierrelaye

Figure 27 : Localisation et plan du dispositif expérimental BIOFILTREE de Fresnes-sur-Escaut

Figure 28 : Localisation et plan du dispositif expérimental BIOFILTREE de Tavaux

Figure 29 : Localisation des sites de Micheville (A) : les sites des « boues » et des « pins » sont entourés en rouge, les anciens emplacements des différents ateliers de l'usine sont également indiqués (B)

Figure 30 : Lignes d'isoconcentration prédites en cadmium, plomb et zinc dans les sols environnant l'usine de Metaleurop Nord

Figure 31 : Localisation et plan du dispositif expérimental PHYTOPOP de Metaleurop

Figure 32 : Vecteurs de clonage pGEM®-T et pGEM®-T easy (Promega)

Figure 33 : Vecteur de clonage pFL61

Figure 34 : Vecteur de clonage pYES2 (Invitrogen)

Figure 35 : Protocole de préparation des racines et de quantification du taux de mycorhization

Figure 36 : Différentes étapes de l'isolement de souches fongiques ectomycorhiziennes

Figure 37 : Exemple de profil électrophorétique d'ARN totaux

Figure 38 : Principe de la transcription reverse

Figure 39 : Principe général de la PCR

Figure 40 : Test du nombre optimal de cycles d'amplification par PCR pour l'amplification des ADNc LbZips et LbCdfs de *L. bicolor*

Figure 41 : Principe de la mutagenèse dirigée par la technique dite de « *Splicing by Overlap Extension PCR* » (SOE PCR)

Figure 42 : Principe général du sous-clonage d'un gène ou d'une séquence d'intérêt dans les vecteurs pGEM®-T ou pGEM®-T easy et de son clonage dans les vecteurs navettes pFL61 ou pYES2-GFP

Figure 43 : Principe général de la complémentation fonctionnelle de levures déficientes

Résultats et discussions

Figure 44 : Colonisation des racines de peupliers prélevées sur le site expérimental de Pierrelaye par des champignons

Figure 45 : Cercle de corrélation d'une ACP montrant le lien entre les caractéristiques du sol et les taux de colonisation par les champignons mycorhiziens

Figure 46 : ACP représentant la répartition des communautés mycorhiziennes du peuplier en fonction du clone considéré et de la parcelle d'origine des plants

Figure 47 : Différentes souches fongiques isolées à partir de racines de peupliers et leurs modes de vie supposés

Figure 48 : Caractéristiques morphologiques des hyphes de diverses souches fongiques observées au microscope optique (x 400)

Figure 49 : Arbre phylogénétique constitué à partir des séquences ITS des souches fongiques isolées à Pierrelaye et Metaleurop

Figure 50 : Arbre phylogénétique constitué à partir des séquences ITS des souches fongiques isolées à Pierrelaye et Metaleurop appartenant au genre *Hebeloma*

Figure 51 : Croissance des souches fongiques mycorhiziennes en fonction du milieu de culture

Figure 52 : Indice de tolérance de 15 souches de *Paxillus involutus* sur différents milieux

Figure 53 : Croissance de deux souches de *Paxillus involutus*, Pi01 et Pi07, modérément tolérantes au zinc et au cadmium

Figure 54 : Croissance journalière de 11 souches fongiques isolées sur les sites de Pierrelaye et Metaleurop et détermination de l'IC50 en présence de cadmium et de zinc

Figure 55 : Contenu en zinc et cadmium des souches isolées des sites de Pierrelaye et Metaleurop et proportion totale ou journalière consommée par rapport au zinc et cadmium présent dans le milieu

Figure 56 : Différentes étapes du test du potentiel de mycorhization des souches fongiques d'intérêt

Figure 57 : Peupliers du test en pots après deux mois de croissance et leur colonisation par les champignons endomycorhiziens

Figure 58 : Teneurs en calcium (A), potassium (A), fer (B), zinc (C) et cadmium (D) exprimées en mg.kgMS^{-1} dans les feuilles de peupliers « I214 » et « Skado » du test en pots

Figure 59 : Indice de tolérance de la souche S238N-H82 de *L. bicolor* et détermination de la concentration inhibitrice à 50 % (IC50) pour chaque élément testé

Figure 60 : Concentrations intracellulaires en zinc exprimées en $\mu\text{g.gMS}^{-1}$ dans le mycélium de *Laccaria bicolor*

Figure 61 : Classification phylogénétique des organismes fongiques étudiés

Figure 62 : Arbre phylogénétique des protéines de la famille ZIP de 21 organismes fongiques

Figure 63 : Organisation des introns et exons dans les gènes Zip étudiés

Figure 64 : A : Prédiction de la topologie des protéines ZIP de *Laccaria bicolor* ; B : Topologie des protéines appartenant à la famille ZIP

Figure 65 : Taux de transcrits des gènes LbZips en fonction de concentrations croissantes en zinc extracellulaire

Figure 66 : Régulation de la transcription des gènes LbZips

Figure 67 : Régulation de la transcription des gènes LbZips par différents ETM à la concentration inhibitrice à 50 % (IC50)

Figure 68 : Localisation subcellulaire des protéines LbZIPA et LbZIPB dans des cellules de levures

Figure 69 : Localisation subcellulaire de la protéine LbZIPA dans des cellules de levures

Figure 70 : Alignement des séquences protéiques de LbZIPA, LbZIPB, ScZRT1 et AtIRT1

Figure 71 : Localisation subcellulaire de la protéine LbZIPC dans des cellules de levures

Figure 72 : Localisation subcellulaire de la protéine LbZIPD dans des cellules de levures

Figure 73 : Tests de complémentation en milieu solide de la levure mutante *Zrt1-Zrt2Δ*, déficiente en absorption du zinc

Figure 74 : Tests de complémentation en milieu liquide de la levure mutante *Zrt1-Zrt2Δ*, déficiente en absorption du zinc

Figure 75 : Effet de la surexpression des gènes LbZipA et LbZipB sur l'accumulation du zinc par *Zrt1-Zrt2Δ*, souche de levure déficiente en absorption du zinc, comparée à l'accumulation de la souche sauvage (WT), transformée par le vecteur vide (VV)

Figure 76 : Tests de complémentation de la levure mutante *Fet3-Fet4Δ*, déficiente en absorption du fer

Figure 77 : Tests de complémentation de la levure mutante *Ctr1Δ*, déficiente en absorption du cuivre

Figure 78 : Tests de résistance de la levure sauvage au cadmium (A) ou au cobalt (B)

Figure 79 : Caractérisation de la protéine LbZIPC

Figure 80 : Arbre phylogénétique des protéines de la famille CDF de 21 organismes fongiques

Figure 81 : Organisation des introns et exons dans les gènes LbCdfs étudiés

Figure 82 : A : Prédiction de la topologie des protéines CDFs étudiées de *Laccaria bicolor* ; B : Topologie des protéines appartenant à la famille CDF

Figure 83 : Régulation de la transcription des gènes LbCdfs par des concentrations croissantes en zinc extracellulaire

Figure 84 : Régulation de la transcription des gènes LbCdfs par différents métaux

Figure 85 : Régulation transcriptionnelle des gènes LbCdfs par différents métaux à la concentration inhibitrice à 50 % (IC50)

Figure 86 : Régulation de la transcription du gène LbCdfA par épissage alternatif

Figure 87 : Localisation subcellulaire des protéines LbCDFA, B et C dans des cellules de levures

Figure 88 : Tests de complémentation en milieu liquide de souches de levures mutantes (Δ) sensibles au zinc (A : *Zrc1Δ*), au cobalt (B : *Cot1Δ*), au cadmium (C : *Ycf1Δ*) et au manganèse (D : *Pmr1Δ*)

Conclusions et perspectives

Figure 89 : Modèle proposé de l'homéostasie au zinc issue de l'activité des protéines CDFs et ZIPs chez *Laccaria bicolor*

Figure 90 : Outil d'aide à la décision en vue de la phytostabilisation de sites pollués par des ETM à l'aide du peuplier, assistée par des champignons mycorhiziens

Liste des tableaux

Synthèse bibliographique

Tableau I : Différentes références françaises de teneurs totales en éléments traces métalliques dans les boues d'épuration et les sols exprimées en mg.kg.MS^{-1}

Tableau II : Liste (non exhaustive) des principales normes existantes et utilisées en laboratoire pour la caractérisation d'un sol pollué, de l'échantillonnage au dosage des ETM

Tableau III : Estimation des coûts unitaires de traitement de sols pollués par des ETM

Tableau IV : Concentrations habituelles en ETM chez les plantes, limites basses de concentrations chez les hyperaccumulatrices et principales familles de plantes hyperaccumulatrices

Tableau V : Plantes étudiées pour leur potentiel de phytostabilisation et principaux effets observés

Tableau VI : Différents types de mycorhizes

Tableau VII : Etudes récentes sur l'impact des champignons endomycorhiziens sur la tolérance des plantes aux ETM et principaux effets

Tableau VIII : Etudes récentes sur l'impact des champignons ectomycorhiziens sur la tolérance des plantes aux ETM et principaux effets

Matériels et méthodes

Tableau IX : Concentrations moyennes en ETM et caractéristiques du sol de Pierrelaye dans le fond pédogéochimique naturel (FPGN), les teneurs agricoles habituelles locales (TAHL) et les dispositifs expérimentaux PHYTOPOP et BIOFILTREE

Tableau X : Concentrations moyennes en ETM et caractéristiques du sol du dispositif expérimental de Fresne-sur-Escaut

Tableau XI : Concentrations moyennes en ETM (mg.kg^{-1}) des sols en France et du dispositif expérimental de Tavaux

Tableau XII : Concentrations moyennes totales et biodisponibles en ETM (mg.kg^{-1}) des sites de Micheville

Tableau XIII : Concentrations moyennes en ETM et caractéristiques des sols de référence, et des sols autour de l'usine de Metaleurop Nord et du dispositif expérimental PHYTOPOP situé sur la commune de Leforest

Tableau XIV : Liste et principales caractéristiques des cultivars utilisés pour les essais de terrain dans le cadre du projet PHYTOPOP

Tableau XV : Composition du milieu LB (Luria-Bertani)

Tableau XVI : Génotypes des souches de levures utilisées

Tableau XVII : Composition du milieu YPD

Tableau XVIII : Composition des milieux Pachlewski et Pach 10

Tableau XIX : Composition des milieux MMN (Modified Melin-Norkrans) et MMN optimisé

Tableau XX : Composition du milieu N2P2

Tableau XXI : Composition du milieu MS (Murashige et Skoog)

Tableau XXII : Composition du tampon TBE 10X

Tableau XXIII : Composition du tampon de charge (6X)

Tableau XXIV : Amorces utilisées au cours de cette thèse

Tableau XXV : Conditions de RT-PCR pour l'amplification des ADNc de *Laccaria bicolor*

Tableau XXVI : Conditions d'amplification avec l'ADN polymérase Phirell®

Tableau XXVII : Enzymes de restriction utilisées pour la RFLP en fonction des amorces choisies

Tableau XXVIII : Conditions de digestion des séquences ITS en RFLP

Tableau XXIX : Composition des milieux SOB et SOC

Tableau XXX : Composition des solutions de transformation des levures

Tableau XXXI : Composition du milieu SD-ura

Tableau XXXII : Composition du milieu minimum (MM)

Résultats et discussions

Tableau XXXIII : Quantification du taux de mycorhization de divers clones de peupliers du site expérimental PHYTOPOP de Pierrelaye

Tableau XXXIV : Principales OTUs détectées par amplification des séquences ITS avec le couple d'amorces « U » (ITS1-ITS4)

Tableau XXXV : Principales OTUs détectées par amplification des séquences ITS avec les couples d'amorces « B » (ITS1F-ITS4B) et « G » (AML1-AML2)

Tableau XXXVI : Souches mycorhiziennes utilisées au cours de cette thèse et leurs origines

Tableau XXXVII : Résultats de la comparaison des séquences ITS amplifiées avec le couple d'amorces ITS1-ITS4 de quelques souches fongiques isolées à la base de données NCBI par blast

Tableau XXXVIII : Récapitulatif de la composition des différents milieux de culture utilisés pour l'isolement et la conservation de souches fongiques mycorhiziennes

Tableau XXXIX : Croissance moyenne de 9 souches appartenant au genre *Hebeloma* en présence de différentes concentrations de cadmium ou de zinc

Tableau XL : Nombre de publications recensées sur les bases de données Web of Knowledge ou Pubmed lors de recherches par mots clés « phytoremediation + élément » ou « tolerance + fungi + élément »

Tableau XLI : Informations génomiques des protéines LbZIPs

Tableau XLII : Informations génomiques des protéines LbCDFs

Abréviations

ACP	Analyse en Composantes Principales
ADEME	Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie
ADN	Acide DésoxyNucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNg	ADN génomique
ADNr	ADN ribosomique
AFNOR	Association Française de NORmalisation
AFOCEL	Association FORêt CELLulose
AM	endoMycorhizes à Arbuscules
ANOVA	<i>ANalysis Of VAriance</i>
ANR	Allocation Nationale de Recherche
ARN	Acide désoxyRiboNucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
Ag	Argent
Al	Aluminium
As	Arsenic
Au	Or
BET	Bromure d'ETHidium
Bi	Bismuth
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BRGM	Bureau de Recherches Géologiques et Minières
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C	Carbone
CaCl₂	Chlorure de Calcium
CMAC	7-Amino-4-ChloroMethylCoumarine
Cd	Cadmium
CDF	<i>Cation Diffusion Facilitator</i>
Co	Cobalt
Cr	Chrome
Cu	Cuivre
DAPI	4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole
dATP	désoxyAdénine TriPhosphate
DMDSe	DiMéthyl DiSéleniure
DMSe	DiMéthyl Séleniure
DMSO	DiMéthylSulfOxide
DO	Densité Optique
DSE	<i>Dark Septate Endophyte</i>
DTPA	acide Diéthylène Triamine Penta Acétique
ECM	ECtoMycorhizes
EDDS	acide EthylèneDiamine-N-N'-DiSuccinique
EDTA	acide Ethylène Diamine Tétra Acétique
EEM	EctEndoMycorhizes
ERM	Mycorhizes ERicoïdes
ETM	Eléments Traces Métalliques
Fe	Fer

FPGN	Fond Pédo-Géochimique Naturel
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
Hg	Mercure
ICP-AES	<i>Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry</i>
In	Indium
INERIS	Institut National de l'EnviRonnement industriel et des rISques
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IPTG	Isopropyl β -D-1-ThioGalactoPyranoside
IRT	<i>Iron Regulated Transporter</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
M	Mol.l ⁻¹
MHB	<i>Mycorrhiza Helper Bacteria</i>
MMN	<i>Modified Melin-Norkrans</i>
Mn	Manganèse
MTP	<i>Metal Tolerance Protein</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
N	azote
NF	Norme Française
Ni	Nickel
NTA	acide NitriLoTriAcétique
O	Oxygène
ORM	Mycorhizes d'ORchidées
P	Phosphore
PEG	Poly-Ethylène Glycol
Pb	Plomb
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGPR	<i>Plant Growth Promoting Rhizobacteria</i>
PSAG	Protéines du Sol Associées à la Glomaline
PVPP	PolyVinylPyrrolidone
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	rotations par minute
RT	<i>Reverse Transcriptase</i>
Sb	Antimoine
Se	Sélénium
Sn	Etain
SOD	<i>SuperOxyde Dismutase</i>
TBE	Tris Borate EDTA
TCR	Taillis à Courte Rotation
Th	Thorium
Tl	Thallium
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
TTCR	Taillis à Très Courte Rotation
UFC	Unité Formant Colonie
UV	Ultra-Violet
VNF	Voies Navigables de France
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
ZIP	<i>ZRT-IRT like Proteins</i>
Zn	Zinc
ZRT	<i>Zinc Regulated Transporter</i>

Synthèse bibliographique

1. Les éléments traces métalliques dans les sols

1.1. Les éléments traces métalliques

Les métaux sont des éléments chimiques qui participent aux réactions sous forme de cation et qui ont comme propriétés communes d'être d'excellents conducteurs électriques (Figure 1).

Le terme de métaux lourds est souvent utilisé dans la littérature. Les métaux « lourds » sont des éléments chimiques toxiques dont la masse volumique dépasse 5 g.cm^{-3} , de numéro atomique supérieur à 20 et formant des précipités insolubles avec les sulfures (Wang & Chen, 2006). C'est le cas, par exemple, du zinc, du cuivre, du plomb, du mercure, du chrome, du manganèse, du cobalt, de l'argent, du nickel et du cadmium. Mais ce terme « métaux lourds » est discuté car imprécis et mal défini. En effet, sous ce terme sont également regroupés d'autres éléments toxiques appartenant aux métalloïdes tels que l'arsenic et le sélénium ou encore des éléments qui ne sont pas « lourds » tels que l'aluminium ou le béryllium. De plus, le terme « métaux lourds » est synonyme d'une certaine toxicité. Cependant, certains de ces éléments sont indispensables à de nombreux processus biologiques et sont ainsi appelés oligoéléments ; c'est le cas par exemple du zinc ou du cuivre. D'autres n'ont aucun rôle biologique connu et sont donc toxiques, comme le mercure. Les oligoéléments peuvent par exemple jouer le rôle de cofacteur d'enzyme et la protéine formée sera appelée métallo-enzyme (Figure 2) (Waldron *et al.*, 2009). Les métaux les plus souvent utilisés comme cofacteurs enzymatiques sont le magnésium (16 %), le zinc (9 %), le fer (8 %) et le manganèse (6 %). De plus, le magnésium, le zinc et le manganèse sont des cofacteurs des six classes d'enzymes de la nomenclature EC (*Enzyme Commission numbers*) (oxydoréductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérases et ligases) (Waldron *et al.*, 2009).

Dans ce cas, l'appellation éléments traces métalliques ou ETM est souvent utilisée par de nombreux auteurs. Ce terme regroupe des éléments métalliques naturels trouvés à l'état de traces dans l'environnement. Dans les sols, on admet généralement que les éléments traces sont ceux dont la concentration moyenne dans la croûte terrestre est inférieure à 0,1 %. Ils représentent ainsi 0,6 % du total, alors que les 12 éléments majeurs (Si, Al, Fe, Ca, Na, Mg, K, Ti, P, Mn, S et Ba) interviennent pour 99,4 % (Baize, 1997). La majorité des éléments traces présents dans les sols appartiennent à la famille chimique des métaux et métalloïdes, mais seulement une partie d'entre eux présente un intérêt écologique, biologique ou économique. Bien que le terme « éléments traces métalliques » (ETM) reste vague, il sera employé dans ce manuscrit car il est couramment admis dans la communauté scientifique et reste plus précis que son prédécesseur « métaux lourds ». Dans le cadre de cette étude, l'aluminium, le fer et le manganèse, non considérés comme

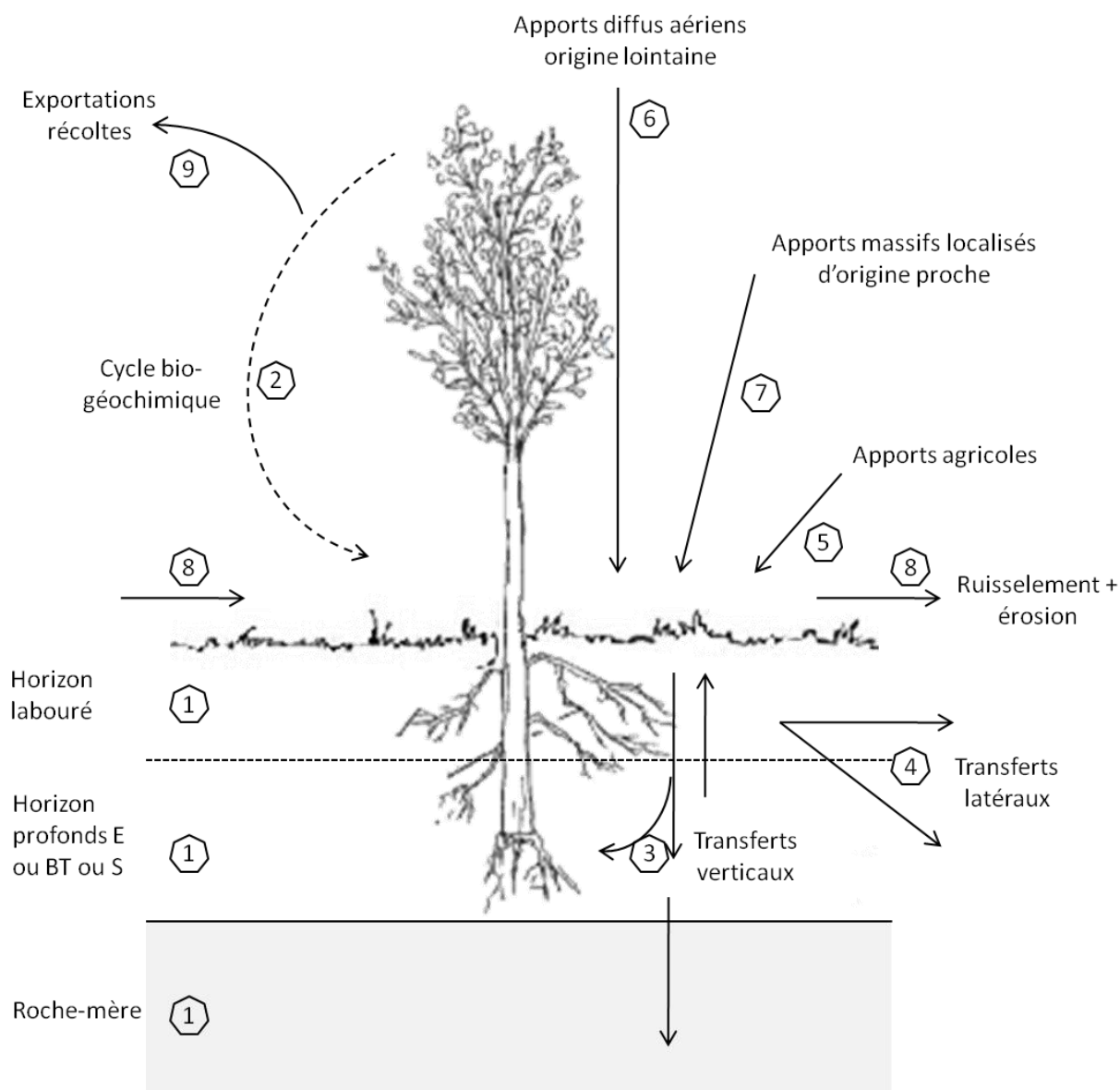


Figure 3 : Schéma de l'acquisition des teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (d'après Baize, 1997)

« traces », seront également considérés comme des ETM car ils sont également toxiques pour les plantes ou les micro-organismes à fortes doses.

1.2. Origine des éléments traces métalliques dans les sols

La présence d'ETM dans le sol est souvent imputée aux activités domestiques, agricoles ou industrielles. La figure 3 résume les différents apports possibles des ETM dans les sols et leurs origines. Cependant, une partie des ETM présents dans le sol sont d'origine naturelle.

1.2.1. Origine naturelle

Le fond pédo-géochimique local (FPGL) correspond aux teneurs totales en éléments chimiques retrouvés dans un sol, en absence de contaminations liées aux activités humaines. Ce fond pédo-géochimique local résulte d'une combinaison de plusieurs phénomènes géologiques, pédologiques et autres, représentés par la figure 3 (Baize, 1997).

La première cause, et la plus importante, de la présence d'ETM dans un sol provient de l'altération de la roche-mère qui le constitue. Selon la composition chimique initiale de la roche, un sol sera plus ou moins enrichi en oligo-éléments et/ou en ETM (Figure 3 ①). En France, les roches sont très variées à la fois par leur faciès lithologique (granites, gneiss, grès, craies...) et par leur composition chimique. Par exemple, les sols argileux et riches en fer sont particulièrement riches en nickel ; c'est notamment le cas dans les Vosges et le Jura où les teneurs en nickel peuvent dépasser 150 mg.kg^{-1} ($< 25 \text{ mg.kg}^{-1}$ dans les autres régions). De même, pour le plomb, de plus fortes teneurs ($> 100 \text{ mg.kg}^{-1}$ contre $< 30 \text{ mg.kg}^{-1}$ habituellement) sont présentes dans les horizons profonds situés dans les zones de contact entre les bassins sédimentaires et les massifs cristallins, notamment dans le Morvan et certaines zones du Massif central. Les ETM peuvent aussi être apportés par le vent ou la pluie sous forme de poussières ou d'aérosols provenant d'activités volcaniques, d'embruns maritimes ou de la volatilisation de météorites lorsqu'elles pénètrent dans l'atmosphère (Figure 3 ⑥). Les transferts pédologiques latéraux peuvent aussi apporter, par exemple via l'érosion d'un sol en amont, des particules chargées en ETM. Certains ETM passent sous une forme soluble à des pH acides ($\text{pH} < 5$) et peuvent ainsi être apportés par les eaux de ruissellement (Figure 3 ④).

La composition d'un sol en ETM peut aussi varier entre les différents horizons. Ainsi, un cycle biogéochimique se met en place entre les sols et les plantes. Ces dernières absorbent les ETM via les racines et les redistribuent dans leurs différents organes (Figure 3 ②). Ils retourneront ensuite dans les sols, soit directement (décomposition des racines), soit indirectement (enrichissement des horizons supérieurs par décomposition des parties aériennes), sous des formes plus mobiles et plus biodisponibles (Figure 3 ③). L'exportation des récoltes rompt ce cycle puisqu'elle provoque le départ des ETM contenus dans les feuilles,

Tableau I : Différentes références françaises de teneurs totales maximales autorisées en éléments traces métalliques dans les boues d'épuration et les sols exprimées en mg.kgMS^{-1} (d'après Baize & Tercé, 2002)

		Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	Hg	Se
Norme NF U 44-041 (1985)	Boues	20	1000	1000	200	800	3000	10	100
	Sols	2	150	100	50	100	300	1	10
Article 11 de l'arrêté du 8/01/1998	Sols	2	150	100	50	100	300	-	-

les tubercules et/ou les graines des végétaux et entrent ainsi dans la chaîne alimentaire humaine (Figure 3 ⑨).

Enfin, les précipitations annuelles de nos climats tempérés sont responsables de transferts pédologiques verticaux ou latéraux (Figure 3 ③④) car les plantes n'ont pas une évapotranspiration suffisante pour compenser les phénomènes d'érosion ou d'infiltration dus à la pluie.

La combinaison de ces différents facteurs est à l'origine du fond pédo-géochimique local d'un sol. En revanche, les activités humaines peuvent modifier cet équilibre au niveau local et lointain.

1.2.2. Origine anthropique

Certaines pratiques agricoles sont une première cause de pollution d'un sol par les ETM due aux activités humaines (Figure 3 ⑤). En effet, certains engrais, surtout ceux d'origine organique (engrais phosphatés, lisiers, boues d'épuration) peuvent contenir des quantités non négligeables d'ETM. Par exemple, une étude menée en Espagne sur l'impact de l'épandage de boues d'épuration sur des sols a montré une nette augmentation des taux de zinc, cadmium, cuivre, nickel, plomb et chrome dans ces sols (Walter & Cuevas, 1999). Par ailleurs, une norme française mise en place en 1985, la norme AFNOR NF U 44-041 réglemente les teneurs en ETM autorisées dans les boues d'épuration destinées à l'épandage agricole ainsi que les quantités possibles à épandre par hectare (Tableau I (Baize & Tercé, 2002)). Certains produits de traitement phytosanitaire peuvent aussi contenir des ETM (sels de cuivre, arséniate de plomb...).

Le vent et la pluie peuvent aussi véhiculer des particules, poussières ou aérosols provenant des chauffages, des activités industrielles ou des automobiles qui constituent des apports diffus aériens d'origine lointaine (Figure 3 ⑥). Plus localement, des apports massifs d'origine proche, dus à une source de pollution importante dans un site très proche du sol étudié, (Figure 3 ⑦) sont aussi possibles. Par exemple, l'un des sites expérimentaux situé à Noyelles-Godault, utilisé dans le cadre de cette thèse, est situé à côté d'une usine métallurgique désaffectée dont les fumées ont déposé de grandes quantités d'ETM sur les parcelles avoisinantes (Godin *et al.*, 1985).

1.3. Comportement des éléments trace métalliques dans les sols

Dans le sol, les ETM se répartissent entre les phases liquides et solides du sol. Cette distribution dépend d'une part, de la forme sous laquelle ils ont été apportés au sol et d'autre part, des propriétés physico-chimiques ainsi que des espèces présentes dans le sol. Ce phénomène est appelé spéciation des ETM.

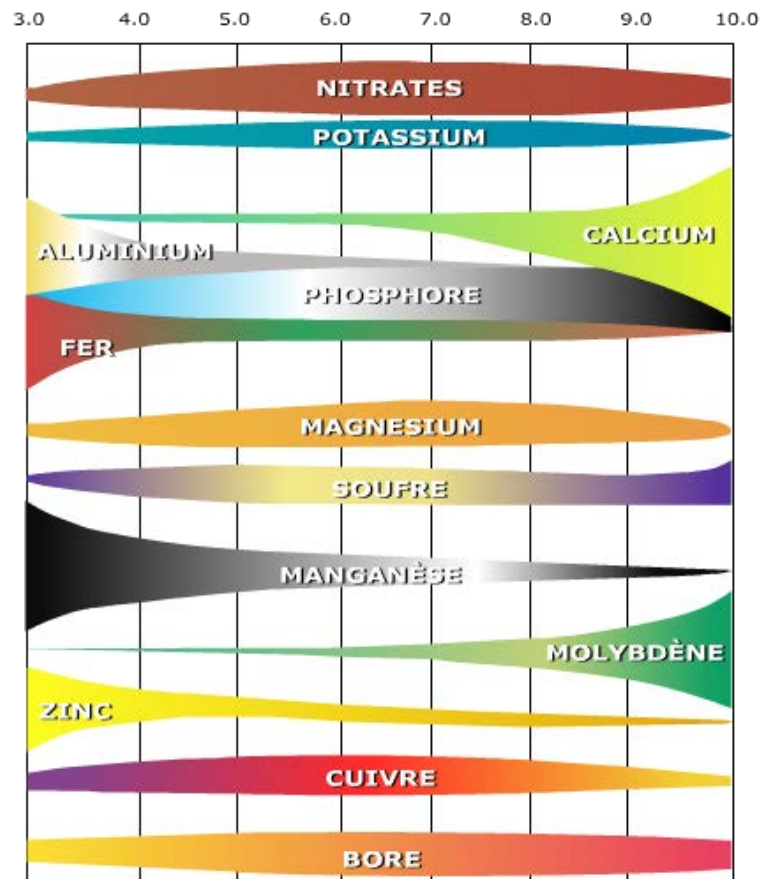


Figure 4 : Influence des variations de pH sur la disponibilité des ETM dans le sol (d'après Truog, 1947). L'aire de la courbe reflète la disponibilité des ETM, plus celle-ci est importante, plus les éléments sont disponibles à un pH donné.

Dans la solution du sol (phase liquide), les ETM peuvent être présents sous forme de cations, d'hydroxydes ou d'oxyanions selon leur charge, leur électronégativité et/ou leur rayon ionique. L'oxygène étant l'anion dominant dans la phase liquide ou solide du sol, les ETM sont souvent associés à l'oxygène dans le sol, soit par hydratation, soit par hydroxylation (Bourrelrier & Berthelin, 1998). Les ETM sont souvent présents sous forme de complexes solubles dans la solution du sol. Ces complexes peuvent être inorganiques par association avec les sulfites, carbonates, nitrites ou nitrates, chlorures ou phosphates présents dans le sol dont les concentrations dépendent de la nature de la roche mère, du climat et des amendements. Des complexes avec des composés organiques comme les acides organiques (acide citrique, oxalique, fulvique...), certains peptides (glutathion) ou protéines (métallothionéines) ou autres composés (sidérophores) sont également possibles et sont liés à l'activité microbienne et rhizosphérique du sol (Deneux-Mustin *et al.*, 2003).

Les ETM peuvent également être présents dans la phase solide du sol. En effet, la plupart des composés organiques (matière organique) et minéraux (argiles, oxydes) du sol possède des charges positives ou négatives de surface qui interviennent dans l'échange ou l'adsorption d'ions (Deneux-Mustin *et al.*, 2003). Deux types de réactions d'adsorption sont possibles (Citeau *et al.*, 2008) :

- l'adsorption par échange d'ions, qui est facilement réversible car les liaisons sont faibles et s'effectue notamment avec les argiles ou la matière organique ;
- l'adsorption par complexation de surface, qui a lieu avec les constituants du sol possédant des groupements oxygénés (-OH) comme les argiles, la matière organique, les oxyhydroxydes de fer et de manganèse, les carbonates et qui est plus stable que l'adsorption par échange d'ions.

Enfin, des réactions de précipitation des ETM sont possibles par agrégation avec de petites particules organiques (sels organiques) ou minérales (phosphates, hydroxydes). La cohésion de ces agrégats est très forte et rend la réversibilité de la réaction plus difficile (Deneux-Mustin *et al.*, 2003).

Plusieurs facteurs influencent directement la mobilité et la réactivité de ces éléments dans le sol. Les facteurs les plus fréquemment décrits sont la température, le potentiel d'oxydoréduction ou potentiel redox (E_H) et le pH. La température a principalement un effet indirect en modifiant l'activité microbienne du sol et ainsi en modifiant la biodégradation de la matière organique (ADEME & APCA., 2005). Le potentiel redox influence la mobilité des ETM par trois principales voies : i) par un changement du degré d'oxydation de l'ETM, ii) par formation d'un complexe soluble en changeant l'état d'oxydation de la molécule complexante et iii) par formation ou dissolution de phases porteuses accueillant l'ETM (Bourrelrier & Berthelin, 1998). Le pH est un facteur qui influence fortement la mobilité des ETM dans le sol (Citeau *et al.*, 2008). D'une manière générale, lorsque les éléments sont stables sous forme de cations (Cd, Zn, Mn, Al, Fe, Pb...), leur solubilité diminue lorsque le pH augmente et lorsque les éléments sont stables sous forme d'anions (As, Sb, Se), l'effet inverse est observé (Truog, 1947 ; Deneux-Mustin *et al.*, 2003) (Figure 4).

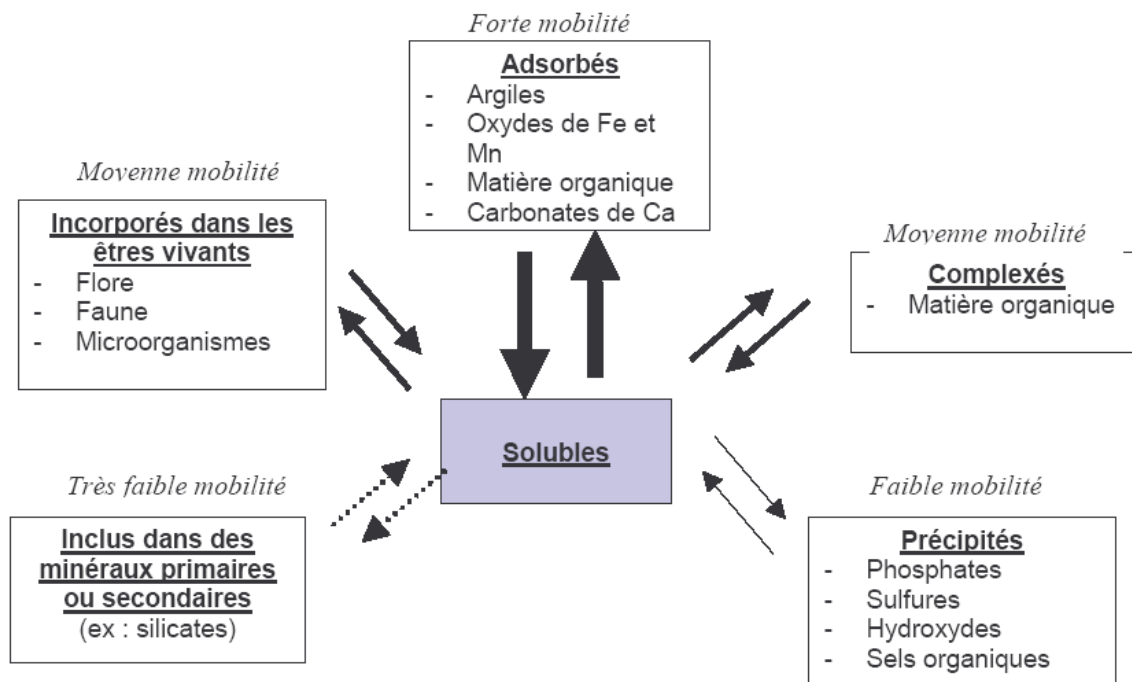


Figure 5 : Spéciation des ETM dans les sols (ADEME & APCA, 2005). La taille des flèches reflète la mobilité des ETM

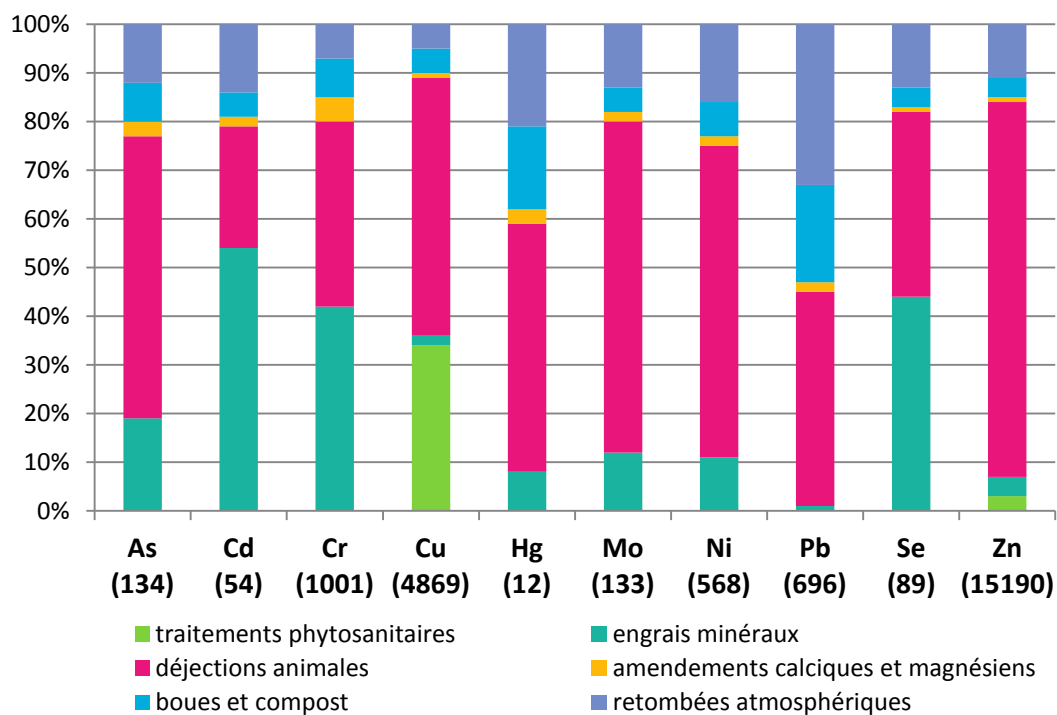


Figure 6 : Part des différentes sources de contamination dans l'estimation des quantités totales d'ETM entrant sur les sols agricoles en France (d'après Sogreah, 2007). Les données entre parenthèses correspondent aux quantités totales estimées d'ETM, exprimées en tonnes, entrant sur les sols agricoles en France par an.

La spéciation des ETM n'est pas figée dans le temps et est fortement dépendante de la nature de l'élément et des propriétés physico-chimiques du sol (Figure 5). De plus, les conditions du milieu (pH, E_h) influencent également la mobilité des ETM dans les sols. La fraction mobile ou mobilisable des ETM dans la solution du sol correspond à la fraction disponible pour les organismes vivants. La biodisponibilité d'un élément est définie par la quantité d'un élément donné qui peut-être transférée dans un organisme vivant (bactérie, champignon, plante ou animal) au cours de sa vie (Bourrelier & Berthelin, 1998).

1.4. La pollution des sols par les éléments trace métalliques

1.4.1. Sites et sols pollués en France

Un sol est considéré comme contaminé par les ETM lorsque la teneur en un élément donné est significativement supérieure à sa concentration naturelle dans le sol étudié, *i.e.* le fond pédo-géochimique local. Les horizons supérieurs des sols étant généralement contaminés par des apports d'origine diffuse, le fond pédo-géochimique local est évalué à partir des horizons profonds (Citeau *et al.*, 2008). En France, une étude réalisée par la société Sogreah à la demande de l'ADEME a permis d'identifier les sources de contamination et d'évaluer les quantités d'ETM entrant sur les sols agricoles (Sogreah, 2007). Les principales sources de contamination mises en évidence par cette étude sont par ordre croissant de contribution : les traitements phytosanitaires (sauf pour le cuivre et le zinc), les amendements calciques, les boues et composts, les retombées atmosphériques, les engrais minéraux et les déjections animales (Figure 6).

Lorsque la contamination d'un sol par les ETM a pour conséquence une perturbation du milieu ou de l'usage qui en est fait habituellement, le site est considéré comme pollué. Selon le site du ministère en charge de l'écologie et du développement durable, un site pollué est un site qui « du fait d'anciens dépôts de déchets ou d'infiltration de substances polluantes, présente une pollution susceptible de provoquer une nuisance ou un risque pérenne pour les personnes ou l'environnement. Ces situations sont souvent dues à d'anciennes pratiques sommaires d'élimination des déchets, mais aussi à des fuites ou à des épandages de produits chimiques, accidentels ou pas. Il existe également autour de certains sites des contaminations dues à des retombées de rejets atmosphériques accumulés au cours des années voire des décennies. La pollution présente un caractère concentré, à savoir des teneurs souvent élevées et sur une surface réduite (quelques dizaines d'hectares au maximum). Elle se différencie des pollutions diffuses, comme celles dues à certaines pratiques agricoles ou aux retombées de la pollution automobile près des grands axes routiers. De par l'origine industrielle de la pollution, la législation relative aux installations classées est la réglementation la plus souvent utilisée pour traiter les situations correspondantes ». Cette définition de la pollution est donc plus restrictive car seuls les sites pollués à la suite d'une contamination ponctuelle sont concernés. Mais, en

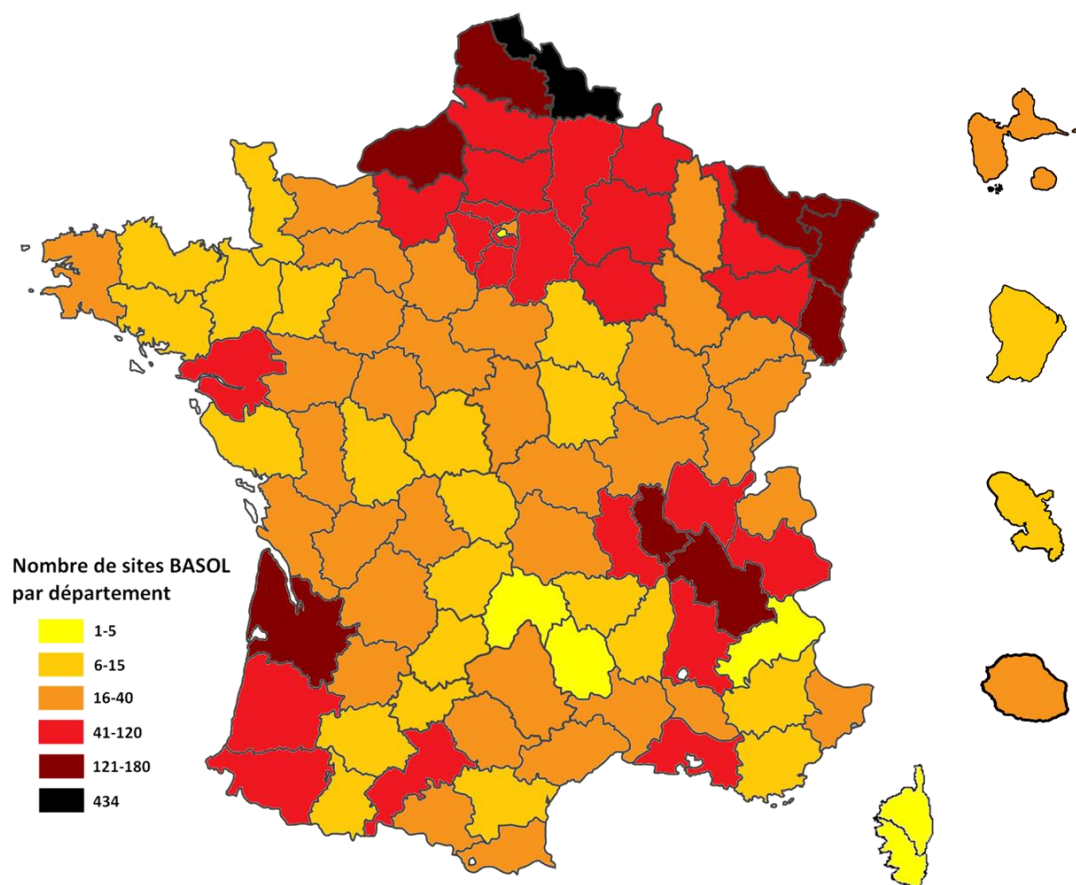


Figure 7 : Les sites et sols pollués en France en 2012 (d'après les données disponibles sur le site BASOL²). Les dix principaux polluants recensés sur ces sites par ordre d'importance sont : hydrocarbures (36,89 %), Pb (17,67 %), hydrocarbures aromatiques polycycliques (15,72 %), solvants halogénés (14,35 %), Cr (14,31 %), Cu (14,18 %), As (12,79 %), Ni (10,02 %), Zn (9,79 %), Cd (6,30 %). Les sites peuvent être contaminés par un ou plusieurs de ces polluants simultanément.

² <http://basol.ecologie.gouv.fr/recherche.php>

général, les contaminations ponctuelles sont concentrées sur une surface réduite et à des teneurs élevées et sont souvent liées aux exploitations minières, industrielles ou aux décharges. En France, les sites pollués sont répertoriés et font l'objet d'un suivi détaillé. Deux bases de données ont été créées afin d'en réaliser l'inventaire :

- Basol³ qui répertorie les sites pollués ou potentiellement pollués appelant une action des pouvoirs publics à titre préventif ou curatif. Actuellement, environ 4350 sites sont enregistrés dans cette base (Figure 7) ;
- Basias⁴ qui a pour objectifs de recenser, de façon large et systématique, tous les sites industriels abandonnés ou non, susceptibles d'engendrer une pollution de l'environnement ; de conserver la mémoire de ces sites ; et de fournir des informations utiles aux acteurs de l'urbanisme, du foncier et de la protection de l'environnement. Actuellement, environ 350000 sites y sont répertoriés.

1.4.2. Normes de pollution et évaluation des risques

Il est très difficile, voire impossible, de définir une valeur seuil pour un élément à partir de laquelle un sol présente un risque et/ou nécessite une intervention. En effet, ce risque dépend principalement du type de sol considéré, de la biodisponibilité des ETM et de l'usage du site. C'est pourquoi, il existe peu de normes de pollution des sols et celles-ci varient d'un pays à un autre. Par exemple, en France, il n'existe pas réellement de valeurs seuils à partir desquelles un sol est considéré comme pollué. Seule, la norme NF U 44-041 de juillet 1985 a pour but de réglementer l'épandage de boues de station d'épuration sur les sols à vocation agricole. Elle précise des teneurs maximales en ETM à ne pas dépasser dans les boues et les sols. Les valeurs de cette norme sont données dans le tableau I. Dans le texte de cette norme, il est aussi prévu d'effectuer une analyse de la teneur en ETM avant le 1er épandage, puis tous les 10 ans. De plus, le pH du sol après épandage doit impérativement être maintenu supérieur ou égal à 6. En effet, les ETM sont d'autant moins mobiles et biodisponibles dans les sols que le pH est neutre ou alcalin (Baize & Tercé, 2002). Une nouvelle réglementation, l'article 11 de l'arrêté du 8 janvier 1998 reprend les mêmes valeurs seuils de pollution (Tableau I), mis à part la suppression des valeurs de référence pour le mercure et le sélénium. Il est à noter que des dérogations peuvent être accordées par le préfet s'il est démontré que les ETM d'un sol particulier ne sont pas biodisponibles. Une modification concernant le pH a également été mise en place : « les boues ne doivent pas être épandues sur des sols dont le pH avant épandage est inférieur à 6 ». Cette norme ne concerne donc que les sites à vocation agricole et l'épandage des boues qui ne contribue à la contamination de ces sols que pour 8 % environ des apports en ETM (Sogreah, 2007).

³ <http://basol.ecologie.gouv.fr>

⁴ <http://basias.brgm.fr>

Tableau II : Liste (non exhaustive) des principales normes existantes et utilisées en laboratoire pour la caractérisation d'un sol pollué, de l'échantillonnage au dosage des ETM⁵

Etape		Norme AFNOR	Date	Dénomination de la norme
Echantillonnage		NF ISO 10381-3	mars-02	Qualité du sol - Échantillonnage - Partie 3 : lignes directrices relatives à la sécurité
		NF ISO 10381-2	mars-03	Qualité du sol - Échantillonnage - Partie 2 : lignes directrices pour les techniques d'échantillonnage
Prétraitement des échantillons		NF ISO 11464	déc-06	Qualité du sol - Prétraitement des échantillons pour analyses physico-chimiques
Mise en solution des ETM	Evaluation des teneurs "totales" ou "HF"	NF X 31-147	juil-96	Mise en solution des ETM avant dosage
		NF ISO 14869-1	août-01	Qualité du sol - Mise en solution pour la détermination des teneurs élémentaires totales - Partie 1 : mise en solution par l'acide fluorhydrique et l'acide perchlorique
	Evaluation des teneurs "pseudo-totales" ou "ER"	NF ISO 11466	juin-95	Qualité du sol - Extraction des éléments traces solubles dans l’eau régale
		NF ISO 16772	sept-04	Dosage du mercure dans les extraits de sol à l’eau régale
	Evaluation des teneurs "biodisponibles"	NF X 31-121	mai-93	Détermination du cuivre, du manganèse, du zinc et du fer – Extraction en présence de DTPA
		NF ISO 14870	mars-02	Extraction des éléments en traces par une solution tamponnée de DTPA
		NF X 31-120	mai-03	Détermination du cuivre, du fer, du manganèse et du zinc – Extraction par l’acétate d’ammonium en présence d’EDTA
		NF EN ISO 17402	août-11	Qualité du sol - Lignes directrices pour la sélection et l'application des méthodes d'évaluation de la biodisponibilité des contaminants dans le sol et les matériaux du sol
Dosage des ETM		NF ISO 22036	févr-09	Qualité du sol - Dosage des éléments traces dans des extraits de sol par spectrométrie d'émission atomique avec plasma induit par haute fréquence (ICP-AES)

⁵ <http://www.boutique.afnor.org/normes>

En France, chaque site potentiellement pollué est évalué au cas par cas en se basant principalement sur la comparaison entre le fond pédo-géochimique local et les données du site étudié. Quatre éléments majeurs sont pris en compte dans l'évaluation des risques liés à la contamination d'un site par les ETM : la source, le vecteur, la cible de la pollution et l'usage du site.

Plusieurs normes, françaises ou européennes, ont été créées afin de fournir les outils nécessaires à la caractérisation des sols contaminés qui permettent de mieux connaître la source et les vecteurs. Cela permet de standardiser sur l'ensemble du territoire voire sur le plan international les méthodes d'échantillonnage, de traitement des échantillons et de dosage des ETM. Le tableau II dresse une liste non exhaustive de normes permettant la caractérisation de sols contaminés par des ETM.

Les vecteurs peuvent être de diverses natures telles que l'air, l'eau ou les végétaux. Dans le cas des ETM, il est alors nécessaire de soigneusement caractériser la nature de la contamination du site, c'est-à-dire connaître la spéciation des éléments. En effet, la fraction soluble peut migrer vers les nappes phréatiques alors que la fraction biodisponible peut être assimilée par les végétaux et rentrer ainsi dans la chaîne alimentaire. Afin d'évaluer la fraction biodisponible des ETM, il était couramment admis que les extractions au DTPA (Acide Diéthylène Triamine Penta Acétique) ou à l'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétracétique) étaient une bonne alternative (Lindsay & Norvell, 1978 ; Echevarria *et al.*, 1998 ; Bakircioglu *et al.*, 2011). Récemment, plusieurs études ont montré que l'extraction au CaCl_2 (Chlorure de Calcium) était plus représentative de la fraction biodisponible pour la plante (Meers *et al.*, 2007a ; Lopareva-Pohu *et al.*, 2011 ; Anjos *et al.*, 2012). Un des objectifs du projet GREENLAND⁶, qui a débuté en 2011 et qui porte sur l'efficacité de la phytoremédiation appliquée aux sols pollués par les ETM, vise à harmoniser les méthodes employées pour déterminer les fractions biodisponibles des ETM à l'échelle européenne.

L'identification de la cible de la pollution est également un point clé dans la gestion d'un site pollué. L'évaluation des risques est particulièrement poussée lorsque la cible est l'Homme. Dans ce cas, le risque de contamination peut être soit direct par ingestion d'eau contaminée, de poussières, de terre (Guney *et al.*, 2010), ou de légumes ou céréales contaminés (Pruvot *et al.*, 2006) ; soit indirect dans le cas d'une consommation de produits d'origine animale contaminés (Kaplan *et al.*, 2011). L'évaluation des risques pour la population implique également de s'intéresser à la bioaccessibilité des ETM pour l'Homme. La bioaccessibilité correspond à la fraction accessible d'ETM d'un sol qui pourra être absorbée par le corps humain au niveau de l'appareil digestif (Pelfrene *et al.*, 2011) ou de l'appareil respiratoire (Caboche *et al.*, 2011).

L'identification de ces différents risques permettra ainsi de décider de la nécessité de surveillance et/ou d'intervention pour un site pollué. Une modification de la source, du vecteur, de la cible ou de l'usage peut permettre de gérer la pollution d'un site. Plusieurs outils de diagnostic et de gestion des sites et sols

⁶ <http://www.greenland-project.eu/>

pollués sont disponibles sur les sites internet de l'ADEME⁷, de l'INERIS⁸ et du ministère en charge de l'écologie et du développement durable⁹.

1.5. Impacts de la pollution aux ETM sur les organismes terrestres

1.5.1. Effets cellulaires des ETM

L'effet toxique des ETM est dû à de nombreuses causes mais provient principalement de leur forte capacité de coordination. Leurs différents modes d'action impliquent par exemple le blocage de groupes fonctionnels de biomolécules importantes ; le déplacement et/ou la substitution d'ions essentiels dans des biomolécules, la modification de la conformation de ces biomolécules ; la dénaturation ou l'inactivation d'enzymes ou l'altération de membranes cellulaires ou organellaires (Gadd, 1993). La plupart des effets néfastes des ETM pour la cellule sont indirects et liés à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), à l'origine d'un stress oxydatif pour la cellule.

En effet, certains ETM peuvent induire la formation de ROS dans les cellules. Les métaux de transition (Fe, Cu, Mn...) sont capables de transférer un de leurs deux électrons sur une molécule d'oxygène et de générer ainsi des ions superoxydes (Bhaduri & Fulekar, 2012). Certains ETM comme le cadmium, le fer, le cuivre, le zinc, le chrome, le cobalt ou le vanadium vont pouvoir générer, via des réactions de types Fenton ou Haber-Weiss, la formation de ROS tels que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), les ions superoxydes (O₂^{•-}) et les radicaux hydroxyles (•OH) (Gadd, 1993 ; Leonard *et al.*, 2004 ; Galanis *et al.*, 2009). La formation de ROS par les ETM peut également être liée à l'inactivation de certaines enzymes impliquées dans la résistance au stress oxydatif (peroxydases, catalases, superoxyde dismutases) ou par la baisse du *pool* intracellulaire de molécules antioxydantes à faible poids moléculaire comme le glutathion (Bhaduri & Fulekar, 2012).

1.5.1.1. Altération des membranes cellulaires

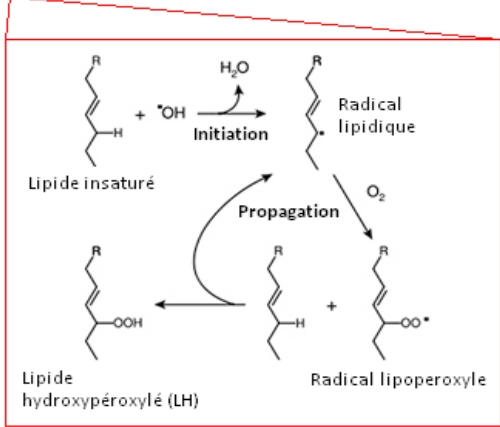
Les ETM peuvent avoir un effet direct sur les membranes cellulaires en modifiant leur perméabilité (Valko *et al.*, 2005) et en entraînant souvent ainsi un efflux d'ions et une dépolarisation de la membrane plasmique (Rodriguez-Serrano *et al.*, 2009 ; Sanz *et al.*, 2009).

Un deuxième effet des ETM sur les membranes cellulaires est un phénomène indirect lié à la production de radicaux libres qui entraînent une peroxydation des lipides constituant la membrane (Choudhury & Panda, 2005 ; Valko *et al.*, 2005 ; Chaffai *et al.*, 2007). Le radical hydroxyle initie le processus

⁷ <http://www2.ademe.fr/>

⁸ <http://www.ineris.com/>

⁹ <http://www.developpement-durable.gouv.fr/>



18

de peroxydation des acides gras membranaires. Lors de la phase d'initiation, un acide gras insaturé est attaqué par un radical libre. Il en résulte un radical lipidique qui réagit avec l'oxygène moléculaire pour former un radical peroxyde. Ce dernier réagit avec un acide gras adjacent, lors de la phase de propagation, pour former un hydroperoxyde et un nouveau radical peroxyde (Jomova *et al.*, 2012) (Figure 8). La peroxydation des lipides membranaires est une réaction très destructrice car elle provoque des brèches dans la phase lipidique et augmente ainsi la perméabilité membranaire, ceci résultant en une désorganisation cellulaire.

1.5.1.2. Interactions avec les acides nucléiques

En général, les ETM agissent sur les acides nucléiques par voie indirecte, notamment via la production de ROS. Ces espèces réactives de l'oxygène peuvent induire des cassures des brins d'ADN, une modification des bases et la formation de complexes protéines/ADN (Jomova *et al.*, 2012) (Figure 8). Les ETM peuvent également agir en perturbant le fonctionnement de protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADN. Par exemple, les ions Co^{2+} ou Cd^{2+} peuvent se substituer aux ions Zn^{2+} dans les structures en doigts de zinc, notamment présentes dans certaines enzymes de réparation de l'ADN ou certains facteurs de transcription (Bertin & Averbeck, 2006 ; Ortega *et al.*, 2009 ; Koedrich & Seo, 2011).

Leur action sur l'ADN peut également être directe. Le cobalt serait par exemple capable de pénétrer dans le noyau et d'interagir directement avec l'ADN (Ortega *et al.*, 2009). Le nickel serait impliqué dans l'hyperméthylation de l'ADN et pourrait être responsable de l'ubiquitination et la dégradation des histones alors que le vanadium modifierait la stabilité et l'intégrité de l'ADN (Galanis *et al.*, 2009). Le cadmium peut également induire une fragmentation de l'ADN (Bertin & Averbeck, 2006).

1.5.1.3. Inhibition d'enzymes

Deux mécanismes d'inhibition des enzymes par les ETM sont prédominants :

- la fixation de l'élément sur les groupements thiols responsables de l'activité catalytique ou de l'intégrité des enzymes ;
- l'induction d'une carence en métaux nécessaires aux métallo-enzymes et/ou la substitution d'un élément essentiel nécessaire par l'élément toxique au niveau du complexe enzymatique (Bhaduri & Fulekar, 2012).

Par exemple, le cobalt diminue le *pool* intracellulaire de zinc et de magnésium et est capable d'entrer en compétition avec ces ions ce qui induit une baisse de l'activité des enzymes utilisant le zinc ou le magnésium comme cofacteurs (Ortega *et al.*, 2009). La plupart des ETM ont une affinité très forte pour les

groupements thiols des protéines et peuvent ainsi modifier l'activité de nombre d'entre elles (Bhaduri & Fulekar, 2012).

1.5.2. Toxicité des ETM au niveau des organismes

1.5.2.1. Toxicité pour l'homme

Chez l'homme, trois voies d'entrée des ETM dans l'organisme sont possibles :

- le contact cutané : en fonction de l'élément et de sa spéciation, des irritations ou des réactions allergiques localisées sont possibles, ainsi qu'une pénétration dans les différentes couches de l'épiderme pouvant aller jusqu'à une diffusion systémique (Hostynek, 2003) ;
- l'inhalation : certaines activités industrielles génèrent des poussières contenant des ETM qui peuvent être inhalées par la population proche. Les conséquences possibles sont des maladies respiratoires ou cardiaques, des cancers du poumon ou l'atteinte d'autres organes (Caboche *et al.*, 2011) ;
- l'ingestion : l'exposition aux ETM par cette voie peut être soit directe par ingestion de terre (particulièrement pour les enfants (Guney *et al.*, 2010)) ou d'eau contaminée ; soit indirecte par consommation de végétaux ou produits animaux contaminés (Silvera & Rohan, 2007). Les effets de l'ingestion d'ETM sont très variables et dépendent de l'élément étudié, de sa spéciation, de la dose et de sa bioaccessibilité (Pelfrene *et al.*, 2012). Dans la plupart des cas, un effet cancérigène des ETM est relevé (Silvera & Rohan, 2007).

D'une manière générale, l'effet toxique le plus répandu lié à l'exposition aux ETM est la formation de cancers. L'IARC¹⁰ (*International Agency for Research on Cancer*) classe les différents agents étudiés pour leur potentiel effet cancérigène en cinq groupes. Les agents appartenant au groupe 1 sont « cancérigènes », au groupe 2A « probablement cancérigènes », au groupe 2B « peut-être cancérigènes », au groupe 3 « inclassable quant à leur cancérigénicité » et au groupe 4 « probablement pas cancérigènes » pour l'Homme. Ainsi, l'aluminium, l'arsenic, le béryllium, le cadmium, le chrome (VI), le fer et le nickel appartiennent au groupe 1 ; l'indium appartient au groupe 2A ; le cobalt, le plomb et le vanadium appartiennent au groupe 2B ; le sélénium et le mercure appartiennent au groupe 3, le cuivre et le zinc ne sont pas classés¹⁰.

Cet effet cancérigène est principalement dû à la génération de ROS par les ETM qui vont provoquer des dommages à l'ADN et aux biomolécules permettant la réparation de l'ADN (Galanis *et al.*, 2009). De plus, certains ETM peuvent prendre la place d'éléments indispensables au bon fonctionnement des enzymes de

¹⁰ <http://monographs.iarc.fr/FR/Classification/index.php>

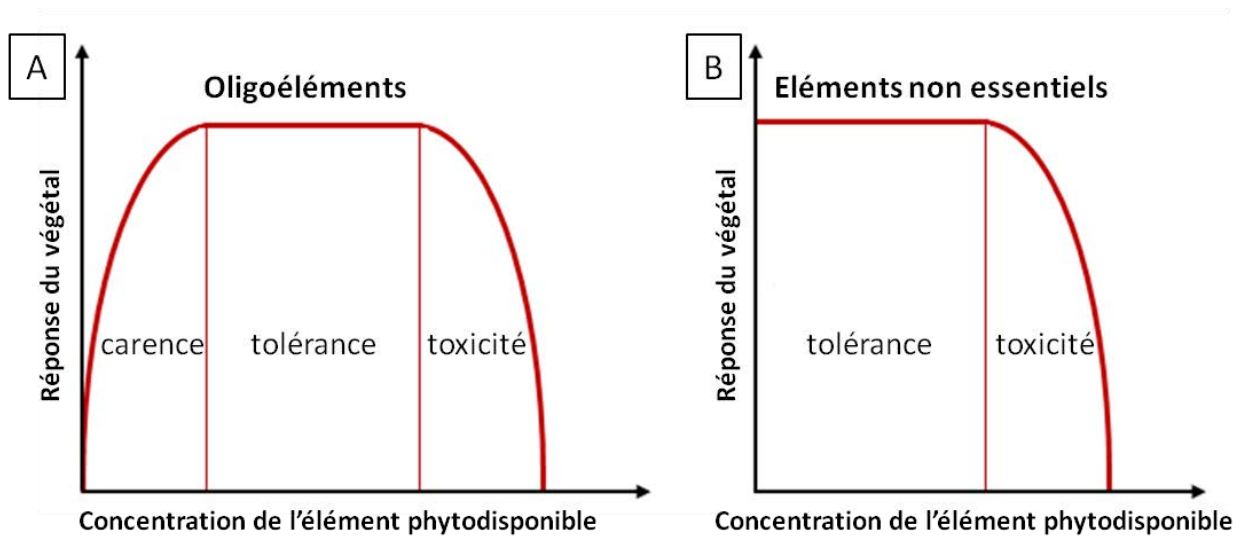


Figure 9 : Courbes de réponses « dose-effet biologique » illustrant les effets des changements de concentrations phytodisponibles en oligoéléments (A) ou en éléments non essentiels (B) sur la vitalité de la plante (d'après Deneux-Mustin *et al.*, 2003)

réparation de l'ADN, comme par exemple, une substitution du zinc au niveau des doigts de zinc des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN ou la transcription de facteurs suppresseurs de tumeur (Koedrith & Seo, 2011).

1.5.2.2. Phytotoxicité

La réponse des plantes à la toxicité des ETM peut être représentée par des courbes de réponse « dose/effet biologique » de deux types (Deneux-Mustin *et al.*, 2003) (Figure 9). Si l'élément est essentiel, la réponse de la plante suivra une courbe « en cloche » dont les trois phases observées seront la carence, la tolérance puis la toxicité (Figure 9 (A)). Et si l'élément n'a pas de fonction physiologique établie, seules les deux dernières phases de la courbe (tolérance et toxicité) sont observées (Figure 9 (B)).

Lorsque la concentration phytodisponible d'un élément atteint le seuil de toxicité de la plante, les symptômes les plus souvent observés sont un ralentissement de la croissance racinaire et/ou aérienne, une perturbation des fonctions physiologiques, une nécrose ou une chlorose des feuilles. Les symptômes sont liés à la nature de l'élément en cause et à sa spéciation (Babula *et al.*, 2008 ; Nagajyoti *et al.*, 2010). En général, la phytotoxicité des ETM est soit liée à une carence en fer causée par l'excès d'un autre élément, soit liée à la génération de ROS dans la cellule végétale (Nagajyoti *et al.*, 2010).

1.5.2.3. Toxicité pour les micro-organismes du sol

1.5.2.3.1. Toxicité pour les champignons

Dans le sol, les champignons peuvent avoir un mode de vie saprophyte (se nourrissent de matière organique morte), parasitique ou pathogène (seul un des partenaires en tire bénéfice au détriment de l'autre), symbiotique (les deux partenaires en tire avantage) ou commensal (seul un des partenaires en tire bénéfice). La toxicité des ETM pour les champignons est étudiée dans la plupart des cas dans le cadre des interactions symbiotiques entre les plantes et les champignons, la symbiose mycorhizienne. Il existe cinq grands types de symbioses mycorhiziennes dont les plus répandues sont les symbioses endo- et ectomycorhiziennes (Selosse & Le Tacon, 1998 ; Smith & Read, 2008). La symbiose mycorhizienne sera décrite plus précisément dans le paragraphe 3.2.

En règle générale, dans des sols pollués par des ETM, le nombre de carpophores présents a tendance à diminuer quand la contamination augmente. Des exceptions à cette règle ont tout de même été observées et sont dépendantes de l'espèce fongique et de la nature des contaminants présents (Gadd, 1993). Il est notamment souvent observé une baisse de la sporulation et de la capacité de mycorhization de souches fongiques symbiotiques (Gadd *et al.*, 2012). En effet, les ETM pourraient inhiber la croissance fongique en

général en modifiant la chimie du sol et ainsi provoquer une diminution des nutriments disponibles (Karlinski *et al.*, 2010). De plus, certains ETM comme le cuivre et le cadmium seraient capables d'inhiber la mycorhization (Christie *et al.*, 2004). Dans d'autres cas, une diminution du nombre de spores et de la colonisation par des champignons endomycorhiziens a été observée lorsque la teneur en ETM augmente (Del Val *et al.*, 1999 ; Zarei *et al.*, 2008b).

En revanche, la pollution par des ETM exerçant une pression de sélection sur les communautés fongiques, des variations génétiques inter- et intra-spécifiques ont été montrées pour la tolérance des champignons aux ETM. Ainsi, une meilleure tolérance aux ETM de champignons ectomycorhiziens a été observée pour des souches provenant de sites pollués notamment par du cadmium (Colpaert *et al.*, 2000 ; Colpaert *et al.*, 2011) ou du nickel (Goncalves *et al.*, 2009 ; Jourand *et al.*, 2010a). Néanmoins, chez *Paxillus involutus*, des isolats tolérants ont pu être isolés à partir de sols non contaminés et aucune corrélation entre le niveau de tolérance et le degré de contamination du sol d'origine n'a pu être observée (Blaudez *et al.*, 2000b).

1.5.2.3.2. Toxicité pour les bactéries

En général, les facteurs étudiés pour mesurer l'effet d'une pollution aux ETM sur les communautés bactériennes sont la mesure de la biomasse *i.e.* la taille de la communauté bactérienne, de la respiration (dégagement de CO₂) et des activités enzymatiques intervenant dans les cycles du carbone, du phosphore, du soufre ou de l'azote (Deneux-Mustin *et al.*, 2003). Une baisse de la biomasse et de l'activité enzymatique microbiennes est souvent observée lors d'une contamination du sol par des ETM (Kandeler *et al.*, 1996 ; Kuperman & Carreiro, 1997 ; Qu *et al.*, 2011). En revanche, dans certains cas, l'effet inverse est observé. Ainsi, une étude portant sur l'impact d'une pollution aux ETM issus de l'épandage d'eaux usées industrielles a mis en évidence une augmentation de la biomasse, de l'activité et de la diversité fonctionnelle enzymatiques (Chaerun *et al.*, 2011). Une augmentation de la respiration peut également être observée en cas de stress métallique (Renella *et al.*, 2004). Ces différences de comportement des communautés bactériennes ne sont pas nécessairement liées directement à la contamination par les ETM mais plutôt à l'influence de ces éléments sur la disponibilité des éléments minéraux essentiels ou de la matière organique (Giller *et al.*, 1998).

De même que chez les champignons, des communautés bactériennes tolérantes aux ETM ont été identifiées provenant de sols pollués. Notamment, une étude a montré que plus un sol était pollué par du cuivre, plus les communautés bactériennes associées étaient tolérantes au cuivre (Fernandez-Calvino *et al.*, 2011).

2. Réhabilitation et remédiation des sites pollués

Selon le site de l'ADEME, les techniques de réhabilitation des sites pollués sont généralement classées en quatre grandes catégories : les procédés physicochimiques (lavages chimiques ou par agents tensio-actifs, stabilisation physico-chimique...), thermiques (désorption thermique, incinération) et biologiques (bio lixiviation, bio-immobilisation, bioremédiation...) ainsi que le confinement. Elles se distinguent par leur mode de mise en œuvre : techniques *ex situ* pour lesquelles le sol pollué est excavé puis traité en dehors (hors site) ou sur le site (sur site) ; ou techniques *in situ* où la pollution est traitée directement dans le milieu naturel. Seules les techniques permettant de traiter des sols pollués par des ETM seront traitées dans cette partie.

2.1. Techniques thermiques et physico-chimiques

2.1.1. Désorption thermique

La désorption thermique est un processus qui s'effectue en deux étapes : le sol est confiné dans une enceinte chauffée à haute température qui permet de volatiliser les polluants puis les gaz extraits sont traités. La température utilisée est de l'ordre de 250 à 500 °C et le temps de résidence à l'intérieur de l'unité d'incinération est déterminé en fonction de la quantité et de la qualité des polluants à extraire (Lecomte, 1998). Cette méthode est généralement utilisée pour le traitement de sols contaminés par des polluants organiques. Dans le cas des ETM, cette méthode permet de traiter uniquement la pollution au mercure. Plusieurs études ont montré que l'efficacité de la désorption thermique du mercure augmente lorsque la température est élevée (> 350 °C) (Lesa *et al.*, 2009 ; Huang *et al.*, 2011). Dans le cas d'une multi-pollution par des ETM, il est nécessaire de s'assurer que le traitement thermique ne modifie pas la biodisponibilité des éléments autres que le mercure (Bonnard *et al.*, 2010).

2.1.2. Tris physiques ou physico-chimiques

Une première technique de remédiation des sols pollués par des ETM est la séparation par tris physiques ou physico-chimiques. La mise en place de cette méthode nécessite l'excavation du sol à traiter. Les procédés de traitement par tris physiques ou physico-chimiques se distinguent par la principale propriété des contaminants du sol à traiter (ADEME, 2007 ; Dermont *et al.*, 2008) :

- les séparations granulométriques permettent de séparer la fraction contaminée du reste du sol par leurs tailles. La séparation peut se faire par centrifugation, élutriation (séparation de particules à l'aide d'un fluide suivant la loi de Stokes) ou à l'aide de classificateurs mécaniques ;

- les séparations gravimétriques utilisent la gravité pour séparer la fraction contaminée du reste du sol ; dans ce cas la séparation se fait en fonction de la densité des particules ;
- la flottation est une technique de séparation fondée sur des différences d'hydrophobicité des surfaces des particules à séparer. En général, des bulles d'air sont injectées dans la zone à traiter et les particules hydrophobes sont entraînées par les bulles. Un agent surfactant peut être employé pour augmenter l'hydrophobicité des particules à retirer ;
- les séparations magnétiques ou électrostatiques sont rarement utilisées.

Cette méthode n'est pas utilisable si i) les ETM sont fortement liés aux particules du sol ; ii) les différences de densité ou des propriétés de surface des particules contenant les ETM et la matrice du sol ne sont pas significatives ; iii) les formes chimiques des ETM sont très variables ; iv) les ETM sont présents dans toutes les fractions du sol ; v) le sol contient plus de 40 % d'argiles ; vi) le sol contient beaucoup d'humus ou de composés organiques ayant une forte viscosité (Dermont *et al.*, 2008).

2.1.3. Lavages par agents chimiques ou tensio-actifs

Le lavage par agents chimiques et tensio-actifs est une méthode qui consiste à extraire les contaminants d'un sol par leur dissolution dans un réactif approprié. L'objectif est de laver le sol en mobilisant le contaminant sans le détruire. Les réactifs utilisés sont très variés et choisis en fonction du type de polluants ainsi que de sa spéciation (ADEME, 2007).

Dans le cas d'une contamination du sol par les ETM, plusieurs réactifs peuvent être employés (Dermont *et al.*, 2008) :

- des acides forts (acides chlorhydrique, sulfurique ou nitrique) qui permettent une désorption des ETM par échange d'ions et dissolution des composés métalliques et composants minéraux du sol (oxydes de fer et de manganèse) ; l'inconvénient de cette méthode est la baisse du pH et la destruction de la structure du sol ;
- des solutions salines, notamment le CaCl_2 qui permet d'échanger des ions Ca^{2+} contre des ions Pb^{2+} ou Cd^{2+} par exemple et de créer des complexes solubles stables avec les ions chlorures ; la gamme d'ETM traitable par cette méthode est moindre mais l'impact sur le sol est réduit également ;
- des molécules chélatantes, notamment l'EDTA qui est utilisé pour le traitement de sol pollué principalement avec du plomb, cuivre, cadmium et/ou zinc et qui permet de remobiliser les éléments liés à la fraction échangeable liée à la matière organique ou aux carbonates ; cette méthode n'est pas applicable si les ETM sont liés aux oxydes de fer ou de manganèse ;
- des surfactants, peu utilisés mais qui sont efficaces pour remobiliser des ETM fortement associés à des contaminants organiques ;

- des agents oxydants ou réducteurs qui sont souvent associés à l'EDTA afin d'améliorer la remobilisation des ETM liés aux oxydes de fer ou de manganèse.

Le lavage par agents chimiques et tensio-actifs est réalisable *in situ* par lavage chimique (« *soil flushing* ») et pompage des agents chimiques liés aux polluants mais nécessite de connaître parfaitement les caractéristiques de la zone à traiter pour éviter la contamination de la nappe souterraine par exemple. Cette méthode est également applicable *ex situ* par agitation (agitation du sol à traiter en présence des réactifs chimiques et séparation par centrifugation ou décantation), lixiviation (circulation des réactifs dans la fraction de sol à traiter et récupération du produit, le lixiviat) et électrochimie (application d'un courant continu permettant la migration des ions positifs vers la cathode) (Lestan *et al.*, 2008). Plusieurs méthodes peuvent également être combinées afin d'augmenter le potentiel d'extraction, par exemple, l'extraction par électrochimie est souvent couplée à l'utilisation d'agents chélatants comme l'EDTA (Reddy *et al.*, 2010).

2.1.4. Stabilisation physico-chimique

La stabilisation physico-chimique désigne l'ensemble des techniques qui consistent à réduire le risque de dissémination d'éléments polluants, principalement en les immobilisant sous une forme moins soluble et/ou moins toxique par la mise en œuvre de mécanismes physicochimiques (ADEME, 2007). Deux méthodes sont employées : soit le sol à traiter est immobilisé par solidification en le mélangeant par exemple avec du ciment et de l'eau ; soit par ajout d'amendements en surface ou mélangés au sol (Lecomte, 1998). Les amendements utilisés sont de natures et compositions très diverses : certains sont organiques (fumiers, composts, boues d'épuration, déchets de pâte à papier, cendres), d'autres inorganiques (phosphates, chaux, zéolithes, cendres volantes ou « *fly ash* ») (Adriano *et al.*, 2004 ; Guo *et al.*, 2006). Les mécanismes impliqués dans l'immobilisation des ETM dépendent des propriétés physico-chimiques des différents amendements.

2.2. Techniques biologiques

2.2.1. Bio-immobilisation

La technique de bio-immobilisation n'est pas encore appliquée sur le terrain et reste à l'échelle de l'étude, elle consiste à utiliser des micro-organismes pour immobiliser les ETM dans le sol. Elle est principalement étudiée pour la remédiation de sols contaminés avec du chrome. En effet, certaines bactéries sont capables de réduire le chrome (VI), très soluble dans l'eau, en chrome (III), insoluble si le pH est supérieur à 5 (Cheng *et al.*, 2012). De même, l'uranium (VI), très soluble dans l'eau, peut être réduit par certaines espèces bactériennes en uranium (IV), insoluble (Cheng *et al.*, 2012). Le traitement des sols

Tableau III : Estimation des coûts unitaires de traitement de sols pollués par des ETM (d'après BRGM, 2010)

Techniques*	Coûts			
	fourchette inférieure [†]	moyenne basse [§]	moyenne haute [§]	fourchette supérieure [‡]
Désorption thermique <i>ex situ</i>	60	70	80	110
Désorption thermique <i>in situ</i>	70	105	140	155
Tri granulométrique <i>ex situ</i>	8	16	25	80
Lavage <i>ex situ</i>	75	145	180	220
Lavage <i>in situ</i>	20	45	65	120
Stabilisation physico-chimique <i>ex situ</i>	25	45	75	120
Stabilisation physico-chimique <i>in situ</i>	50	70	105	160
Phytoremédiation - phytoextraction	18	25	34	40
Phytoremédiation - phytostabilisation	2	4	7	12

* Pour les techniques *ex situ*, les coûts sont évalués en €/t de sols traités après excavation ; pour les techniques *in situ*, les coûts sont évalués en €/t de sols traités en place ; et pour les techniques de phytoremédiation, les coûts sont évalués en €/m² de surface de sols traités.

[†] Les fourchettes inférieures prennent comme hypothèses des sites à accessibilité aisée, de tailles importantes, avec des caractéristiques géologiques et hydrogéologiques très favorables à la technique (en termes de perméabilité, de teneurs en matière organique, de porosité.....) et avec des caractéristiques intrinsèques à la pollution très favorables à la technique (caractéristiques physico-chimiques, concentrations initiales, concentrations finales, volumes...).

[‡] Les fourchettes supérieures prennent comme hypothèses des sites à accessibilité faibles, de faibles tailles, avec des caractéristiques géologiques et hydrogéologiques peu favorables à la technique (en termes de perméabilité, de teneurs en matière organique, de porosité.....) et avec des caractéristiques intrinsèques à la pollution peu favorables à la technique (caractéristiques physico-chimiques, concentrations initiales, concentrations finales, volumes...).

[§] Les moyennes prennent en compte des hypothèses intermédiaires entre les fourchettes supérieures et inférieures. Les trois coûts de traitements les moins importants sont en gras.

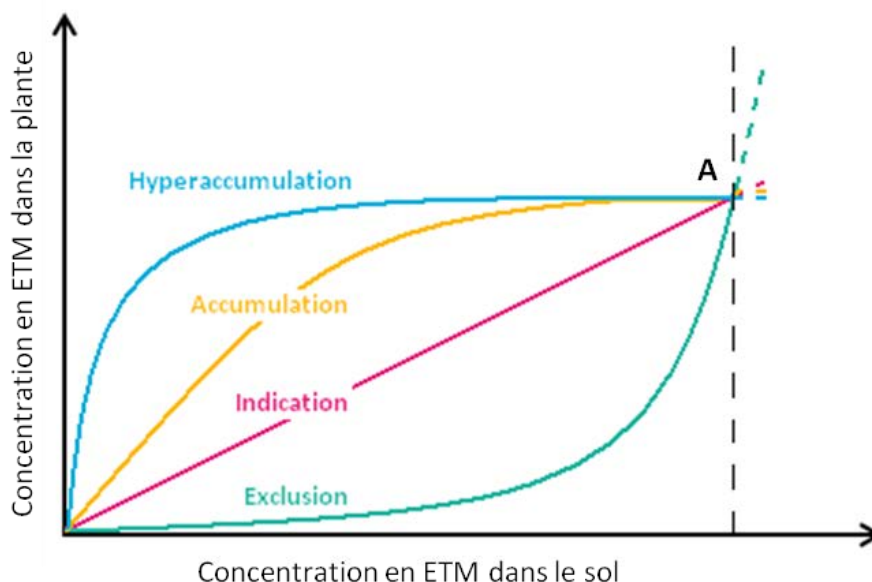


Figure 10 : Différentes réponses des plantes à l'accroissement de la quantité des ETM dans le sol (d'après Robinson *et al.*, 2009). Les concentrations en ETM supérieures au point A correspondent aux concentrations phytotoxiques.

nécessite une excavation afin de pouvoir faire circuler une solution nutritive pour les bactéries. Les réactions de réduction du chrome (VI) ou de l'uranium (VI) peuvent avoir lieu en conditions aérobies ou anaérobies (ADEME, 2007).

2.2.2. Biolixiviation

A l'inverse de la bio-immobilisation, certains micro-organismes du sol sont capables d'augmenter la disponibilité des ETM en les modifiant sous une forme plus soluble. Par exemple, des bactéries des genres *Clostridium* ou *Bacillus* sont capables de réduire le fer (III), insoluble, en fer (II), soluble en conditions anaérobies par des réactions d'échange d'électrons (Lovley, 1993). De plus, la génération de fer ferreux (Fe (II)) peut entraîner indirectement la libération d'ETM liés aux oxydes de fer. En conditions aérobies, certains micro-organismes sont capables d'oxyder directement ou indirectement des composés minéraux conduisant à la production de sels métalliques solubles (oxydation des sulfures en sulfates) ou d'acides (oxydation de composés soufrés par exemple) qui peuvent entraîner le lessivage des métaux (Tiwari *et al.*, 2008). Ces méthodes de biolixiviation sont encore à l'étude pour l'application au traitement des sites pollués par les ETM. En revanche, cette méthode est appliquée en industries minières afin de récupérer les métaux de minerais appauvris et est appelée « *biomining* » (Rawlings, 2002). Le métal actuellement le plus exploité par *biomining* est le cuivre avec une production annuelle qui s'élèverait à 30 millions de tonnes par an (Rawlings, 2002).

2.2.3. Phytoremédiation

Parmi les techniques de remédiation des sols pollués développées au cours des trois dernières décennies, la phytoremédiation (du grec « *phyton* » = plante, et du latin « *remedium* » = rétablissement de l'équilibre, remédiation) est une technologie « verte » prometteuse qui utilise les capacités naturelles des plantes à modifier la spéciation des ETM dans les sols et/ou à les accumuler au niveau de leurs racines ou parties aériennes. La phytoremédiation est applicable *in situ* et semble être moins coûteuse que les traitements traditionnels (Tableau III) (BRGM., 2010). La phytoremédiation a un moindre impact sur l'environnement naturel du site contaminé par rapport aux autres techniques de réhabilitation ce qui la rend plus acceptable au niveau de la population. Cependant, des études de risques à moyen et long termes, de coûts/bénéfices et d'optimisation sont encore nécessaires pour valider cette méthode *in situ* (Bert *et al.*, 2009). Dans le cas de sols pollués par les ETM, plusieurs techniques de phytoremédiation sont envisageables et étudiées : la phytovolatilisation, la phytoextraction et la phytostabilisation.

Tableau IV : Concentrations habituelles en ETM chez les plantes, limites basses de concentrations chez les hyperaccumulatrices et principales familles de plantes hyperaccumulatrices (d'après Sheoran *et al.*, 2011 ; Sheoran *et al.*, 2009)

Élément	Gamme de concentrations habituelles (µg/g MS)	Limite basse de concentrations chez les plantes hyperaccumulatrices (µg/g MS [%])	Nombre de taxa connus	Familles impliquées
Arsenic	0,02-1,5	1000 [0,1]	5	<i>Pteridaceae</i>
Cadmium	0,03-20	100 [0,01]	1	<i>Brassicaceae</i>
Cobalt	0,05-50	1000 [0,1]	26	<i>Lamiaceae, Scrophulariaceae</i>
Cuivre	1-100	1000 [0,1]	24	<i>Cyperaceae, Lamiaceae, Poaceae, Scrophulariaceae</i>
Manganèse	5-2000	10000 [1]	11	<i>Apocynaceae, Cunoniaceae, Proteaceae</i>
Nickel	0,2-100	1000 [0,1]	290	<i>Brassicaceae, Cunoniaceae, Flacortiaceae, Violaceae</i>
Plomb	nd	1000 [0,1]	14	<i>Compositae, Brassicaceae</i>
Sélénium	0,01-10	100 [0,01]	19	<i>Fabaceae</i>
Thallium	0-0,1	1000 [0,1]	1	<i>Brassicaceae</i>
Zinc	5-2000	10000 [1]	16	<i>Brassicaceae</i>

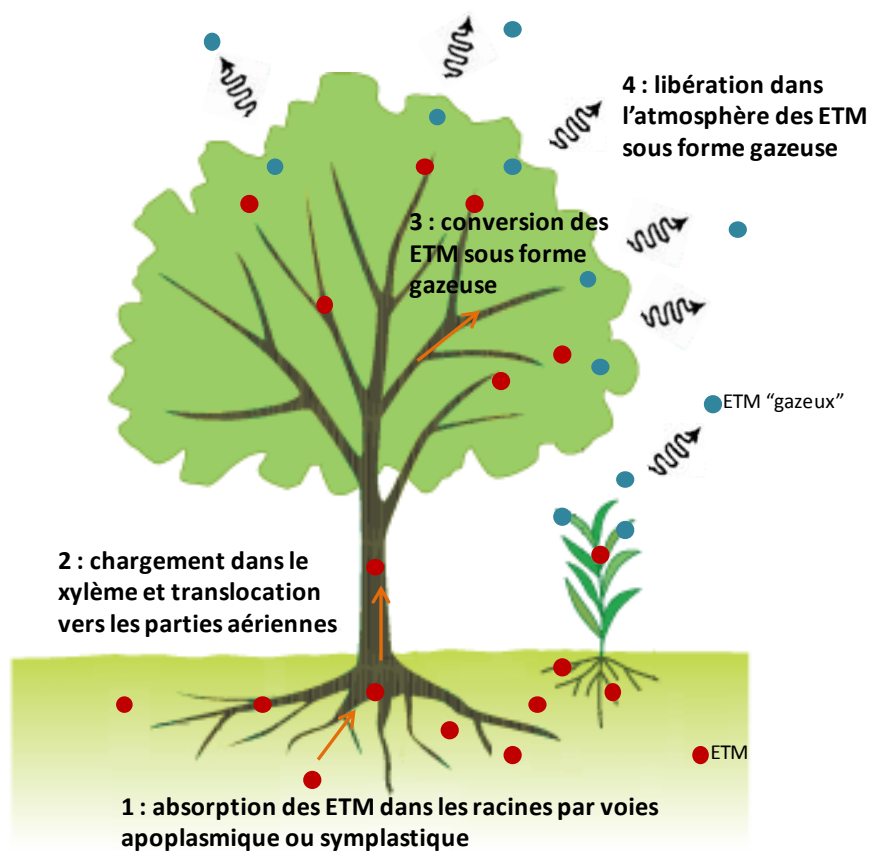


Figure 11 : Principaux mécanismes impliqués dans la phytovolatilisation permettant l'absorption, la conversion et la volatilisation des ETM sous forme gazeuse (d'après Padmavathiamma & Li, 2007)

Les plantes utilisées en phytoremédiation sont souvent endémiques de sites pollués et ont développé des stratégies d'adaptation à la contamination du sol par les ETM. Elles sont appelées métalphytes et ont développé quatre stratégies principales (Figure 10) (Robinson *et al.*, 2009 ; Sheoran *et al.*, 2011) :

- l'exclusion : la majorité des métalphytes adoptent cette stratégie d'exclusion par restriction de la translocation des ETM dans leurs parties aériennes, la concentration en ETM dans les racines étant importante, c'est le cas par exemple chez *Festuca rubra* ;
- l'indication : ces plantes accumulent les ETM dans leurs parties aériennes à des concentrations reflétant le niveau de contamination du sol comme par exemple *Rumex acetosa* ;
- l'accumulation : certaines plantes ont la capacité d'accumuler les ETM même non essentiels dans leurs parties aériennes, les plantes de la famille des Salicacées (peupliers, saules...) ont notamment cette particularité ;
- l'hyperaccumulation : dans certains cas, les plantes sont capables d'accumuler les ETM dans leurs parties aériennes dans des quantités jusqu'à cent fois supérieures par rapport à des plantes non accumulatrices poussant dans les mêmes conditions. En général, une plante est considérée comme hyperaccumulatrice lorsque la concentration en un élément donné dans les parties aériennes dépasse 0,1 % de la masse sèche. Le tableau IV résume les différents seuils de concentration en un élément donné caractérisant une plante hyperaccumulatrice ainsi que le nombre de taxa et les familles impliquées. Les genres de plantes hyperaccumulatrices les plus connus sont *Alyssum* et *Thlaspi* respectivement pour le nickel et le zinc.

2.2.3.1. Phytovolatilisation

Certains polluants comme l'arsenic, le sélénium et le mercure peuvent être présents sous forme gazeuse. Certaines plantes sont capables de les absorber au niveau du sol, et ensuite de les convertir en forme gazeuse au niveau des parties aériennes et de les volatiliser dans l'atmosphère, ce procédé est appelé phytovolatilisation (Padmavathiamma & Li, 2007) (Figure 11). En général, les plantes sélectionnées pour la phytovolatilisation sont des hyperaccumulatrices car la transformation gazeuse des ETM a lieu dans les parties aériennes de la plante (Robinson *et al.*, 2009).

Dans le cas du mercure, l'élément est absorbé au niveau des racines soit sous forme d'ions divalents réactifs et solubles (Hg^{2+}), soit sous forme de mercure organique très toxique (méthylmercure, phényl-acétate de mercure...), puis transporté dans les parties aériennes et volatilisé sous forme de vapeur monoatomique Hg^0 peu réactive. Cette capacité a notamment été mise en évidence chez *Arabidopsis thaliana*, l'épicéa, le hêtre (Battke *et al.*, 2008) ou *Brassica juncea* (Moreno *et al.*, 2005) bien que dans

certains cas la volatilisation a lieu au niveau des racines grâce à l'activité d'algues ou de micro-organismes associés (Moreno *et al.*, 2008). L'ajout d'un amendement, comme le thiosulfate d'ammonium, permet de mobiliser le mercure lié aux sulfates dans le sol et augmente ainsi l'absorption et la volatilisation du mercure chez *B. juncea* (Moreno *et al.*, 2005).

Le rendement de la phytovolatilisation du mercure peut être augmenté par création de plantes transgéniques. Les gènes MerA et MerB bactériens sont surexprimés dans les plantes transformées. Le gène MerB code une lyase organobactérienne qui casse la liaison entre le mercure et le carbone du composé organique associé et libère ainsi des ions Hg^{2+} . Le gène MerA code une réductase mercurienne qui convertit les ions Hg^{2+} en mercure gazeux Hg^0 (Hussein *et al.*, 2007). Des plants de tabac transformés avec ces deux gènes présentaient des taux d'accumulation de mercure 100 fois supérieurs au sauvage (Hussein *et al.*, 2007). Des peupliers (*Populus deltoides* Bartr.) génétiquement modifiés volatilisait 2 à 3 fois plus vite le mercure que les plants contrôle (Lyyra *et al.*, 2007). La volatilisation du mercure atteint souvent les 90 % de libération dans l'atmosphère par rapport à la quantité initiale disponible.

Dans le cas du sélénium, les formes volatiles sont synthétisées dans les chloroplastes et sont libérées dans l'atmosphère sous forme de diméthyl séléniure (DMSe) ou de diméthyl diséléniure (DMDSe), dépendantes de l'espèce végétale impliquée et 500 à 1000 fois moins toxiques que le sélénium sous forme de sélénite (valence +4) ou de séléniat (valence +6) (Terry *et al.*, 2000). La forme chimique du sélénium est proche de celle du soufre et permet à cet élément d'en emprunter les voies d'absorption et d'assimilation. Par exemple, chez *A. thaliana*, une mutation du transporteur de sulfate SULTR1;2 permet de réduire l'absorption de séléniat par les racines, car ce transporteur prendrait également en charge cet élément (El Kassis *et al.*, 2007). De plus, la métabolisation du sélénium, notamment la production de DMSe ou DMDSe, utilise les enzymes liées à l'assimilation du soufre (Terry *et al.*, 2000). Une enzyme clé de la volatilisation du sélénium a été mise en évidence chez *A. thaliana* : une méthionine S-méthyl transférase (MMT) capable de transformer la sélénométhionine en sélénométhyl-L-sélénométhionine. Une étape de méthylation permet ensuite de générer du DMSe ou DMDSe (Tagmount *et al.*, 2002). Chez le saule, il a été montré qu'environ 10 % du sélénium disponible était volatilisé par la plante lorsqu'elle est cultivée en hydroponie (Yu & Gu, 2008).

La volatilisation de l'arsenic est peu étudiée car celui-ci semble s'accumuler au niveau du système racinaire et est peu transporté vers les parties aériennes. L'activité de volatilisation s'effectue plutôt au niveau de la rhizosphère et est liée à l'activité des micro-organismes du sol (Padmavathiamma & Li, 2007).

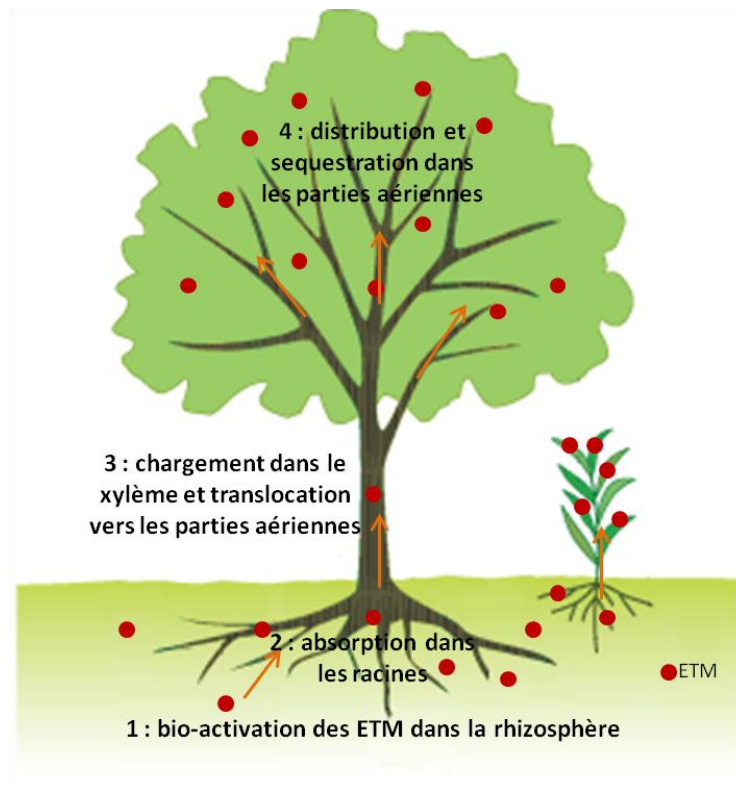


Figure 12 : Principaux mécanismes impliqués dans la phytoextraction permettant l'absorption, la translocation et la séquestration des ETM dans les parties aériennes (d'après Sheoran *et al.*, 2011)

Ces éléments étant rejetés dans l'atmosphère, l'utilisation de ce procédé doit être évitée dans des zones proches des habitations car les effets toxiques de ces gaz sont encore mal connus (Padmavathiamma & Li, 2007). Pour des zones peu étendues, une alternative est de réaliser la phytovolatilisation sous serre et de récupérer les gaz émis. Cependant, cette technique de remédiation est rarement utilisée.

2.2.3.2. Phytoextraction

La phytoextraction est une technique de remédiation à moyen et long terme qui vise à revégétaliser et progressivement dépolluer un sol contaminé à l'aide de plantes adaptées. Le principe de cette méthode consiste à récolter les parties aériennes de plantes ayant accumulé des ETM puis à les utiliser dans des procédés de combustion, pyrolyse ou gazéification et de valoriser les différentes fractions obtenues. Il est alors nécessaire que les plantes impliquées mobilisent puis extraient les ETM du sol pour les transporter au niveau de leurs parties aériennes. Les principaux mécanismes impliqués dans la phytoextraction sont résumés dans la figure 12. Pratiquement, les plantes sélectionnées doivent être tolérantes aux ETM visés, produire une grande quantité de biomasse, accumuler les ETM en quantités suffisantes et dans des organes faciles à récolter, avoir une croissance rapide et un système racinaire bien développé (Bert *et al.*, 2009).

Les plantes hyperaccumulatrices sont ainsi parfaitement indiquées pour la phytoextraction en raison de leur capacité à accumuler en grandes quantités les ETM dans leurs parties aériennes. Environ 400 espèces provenant de 45 familles de plantes ont été identifiées comme hyperaccumulatrices à ce jour. Plus de la moitié d'entre elles (215) sont des hyperaccumulatrices de nickel alors que très peu ont été identifiées pour le plomb ou le cadmium (Tableau IV) (Sheoran *et al.*, 2011). Parmi les espèces hyperaccumulatrices les plus étudiées, *Thlaspi caerulescens* est sans doute la plus connue. Cette plante est capable d'accumuler 25000 mg.kg⁻¹ de zinc (2,5 % de la biomasse) et 1000 mg.kg⁻¹ (0,1 % de la biomasse) de cadmium sans symptôme de toxicité (Brown *et al.*, 1995). Le genre *Alyssum* (famille des brassicacées) est également très connu pour ces capacités d'hyperaccumulation du nickel, *A. troodii* est capable notamment d'accumuler jusqu'à 1 % de sa biomasse (Homer *et al.*, 1991).

Dans le cas de métaux précieux, la phytoextraction peut permettre de récolter les ETM à des fins commerciales. L'élément recherché est extrait à partir des cendres et est ensuite revendu comme matière première, c'est le principe du *phytomining* (Sheoran *et al.*, 2009). L'intérêt s'est notamment porté sur les plantes hyperaccumulatrices de nickel, d'or, de cuivre ou de thallium (Anderson *et al.*, 1999 ; Harris *et al.*, 2009 ; Bali *et al.*, 2010 ; Wilson-Corral *et al.*, 2011). De même, les plantes hyperaccumulatrices peuvent être utilisées pour extraire des métaux comme le manganèse, le nickel, le zinc ou le cuivre à partir des cendres de la plante afin de les utiliser comme catalyseurs dans diverses réactions chimiques. En effet, plusieurs brevets ont été déposés concernant l'utilisation de catalyseurs métalliques (métaux sous forme M(II)) provenant de

plantes accumulatrices d'ETM évitant l'emploi de solvants organiques nocifs pour l'environnement et le rejet d'effluents pollués pour l'extraction des métaux à partir de minerais. L'utilisation de ces plantes permet également l'élimination des ETM des sites pollués par ceux-ci et la valorisation de la biomasse les contenant (Grisson & Escarré, 2012 ; Grison *et al.*, 2012). Cette technique d'extraction de métaux précieux est controversée car le coût d'extraction doit être inférieur à celui des méthodes classiques et la surface à exploiter est souvent bien plus importante qu'avec une méthode traditionnelle (Robinson *et al.*, 2009).

Le temps estimé pour la phytoextraction des ETM dans les sols varie de deux ans à plusieurs décennies en fonction de l'élément concerné, de sa spéciation dans le sol et de la plante choisie (Sheoran *et al.*, 2011). Ce temps est d'autant réduit que la biomasse produite est importante. Or la plupart des plantes hyperaccumulatrices ont une production de biomasse assez réduite comme c'est le cas pour *Thlaspi caerulescens* par exemple. Une solution alternative est alors d'utiliser des plantes dites « accumulatrices » qui accumulent les ETM dans leurs parties aériennes en quantité moindre par rapport aux plantes hyperaccumulatrices mais qui ont une production de biomasse plus importante. L'intérêt s'est porté notamment sur l'utilisation d'arbres de la famille des salicacées (peupliers ou saules) pour la phytoextraction (Bert *et al.*, 2009). En effet, plusieurs études montrent que les saules ou les peupliers sont capables d'extraire de grandes quantités d'ETM grâce à leur rapide et importante production de biomasse (Meers *et al.*, 2007b ; Migeon *et al.*, 2009 ; Migeon *et al.*, 2012). Par exemple, certains génotypes de saules peuvent extraire jusqu'à 216 g.ha⁻¹.an⁻¹ de cadmium contre 35 g.ha⁻¹.an⁻¹ pour *Thlaspi caerulescens* (Migeon *et al.*, 2009). De plus, l'utilisation de peupliers ou de saules présentent un intérêt économique car la biomasse produite peut être valorisée pour la production de bioénergie. Ainsi, même si la phytoextraction à l'aide de peupliers ou saules nécessite un traitement de plusieurs années, la valorisation énergétique de la biomasse offre une bonne alternative pour les exploitants des sites contaminés. Le transfert des polluants contenu dans les biomasses issues des phytotechnologies nécessite cependant d'être évalué, en raison de la dispersion potentielle, et notamment par voie atmosphérique, des ETM. Ce transfert a été évalué récemment (Chalot *et al.*, 2012 ; Delplanque *et al.*, 2013) et d'autres voie de valorisations (combustion, pyrolyse, gazéification, torréfaction, filière fibres...) sont testées au travers des programmes nationaux ou européens (Greenland, LORVER, BIOFILTREE).

Les capacités d'absorption et d'accumulation des ETM par les plantes peuvent être améliorées par manipulations génétiques ou ajout d'amendements, on parle alors de phytoextraction assistée. Des agents chimiques comme des agents acidifiants, des fertilisants et des agents chélatants (EDTA, EDDS (acide EthylèneDiamine-N-N'-DiSuccinique), NTA (acide NitriloTriAcétique), oxalate, malate...) permettent d'augmenter la fraction d'ETM biodisponible pour les plantes (Schmidt, 2003 ; Sheoran *et al.*, 2011). L'EDTA

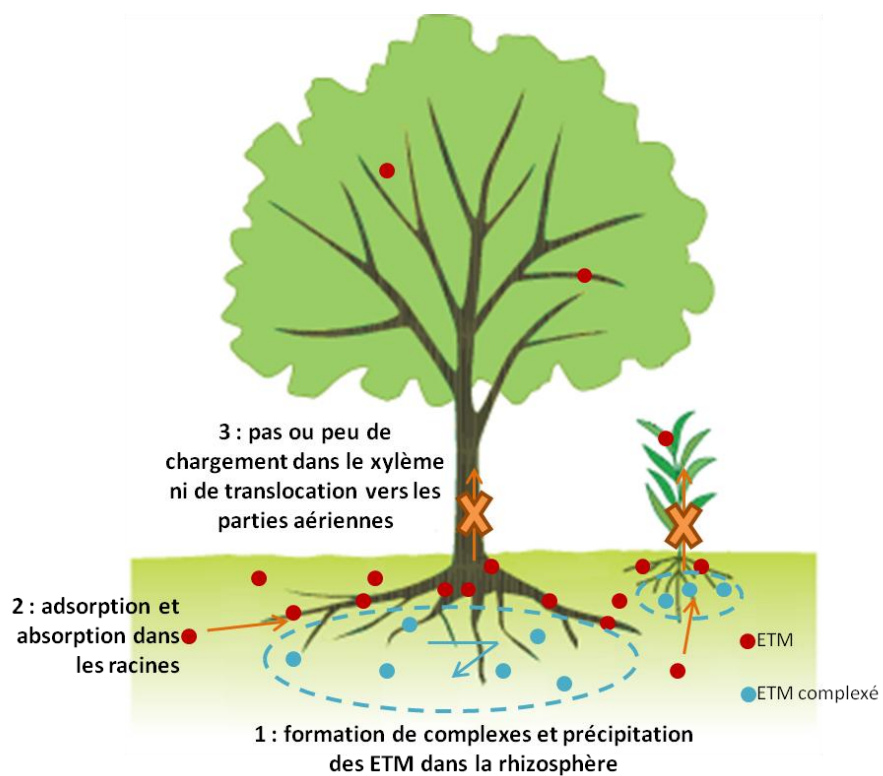


Figure 13 : Principaux mécanismes impliqués dans la phytostabilisation permettant la complexation et la précipitation des ETM dans la rhizosphère et l'adsorption et/ou l'absorption des ETM dans les racines (d'après Padmavathiamma & Li, 2007)

est un chélatant très efficace pour améliorer le potentiel d'extraction des plantes mais l'EDDS lui est souvent préféré car il est moins nocif pour l'environnement, rapidement dégradé (1/2 vie de 2,5 jours) et efficace pour la phytoextraction du cuivre, du cadmium et du plomb (Vamerali *et al.*, 2010). En revanche, les concentrations des amendements choisis doivent être soigneusement ajustées car à trop fortes concentrations leurs effets peuvent s'avérer toxiques pour les plantes (Gunawardana *et al.*, 2010) ou pour l'environnement (Vamerali *et al.*, 2010).

L'utilisation de plantes transgéniques pour améliorer leurs capacités de phytoextraction est actuellement à l'étude. Les gènes sélectionnés permettent soit d'améliorer la tolérance des plantes, soit d'augmenter l'accumulation des ETM dans les parties aériennes, soit de stimuler les processus cellulaires de détoxification. Les gènes sélectionnés peuvent provenir d'autres organismes (bactériens ou animaux), d'autres plantes ou être surexprimés chez la plante d'intérêt (Maestri & Marmioli, 2011). Par exemple, l'expression de gènes codant la synthèse d'une phytochélatine (AsPC1) et du glutathion (ScGSH1), des molécules complexant les ETM, chez *A. thaliana* permet d'augmenter la tolérance et l'accumulation de cadmium et d'arsenic chez cette plante (Guo *et al.*, 2008).

La dépollution d'un sol par phytoextraction présente néanmoins plusieurs inconvénients. Dans un premier temps, les plantes sélectionnées sont souvent efficaces pour l'extraction d'un seul élément et cette technique n'est donc alors pas adaptée pour une pollution multi-métallique (Kidd *et al.*, 2009). De plus, pour rendre la technique réellement applicable sur le terrain, le temps nécessaire à la décontamination d'un site ne doit pas excéder 10 à 15 ans, or dans la pratique, les temps estimés sont souvent beaucoup plus importants (> 100 ans) (Mench *et al.*, 2010), la stratégie de phytostabilisation lui est alors souvent préférée.

2.2.3.3. Phytostabilisation

La phytostabilisation est une stratégie qui vise à établir un couvert végétal et à inactiver *in situ* les ETM à l'aide de plantes tolérantes et/ou d'amendements permettant ainsi de réduire la mobilité et la toxicité des polluants. Les plantes sélectionnées pour la phytostabilisation doivent retenir les ETM au niveau de leur rhizosphère et limiter leur transport dans leurs parties aériennes pour éviter les transferts vers la chaîne alimentaire (Figure 13). Les plantes ayant une stratégie d'exclusion sont alors indiquées pour la phytostabilisation. Cette technique est particulièrement adaptée à la réhabilitation *in situ* de larges zones contaminées et aux pollutions multi-métalliques (Kidd *et al.*, 2009).

Ce travail de thèse s'intègre dans un objectif de phytostabilisation de sol pollué par des ETM, cette technique de phytoremédiation sera donc détaillée dans le paragraphe suivant.

Tableau V : Principales plantes étudiées pour leur potentiel de phytostabilisation et principaux effets observés

ETM	Espèce végétale	Type d'étude	Principaux effets	Références
As	<i>Viola macedonica</i> , <i>V. arsenica</i> , <i>V. allchariensis</i>	CT	accumulation dans les racines, peu de translocation vers les parties aériennes	Stevanovic <i>et al.</i> , 2010
	<i>Stachys sylvatica</i>	CT	accumulation dans les racines, peu de translocation vers les parties aériennes, baisse de la fraction biodisponible d'As dans la rhizosphère	Antosiewicz <i>et al.</i> , 2008
	<i>Eucalyptus cladocalyx</i> , <i>E. melliodora</i> , <i>E. polybractea</i> , <i>E. viridis</i>	ET	faible accumulation dans les parties aériennes, pas de modification de la biodisponibilité de l'As	King <i>et al.</i> , 2008
Cd	<i>Lupinus uncinatus</i>	CC	accumulation dans les racines, peu de translocation vers les parties aériennes	Ehsan <i>et al.</i> , 2009
	<i>Quercus ilex</i> subsp. <i>ballota</i>	CT	accumulation dans les racines, peu de translocation vers les parties aériennes	Dominguez <i>et al.</i> , 2009
	<i>Atriplex halimus</i> subsp <i>schweinfurthii</i>	H	accumulation dans les racines, peu de translocation vers les parties aériennes, plante halophyte, accumulation de proline	Nedjimi & Daoud, 2009
Cr	<i>Phaseolus vulgaris</i>	CC	accumulation dans les racines, peu de translocation vers les parties aériennes et les graines	Lopez-Luna <i>et al.</i> , 2012
	<i>Avena sativa</i> , <i>Sorghum bicolor</i> × <i>sudanense</i> , <i>Triticum aestivum</i>	CC	accumulation dans les racines, peu de translocation vers les parties aériennes	Lopez-Luna <i>et al.</i> , 2009
Cu	<i>Imperata condensata</i> , <i>Lupinus albus</i> , <i>Helianthus annuus</i>	H	plantes excluantes, exudats racinaires	Meier <i>et al.</i> , 2012
	<i>Populus</i> × <i>canadensis</i> , clone <i>Adda</i> , <i>P. alba</i> , clone <i>Villafranca</i>	H	accumulation dans les racines, peu de translocation vers les parties aériennes pour <i>P. alba</i> et indication pour <i>P. x canadensis</i>	Borghi <i>et al.</i> , 2008
Pb	<i>Erica andevalensis</i>	IV	stockage du Pb dans les racines au niveau de l'épiderme	Mingorance <i>et al.</i> , 2012
As, Cd	<i>Lupinus albus</i>	CC et ET	accumulation dans les racines, peu de translocation vers les parties aériennes	Vázquez <i>et al.</i> , 2006
Cd, Tl	<i>Quercus ilex</i> subsp. <i>Ballota</i> , <i>Pistacia lentiscus</i> L.	CC	accumulation dans les racines, peu de translocation vers les parties aériennes	Dominguez <i>et al.</i> , 2011
Cd, Zn	<i>Betula pendula</i> , <i>Quercus robur</i> , <i>Q. petraea</i> , <i>Robinia pseudoacacia</i> , <i>Populus tremula</i> , <i>Pinus sylvestris</i>	CT	faible accumulation de Zn et Cd dans les parties aériennes et acidification du sol sauf pour <i>P. tremula</i> et <i>B. pendula</i>	Van Nevel <i>et al.</i> , 2011
	<i>Dorycnium pentaphyllum</i>	CC	accumulation dans les racines, peu de translocation vers les parties aériennes	Lefèvre <i>et al.</i> , 2009
Cd, Pb, Zn	<i>Lolium perenne</i> , <i>Trifolium repens</i>	CT	accumulation dans les racines, peu de translocation vers les parties aériennes	Bidar <i>et al.</i> , 2009
Co, Cr, Ni	<i>Spartina densiflora</i> , <i>S. maritima</i>	CT	accumulation dans les racines, peu de translocation vers les parties aériennes	Cambrollé <i>et al.</i> , 2011
Cu, Ni, Pb, Zn	<i>Artriplex hortensis</i> var. <i>purpurea</i> , <i>A. hortensis</i> var. <i>rubra</i> , <i>A. rosea</i>	CC	accumulation dans les racines, peu de translocation vers les parties aériennes	Kachout <i>et al.</i> , 2012
Cu, Pb, Zn	<i>Gentiana pennelliana</i>	CT	accumulation dans les racines, peu de translocation vers les parties aériennes	Yoon <i>et al.</i> , 2006
Cd, Co, Mn, Pb, Zn	<i>Calotropis procera</i> , <i>Gnaphalium luteoalbum</i>	CT	plantes excluantes	Varun <i>et al.</i> , 2012

Type d'étude : CT : collecte sur le terrain ; CC : conditions contrôlées ; H : hydroponie ; IV : in vitro ; ET : expérimentation sur le terrain

3. La phytostabilisation

3.1. Choix de l'espèce végétale

Plusieurs facteurs déterminent le choix de l'espèce végétale sélectionnée dans un objectif de phytostabilisation. Il est préférable que les plantes sélectionnées soit natives de la région afin de s'assurer de leur adaptation à la pollution et éviter l'introduction d'espèces invasives. De plus, ces plantes doivent être capables de s'implanter rapidement sur le site et offrir un couvert végétal dense et un développement racinaire important et profond afin d'éviter l'érosion éolienne ou hydrique des polluants. Les ETM doivent être retenus au niveau du système racinaire, soit par précipitation dans la rhizosphère grâce à la sécrétion d'exsudats racinaires, soit par adsorption ou absorption par les racines. De plus, la translocation des ETM vers les parties aériennes doit être limitée afin d'éviter le transfert des ETM dans la chaîne alimentaire. Le calcul des facteurs de bioconcentration (BF) ou d'accumulation (AF), correspondant au rapport entre la concentration en ETM dans les parties aériennes et la concentration dans le sol, et les facteurs de translocation (TF) correspondant au rapport entre la concentration en ETM dans les parties aériennes et la concentration dans les racines, permet de s'en assurer ; idéalement ces facteurs doivent être inférieurs à 1 (Mendez & Maier, 2008b ; Mench *et al.*, 2010).

En général, les plantes étudiées pour leur potentiel en phytostabilisation sont celles retrouvées sur sites pollués et appartiennent à différentes familles de plantes herbacées (Astéracées, Chénopodiacées, Euphorbiacées, Poacées...) (Mendez & Maier, 2008a). Dans la plupart des cas, les études se focalisent sur les concentrations en ETM des parties aériennes et des racines. Le tableau V résume les principales espèces étudiées pour leur potentiel de phytostabilisation.

Cependant, certaines études mettent également en évidence les mécanismes impliqués dans l'immobilisation des polluants dans la rhizosphère. De nombreuses espèces végétales sont notamment capables d'excréter des molécules organiques permettant de complexer les ETM au niveau de la rhizosphère comme les acides organiques de faible poids moléculaire ou les composés phénoliques. Par exemple, deux variétés de lupins (*Lupinus albus*, *Lupinus uncinatus*) ont été décrites comme de bonnes candidates pour la phytostabilisation du cadmium. En effet, une faible translocation du cadmium des racines aux parties aériennes de la plante a été mise en évidence ($TF < 1$) (Vázquez *et al.*, 2006 ; Ehsan *et al.*, 2009). De plus, *Lupinus albus* sécrète du citrate ($pK=6,4$) en présence de cadmium ou de cuivre, ce qui augmente le pH de la rhizosphère (si $pH < 5,5$) et diminue ainsi la solubilité et donc la mobilité du cadmium, du cuivre et de

l'arsenic dans les sols acides (Vázquez *et al.*, 2006 ; Meier *et al.*, 2012). En présence de cuivre, *Imperata condensata* et *Helianthus annuus* sont également capables d'excréter du citrate alors qu'*Oenothera picensis* excrète du succinate (Meier *et al.*, 2012). Ces plantes sont également capables d'excréter des composés phénoliques comme l'acide cinnamique ainsi que de la coumarine pour *Helianthus annuus* ou des catéchines pour *Oenothera picensis* (Meier *et al.*, 2012). Il a également été montré que *Spartina densiflora* et *maritima* excrétaient des oxydes de fer capables de piéger le cobalt dans la rhizosphère (Cambrolle *et al.*, 2011). Enfin, chez *Erica endevalensis*, il a été mis en évidence une adsorption et une absorption du plomb uniquement au niveau de l'épiderme de la racine (première couche de cellules en contact avec le sol) ce qui permet l'immobilisation des ETM au niveau du système racinaire et évite la translocation vers les parties aériennes (Mingorance *et al.*, 2012). Les plantes sélectionnées pour leur potentiel de phytostabilisation développent chacune leurs propres stratégies d'évitement.

Dans les régions arides et semi-arides, les sols pollués par les ETM sont souvent également très salins. Les plantes halophytes (tolérantes au stress salin) sont alors de bonnes candidates pour la phytostabilisation car elles sont souvent capables de tolérer à la fois les stress salins et métalliques (Mendez & Maier, 2008b). En effet, les mécanismes impliqués dans la tolérance au stress salin sont souvent communs aux mécanismes de tolérance au stress métallique. Par exemple, les halophytes développent souvent des stratégies de compartimentation des ions toxiques (sodium et chlorures dans le cas d'un stress salin) dans les organites intracellulaires. De plus, les halophytes synthétisent des molécules osmoprotectantes afin de maintenir un gradient d'eau favorable et de protéger les structures cellulaires (Manousaki & Kalogerakis, 2011). Ainsi, la proline est une molécule osmoprotectante qui est également impliquée dans la signalisation, les défenses antioxydantes et la complexation avec les ETM. Il a d'ailleurs été montré qu'*Atriplex halimus*, un halophyte connu pour son potentiel de phytostabilisation (Nedjimi & Daoud, 2009 ; Kachout *et al.*, 2012), accumule de la proline en cas de stress au cadmium (Nedjimi & Daoud, 2009). Enfin un stress salin induit souvent un stress oxydatif pour les cellules tout comme le stress métallique, les mécanismes antioxydants mis en place par les halophytes sont alors communs à la tolérance aux ETM et au sel (Manousaki & Kalogerakis, 2011).

Les arbres sont également de très bons candidats pour la phytostabilisation. En effet, ils jouent un rôle important dans le cycle des nutriments et des éléments en stabilisant la structure du sol grâce à leur système racinaire très développé et en protégeant la surface du sol de l'érosion. De plus, l'évapotranspiration importante chez les arbres permet de réduire la quantité d'eau présente dans le sol et empêche ainsi le lessivage des éléments (Madejon *et al.*, 2004 ; Mertens *et al.*, 2007). La forte évapotranspiration des arbres par rapport aux herbacées permet de diminuer ainsi le transfert vertical. Le

peuplier est par exemple un arbre possédant un fort potentiel d'évapotranspiration (30 à 50 l.kg⁻¹ MS élaborée chez le peuplier, ≈ 20 chez les feuillus et < 10 chez les résineux)¹¹. Parmi les arbres étudiés en phytostabilisation, le chêne a un potentiel important car il tolère les ETM et les stocke principalement au niveau des racines (Dominguez *et al.*, 2009 ; Dominguez *et al.*, 2011). En revanche, le chêne ainsi que d'autres espèces ligneuses comme le frêne et l'érable ont tendance à acidifier le sol ce qui augmente la biodisponibilité de la plupart des ETM (Mertens *et al.*, 2007).

Parmi les espèces ligneuses présentant un potentiel de phytoremédiation prometteur, le peuplier est un candidat intéressant. Le peuplier (*Populus*) appartient avec le genre *Salix* à la famille des Salicacées et est largement répandu dans l'hémisphère nord avec environ trente espèces connues (Hamzeh & Dayanandan, 2004). D'une part, c'est une espèce ligneuse à croissance rapide qui produit ainsi une biomasse importante (en taillis à très courte rotation ou TTCR : 10t/ha/an) et qui est, de plus, facile à reproduire (le plus souvent par bouturage). D'autre part, c'est une espèce pionnière connue pour ses capacités de tolérance aux ETM (Yadav *et al.*, 2010). Le peuplier a souvent fait l'objet d'études sur son potentiel de phytoextraction car c'est une plante accumulatrice de zinc et cadmium notamment ; bien que les capacités d'accumulation de cette essence soient très variables d'une espèce à l'autre (jusqu'à un facteur 5) (Di Baccio *et al.*, 2003 ; Migeon *et al.*, 2009 ; Migeon *et al.*, 2012). Néanmoins, récemment l'intérêt pour le peuplier s'est tourné vers une perspective de phytostabilisation car la biomasse produite pourrait être utilisée pour la production de bioénergie. En effet, il a été montré qu'un système de filtres à manche en sortie de chaudière suffit à limiter la dispersion de cendres contaminées dans l'atmosphère en dessous des seuils tolérés (Chalot *et al.*, 2012).

3.2. Amélioration du potentiel de phytostabilisation des plantes

Les méthodes de phytostabilisation et plus généralement de phytoremédiation peuvent être optimisées soit par l'ajout d'amendements chimiques sur la zone à traiter, soit grâce à l'ajout d'amendements biologiques, les micro-organismes du sol fongiques et/ou bactériens en interaction avec les plantes.

3.2.1. Amendements

Afin d'améliorer le potentiel de phytostabilisation des plantes, des amendements peuvent être ajoutés sur les sites à traiter. Les principaux amendements proposés pour atteindre les objectifs d'immobilisation des ETM sont les minéraux phosphatés (hydroxyapatite, scories phosphatées), les amendements calciques (CaCO₃, Ca(OH)₂, (Ca, Mg)CO₃, chaux), les aluminosilicates purs ou associés (zéolites,

¹¹ <http://www.peupliersdefrance.org/>

cendres cycloniques telles que la béringite, argiles), les oxydes ou hydroxydes de fer, d'aluminium et de manganèse et divers substrats organiques (composts, tourbes, biochar...) (ADEME, 2007).

Les modes d'action des amendements sur le potentiel de phytostabilisation des plantes sont de différentes natures. Dans un premier temps, certains amendements sont capables de modifier la biodisponibilité des ETM dans le sol soit directement par précipitation ou complexation, soit indirectement par modification des propriétés physico-chimiques du sol. Les plantes sélectionnées accumulent alors moins les ETM dans leurs tissus et les phénomènes de lixiviation des ETM sont limités. Par exemple, l'ajout de phosphate sous forme de sel (Mains *et al.*, 2006) ou de roche phosphatée (Park *et al.*, 2012) permet la précipitation des ETM et limite la lixiviation de l'arsenic et du plomb respectivement. L'amendement de scories Thomas sur des sédiments contaminés permet également de réduire la fraction extractible du cadmium et du zinc (Bert *et al.*, 2012). L'utilisation de matière organique comme les biosolides issus du traitement des eaux usées (Santibanez *et al.*, 2008), le compost (Alvarenga *et al.*, 2009 ; Ulriksen *et al.*, 2012), ou le fumier (Wei *et al.*, 2011) permet également de complexer les ETM dans le sol. La biodisponibilité de nombreux ETM étant augmentée lorsque le pH est acide, il est également possible d'augmenter le pH du sol afin de diminuer la disponibilité de ceux-ci par ajout de chaux par exemple (Simon, 2005 ; Ulriksen *et al.*, 2012).

Dans un deuxième temps, l'ajout d'amendements peut permettre de stimuler la croissance des plantes en leur fournissant les éléments minéraux dont elles pourraient manquer. Le couvert végétal est alors plus dense et permet de limiter ainsi l'érosion éolienne des sols et de favoriser l'installation d'autres espèces végétales. Par exemple, l'ajout de compost permet de compenser le manque de potassium et de phosphore et de stimuler le développement d'*Atriplex halimus* sur un sol contaminé avec de l'arsenic et du plomb (Martinez-Fernandez & Walker, 2012). Dans le cadre d'une étude de phytostabilisation d'un site contaminé par du cuivre avec *Eschscholzia californica* et *Lolium* spp., l'ajout de compost améliore leur nutrition minérale et hydrique grâce à une meilleure rétention de l'eau et favorise ainsi leur croissance (Ulriksen *et al.*, 2012).

3.2.2. Association des plantes avec des champignons

Les champignons apportent plusieurs avantages non négligeables à leurs hôtes sur site pollué par des ETM. Les champignons mycorhiziens sont tout d'abord capable d'améliorer la croissance de la plante et d'en augmenter ainsi la production de biomasse (Smith & Read, 2008). Ensuite, les champignons forment un réseau de mycélium important, capable de prospecter un large volume de sol. De plus, ils possèdent de nombreux mécanismes de tolérance et de résistance aux ETM. Enfin, des études ont montré qu'ils étaient capables d'augmenter la tolérance des plantes aux ETM. Tous ces éléments en font des candidats intéressants pour améliorer le potentiel de phytostabilisation des plantes associées.

Tableau VI : Différents types de mycorhizes (d'après Smith & Read, 2008)

Principales caractéristiques	Types de Mycorhizes							
	Mycorhizes arbuscules	à Ectomycorhizes	Ectendomycorhizes	Mycorhizes arbutoïdes	Mycorhizes monotropoïdes	Mycorhizes éricoïdes	Mycorhizes d'orchidées	
Hyphes septés	-	+	+	+	+	+	+	
Hyphes non septés	+	-	-	-	-	-	-	
Colonisation intracellulaire	+	-	+	+	+	+	+	
Manteau fongique	-	+	+ ou -	+ ou -	+	-	-	
Réseau de Hartig	-	+	+	+	+	-	-	
Divisions fongiques	Gloméromycètes	Basidio-/Ascomycètes (Gloméromycètes)	Basidio-/Ascomycètes	Basidiomycètes	Basidiomycètes	Ascomycètes	Basidiomycètes	
Familles végétales	Bryophytes							
	Ptéridophytes	Gymnospermes	Gymnospermes	Ericales	Monotropoideae	Ericales	Orchidales	
	Gymnospermes	Angiospermes	Angiospermes			Bryophytes		
	Angiospermes							

3.2.2.1. Les champignons s'associant avec les racines des plantes

3.2.2.1.1. *Les champignons endophytes*

Le terme endophyte provient du grec « *endo* » qui signifie « dans » et « *phyton* » qui signifie « végétal », un champignon endophyte est donc un champignon qui effectue son cycle de vie à l'intérieur des tissus végétaux. La relation entre le champignon endophyte et la plante peut être parasitique (seul un des partenaires en tire bénéfice au détriment de l'autre), symbiotique (les deux partenaires en tire avantage, c'est la symbiose mycorhizienne) ou commensale (seul un des partenaires en tire bénéfice). Dans la suite de ce mémoire, afin d'en faciliter la compréhension, les champignons parasitiques seront désignés comme tels ou pathogènes, les champignons symbiotiques seront désignés comme champignons mycorhiziens et les champignons commensaux seront désignés comme « endophytes ».

Parmi les champignons endophytes, les plus connus sont les DSE pour « *Dark Septate Endophyte* ». Ce sont des champignons colonisant les racines, appartenant à la famille des Ascomycètes dont les hyphes peuvent être stériles ou conidiens (la conidie est la structure de reproduction asexuée chez les Ascomycètes) et forment des structures mélanisées inter- ou intracellulaires (Mandyam & Jumpponen, 2005). Leur rôle est encore mal connu mais ils semblent avoir de nombreux effets positifs sur leurs hôtes comme une amélioration de la croissance et une protection contre les pathogènes ou les stress biotiques ou abiotiques (Mandyam & Jumpponen, 2005). Certains auteurs considèrent même les DSE comme un type de symbiose mycorhizienne (Jumpponen, 2001) mais cette définition étant encore controversée, ils seront désignés comme endophytes dans le reste de ce manuscrit.

3.2.2.1.2. *La symbiose mycorhizienne*

Les mycorhizes (du grec « *mukês* », champignon et « *rhiza* », racine) sont une association mutualiste à bénéfice réciproque entre un champignon et une plante. Les associations mycorhiziennes, entre les racines des plantes et les champignons, sont très fréquemment rencontrées dans presque tous les écosystèmes naturels. Environ 90 % des plantes terrestres sont en effet capables de former des mycorhizes. Les deux partenaires s'échangent mutuellement des éléments nécessaires à leur bon développement : les champignons (hétérotrophes) fournissent des éléments minéraux à la plante (autotrophe), en échange de molécules carbonées issues de la photosynthèse (Selosse & Le Tacon, 1998 ; Smith & Read, 2008). Sept principaux types de mycorhizes ont été distingués, selon des critères morphologiques (Tableau VI).

3.2.2.1.2.1. Les différents types de mycorhizes

- Les endomycorhizes à arbuscules (AM)

Les endomycorhizes à arbuscules constituent le type de mycorhizes le plus ancien et le plus répandu qui auraient co-évolué avec les plantes terrestres depuis au moins 400 millions d'années et seraient à l'origine évolutive des autres types de mycorhizes (Wang & Qiu, 2006). Les champignons AM sont des symbiotes obligatoires (ils ne peuvent pas survivre sans la plante hôte). Ils appartiennent au *phylum* des Gloméromycètes et sont capables de coloniser une large variété d'espèces végétales, principalement herbacées mais aussi certaines plantes ligneuses (peuplier, saule, eucalyptus...). Les hyphes des champignons endomycorhiziens, pénètrent dans les cellules corticales des racines où ils forment des structures intracellulaires ramifiées appelées « arbuscules », principal lieu d'échanges entre les deux partenaires. Certaines espèces forment également des « vésicules » qui sont les organes de réserves intracellulaires ou intercellulaires du champignon. Des hyphes extraradiculaires se développent sur plusieurs centimètres à l'extérieur de la racine, explorant le sol alentour, et pouvant porter une multitude de spores. Ces spores constituent l'organe de reproduction et de dissémination typique des champignons AM, elles peuvent contenir des centaines de noyaux qui ne possèdent pas forcément le même matériel génétique (Smith & Read, 2008). La génétique des Gloméromycètes est néanmoins très mal connue. La diversité de structure et de forme des spores, isolées, sous formes de grappes ou dans des sporocarpes, a souvent été la base de la classification des champignons AM qui a été quelque peu remise en question ces dernières années. Récemment une nouvelle taxonomie basée sur l'analyse de la sous-unité 18S de l'ADNr a permis de construire l'arbre phylogénétique des Gloméromycètes qui nécessite encore d'être amélioré (Wang & Qiu, 2006).

- Les ectomycorhizes (ECM)

Les ectomycorhizes (ECM) : ce sont des symbioses formées par des champignons colonisant principalement les arbres et arbustes (en majorité angiospermes ou gymnospermes, soit approximativement 8000 espèces végétales (Martin *et al.*, 2007)) des régions boréales, tempérées et montagneuses, qui produisent souvent des carpophores (fructifications du champignon) à la surface des sols forestiers. Ils appartiennent majoritairement à la famille des Ascomycètes (truffes, pezizes...) et des Basidiomycètes (laccaires, paxilles, hébélomes, bolets...). Les premières traces fossiles datent d'approximativement 50 millions d'années (Wang & Qiu, 2006). Ils se développent de manière intercellulaire, en effet le mycélium progresse entre les cellules du cortex racinaire mais ne pénètre pas dans les cellules vivantes. Les ectomycorhizes se caractérisent par la formation de tissus spécialisés. Outre les hyphes extramatriciels se propageant dans le milieu extérieur et assurant le rôle d'exploration et d'absorption, on distingue les hyphes agglomérés autour de la racine, formant un manchon fongique appelé manteau, et les hyphes qui

s'insinuent entre les cellules du cortex formant un réseau appelé réseau de Hartig. C'est au niveau de ce réseau que se font les échanges d'éléments nutritifs entre le champignon et la plante.

- Les mycorhizes éricoïdes (ERM)

Les mycorhizes éricoïdes présentent des structures fongiques sous la forme de pelotes à l'intérieur des cellules racinaires. Les champignons impliqués dans les mycorhizes éricoïdes sont des ascomycètes principalement de l'ordre des Helotiales, dont les genres les plus connus sont *Hymenoscyphus* et *Oidiodendron*. La mycorhization a lieu directement au niveau des cellules corticales des Ericacées puisqu'elle ne possède pas d'épiderme. Les ERM ont de nombreuses caractéristiques communes avec les ECM et dériveraient probablement de ces dernières (Wang & Qiu, 2006). D'ailleurs de nombreuses espèces fongiques formant des ERM sont également capables de former des ECM avec d'autres espèces végétales (Kjoller *et al.*, 2010).

- Les ectendomycorhizes (EEM)

Les champignons ectendomycorhiziens forment un manchon fongique autour des racines et un réseau de Hartig intercellulaire comme les ECM, mais en plus les hyphes pénètrent à l'intérieur des cellules. Les EEM appartiennent au *phylum* des Basidiomycètes ou Ascomycètes et s'associent avec des plantes de la famille des Pinacées, Araucariacées, Ericacées, Salicacées, Fabacées, Bétulacées et Cistacées. Parmi les EEM, on distingue les champignons présentant des hyphes intracellulaires sous formes de pelotons (mycorhizes arbutoïdes), ou sous formes d'hyphes très courts (mycorhizes monotropoïdes). Les ectendomycorhizes arbutoïdes et monotropoïdes sont restreintes à des genres végétaux particuliers et se trouvent principalement chez la famille des Éricacées (Wang & Qiu, 2006).

- Les mycorhizes d'orchidées (ORM)

Les mycorhizes d'orchidées sont un type de mycorhizes très spécialisé et indispensable à la plante car les orchidées sont toutes, à un stade de leur vie, dépendantes d'une source externe de carbone. Les graines et embryons de cette famille de plantes ont très peu de réserves et, dès leur germination, la colonisation par le champignon leur est nécessaire pour se développer. La mycorhize fournit à l'orchidée les molécules carbonées et les nutriments indispensables à la plante, les espèces non-chlorophylliennes sont ainsi dépendantes de leur symbiote pendant toute leur vie. Chez les ORM, la plupart des espèces appartiennent au *phylum* des Basidiomycètes et les principaux genres représentés sont *Rhizoctonia*, *Sebacina*, *Tulasnella* et *Russula*.

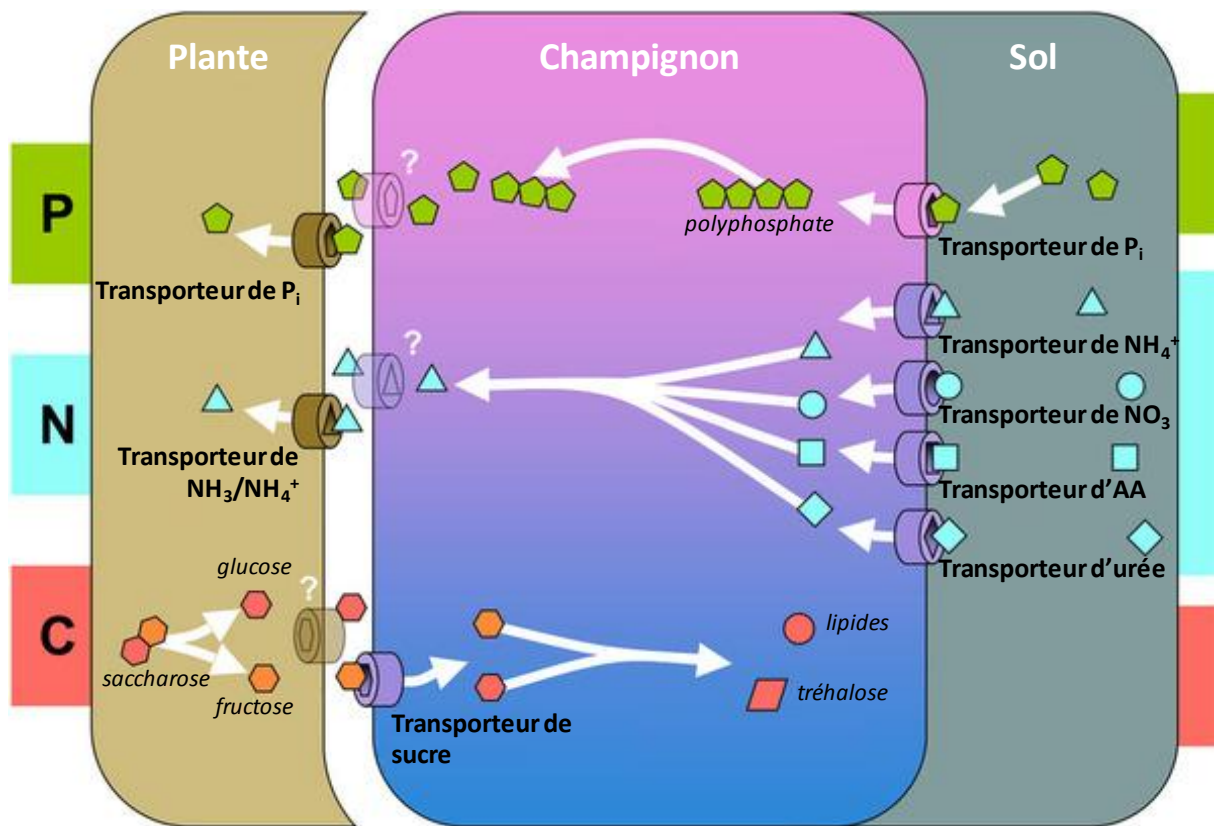


Figure 14 : Résumé des principaux systèmes de transport et des nutriments échangés lors de la symbiose ecto- ou endomycorhizienne (d'après Bonfante & Genre, 2010). La translocation du phosphore (P), de l'azote (N) et du carbone (C) entre l'interface sol-champignon et l'interface plante-champignon est décrite. Le phosphore inorganique (P_i) et les formes minérales (NH_4^+ , NO_3^-) ou organiques (acides aminés (AA)) de l'azote sont absorbés par le mycélium extramatriciel puis apportés à l'interface plante-champignon à l'aide de transporteurs spécifiques. Des transporteurs de sucres permettent l'import de dérivés carbonés issus de la plante chez le champignon, souvent stockés ensuite sous forme de tréhalose ou de lipides.

3.2.2.1.2.2. Rôle des mycorhizes dans les écosystèmes

La symbiose mycorhizienne est un échange réciproque entre deux partenaires. Les champignons sont à l'interface entre le sol et les racines de la plante et participent à sa nutrition minérale et hydrique. En échange, la plante leur fournit des composés carbonés issus de la photosynthèse. La figure 14 résume les principaux systèmes de transport et les molécules impliquées dans les échanges entre la plante et le champignon connus à ce jour (Bonfante & Genre, 2010).

Le mycélium extramatriciel peut coloniser un volume important de sol, permettant ainsi à la plante d'augmenter son volume de prospection pour le phosphore et l'azote, deux éléments principaux limitant la croissance des plantes dans de nombreux milieux (Pekin *et al.*, 2012). Les champignons mycorhiziens peuvent améliorer la nutrition phosphatée de leurs plantes hôtes en sécrétant, dans la solution du sol, des phosphatases acides en mesure de libérer du phosphate inorganique à partir du phosphore organique du sol. En ce qui concerne la mobilisation de l'azote, les champignons mycorhiziens sont capables d'utiliser l'azote minéral (sous forme de nitrate ou d'ammonium) ou organique grâce à des enzymes de dégradation comme les protéases par exemple (Müller *et al.*, 2007).

En contrepartie, la plante fournit au champignon des dérivés carbonés issus de la photosynthèse, principalement sous forme de sucres simples, notamment de glucose (Doidy *et al.*, 2012). Lors d'expérience de marquage du CO₂ au carbone 14 (¹⁴C), il a été montré qu'il suffisait de trois jours pour que le ¹⁴C se retrouve dans le mycélium extramatriciel après être passé par les racines et mycorhizes de *Pinus densiflora* (Wu *et al.*, 2002). Chez les champignons ectomycorhiziens, les sucres issus de la plante sont principalement stockés sous forme de tréhalose ou de mannitol (Nehls *et al.*, 2010). Chez les champignons endomycorhiziens, les lipides, le tréhalose et le glycogène semblent être les formes de stockage du carbone (Bago *et al.*, 2003). En plus de l'acquisition de sucres à partir de photosynthétats produit par les plantes, il a été montré que des lipides de la plante pouvaient eux aussi constituer une réserve de carbone. Ainsi, chez le pin (*Pinus sylvestris*), on observe une production accrue de lipides neutres contenant des acides gras saturés en réponse à la présence de *Pisolithus tinctorius*, ces lipides pourraient même être transférés de la plante au champignon (Laczko *et al.*, 2004).

Les symbioses mycorhiziennes permettent également à la plante de résister à des stress biotiques (impliquant des organismes vivants) ou abiotiques (non biologiques).

Il a notamment été montré que les champignons mycorhiziens protégeaient les plantes des pathogènes (fongiques, bactériens ou herbivores) par plusieurs mécanismes. En effet, l'impact des champignons sur la résistance aux pathogènes se manifeste par l'amélioration de la nutrition de la plante, la transformation de la morphologie végétale, la modification de la microflore et/ou de la composition des sols. D'autres actions plus directes impliquent la stimulation de mécanismes de défense par la plante et la

Tableau VII : Etudes récentes sur l'impact des champignons endomycorhiziens sur la tolérance des plantes aux ETM et principaux effets

ETM testés	Champignons endomycorhiziens étudiés	Plantes hôtes	Type d'étude	Effets	Références
Al	<i>Glomus clarum</i>	<i>Liriodendron tulipifera</i>	pots, CA	diminue le transfert vers les parties aériennes et excrète du malate et citrate	Klugh & Cumming, 2007
As	<i>Glomus mosseae</i> BEG167	<i>Lycopersicon esculentum</i>	pots, CA	diminue le transfert vers les parties aériennes	Liu <i>et al.</i> , 2005
	<i>G. mosseae</i>	<i>Zea mays</i>	pots, SP	diminue le transfert vers les parties aériennes sauf si un amendement de P est apporté	Xia <i>et al.</i> , 2007
Cd	<i>G. mosseae</i>	<i>Zea mays</i>	pots, CA	diminue le transfert vers les parties aériennes	Chen <i>et al.</i> , 2004
	<i>G. mosseae</i>	<i>Triticum aestivum</i>	pots, CA	augmente la concentration racinaire en Cd, pas d'effet sur les parties aériennes	Shahabivand <i>et al.</i> , 2012
Cu	<i>G. mosseae</i> , <i>G. intraradices</i>	<i>Populus alba</i> , <i>Populus nigra</i>	pots, CA	diminue le transfert vers les parties aériennes	Todeschini <i>et al.</i> , 2007
	<i>Acaulospora mellea</i>	<i>Zea mays</i>	pots, CA	diminue le transfert vers les parties aériennes	Wang <i>et al.</i> , 2007
	<i>G. mosseae</i>	<i>Oryza sativa</i>	H, CA	diminue le transfert vers les parties aériennes	Zhang <i>et al.</i> , 2009
Ni	<i>G. intraradices</i>	<i>Berkheya coddii</i>	pots, SP	augmente le transfert vers les parties aériennes	Turnau & Mesjasz-Przybylowicz, 2003
U	<i>Glomus caledonium</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	pots, SP	diminue le transfert vers les parties aériennes	Chen <i>et al.</i> , 2005c
	<i>G. intraradices</i> BEG 87	<i>Hordeum vulgare</i>	pots, SP	diminue le transfert vers les parties aériennes	Chen <i>et al.</i> , 2005b
	<i>G. intraradices</i>	<i>Lolium perenne</i> , <i>Medicago trunculata</i>	pots, SP	diminue le transfert vers les parties aériennes	Chen <i>et al.</i> , 2008
	<i>G. intraradices</i>	<i>Medicago trunculata</i>	pots, SP	diminue le transfert vers les parties aériennes	Chen <i>et al.</i> , 2005a
	<i>G. intraradices</i>	<i>Trifolium subterraneum</i>	pots, CA	diminue le transfert vers les parties aériennes	Rufyikiri <i>et al.</i> , 2004
Zn	<i>G. mosseae</i> , <i>G. intraradices</i>	<i>Populus alba</i> , <i>P. nigra</i>	pots, CA	pas d'effet du champignon sur la translocation, augmente la tolérance de la plante	Lingua <i>et al.</i> , 2008
	<i>G. intraradices</i> , <i>G. claroideum</i>	<i>Solanum nigrum</i>	pots, CA	augmente le transfert vers les parties aériennes	Marques <i>et al.</i> , 2007
Cd, Cu	<i>Glomus geosporum</i>	<i>Aster tripolium</i>	pots, CA	augmente la concentration racinaire en ETM, pas d'effet sur les parties aériennes	Carvalho <i>et al.</i> , 2006
Cd, Pb	<i>G. mosseae</i>	<i>Cajanus cajan</i>	pots, CA	diminue le transfert vers les parties aériennes, augmentation de l'activité des enzymes anti-oxydantes	Garg & Aggarwal, 2012
Cd, Zn	<i>G. mosseae</i> BEG167	<i>Zea mays</i>	pots, CA	diminue le transfert vers les parties aériennes	Shen <i>et al.</i> , 2006
Cu, Zn	<i>G. mosseae</i> , <i>G. intraradices</i>	<i>Populus alba</i>	pots, SP	augmente la concentration racinaire en ETM, pas d'effet sur les parties aériennes, stimule l'expression des gènes MT	Cicatelli <i>et al.</i> , 2010
	<i>G. clarum</i> , <i>Gigaspora margarita</i> , <i>Acaulospora</i> sp.	<i>Coffea arabica</i>	pots, CA	diminue le transfert vers les parties aériennes	Andrade <i>et al.</i> , 2010
	<i>G. intraradices</i> , <i>G. spurcum</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	pots, CA	augmente le transfert vers les parties aériennes	Toler <i>et al.</i> , 2005
Th, U	<i>G. intraradices</i>	<i>Medicago truncatula</i>	pots, SP	diminue le transfert vers les parties aériennes	Roos & Jakobsen, 2008
Cd, Pb, Zn	<i>G. mossae</i> , <i>Glomus</i> sp.	<i>Zea mays</i>	pots, SP	diminue le transfert vers les parties aériennes	Liang <i>et al.</i> , 2009
	<i>G. intraradices</i> , <i>G. mosseae</i>	<i>Medicago truncatula</i>	pots, SP	diminue ou augmente le transfert vers les parties aériennes en fonction de la souche utilisée	Redon <i>et al.</i> , 2009
	<i>G. intraradices</i> , <i>G. claroideum</i>	<i>Salix alba</i> , <i>Populus nigra</i>	pots, SP	pas d'effet du champignon sur la translocation, augmente la tolérance de la plante	Mrnka <i>et al.</i> , 2011
Cu, Pb, Zn	<i>G. mosseae</i>	<i>Coronilla juncea</i>	pots, SP	diminue la concentration en ETM dans les racines et les parties aériennes	Carrasco <i>et al.</i> , 2011
Cu, Co, Mn, Zn	<i>Rhizophagus/Glomus intraradices</i>	<i>Berkheya coddii</i>	pots, SP	diminue le transfert vers les parties aériennes	Orlowska <i>et al.</i> , 2011

H : hydroponie ; pots : test en pots ; CA : contamination artificielle en ETM ; SP : substrat issu de site pollué ; en vert : profil intéressant en phytostabilisation ; en rouge : profil intéressant en phytoextraction ; en bleu : profil intéressant en phytoremédiation

compétition entre mycorhizes et parasites pour l'espace, les sites d'infection et les éléments nutritifs (Gianinazzi *et al.*, 2010). Par exemple, *Glomus clarum* protège *Vigna unguiculata* du Basidiomycète *Rhizoctonia solanii*, un champignon responsable de la pourriture des racines. Cette protection serait la résultante de deux phénomènes : d'une part une nutrition accrue et performante, limitant en même temps celle du pathogène, et d'autre part la compétition pour les sites d'infection et les réactions antagonistes pouvant exister entre le champignon mycorhizien et l'agent pathogène (Abdel-Fattah & Shabana, 2002).

Les champignons mycorhiziens peuvent aussi participer à la résistance des plantes aux stress abiotiques, que ce soit contre la sécheresse en augmentant la disponibilité en eau pour la plante, ou contre des xénobiotiques (molécules étrangères à l'organisme) comme les ETM en jouant le rôle de « filtres » naturels. Ce dernier point sera plus particulièrement détaillé dans le paragraphe 4.

3.2.2.2. Apport des champignons mycorhiziens ou endophytes à la phytostabilisation

Les champignons mycorhiziens ou endophytes possèdent de nombreux mécanismes de tolérance et résistance aux ETM qui peuvent être un atout majeur pour protéger les plantes avec lesquelles ils interagissent contre les effets néfastes de ces éléments. Ces mécanismes seront plus particulièrement décrits dans le paragraphe suivant. Notamment, les champignons présentent une forte capacité à piéger les ETM dans leurs hyphes et peuvent ainsi protéger les plantes contre les effets néfastes des ETM. En effet, de nombreuses études ont permis de montrer l'implication des champignons endomycorhiziens et ectomycorhiziens dans la tolérance aux ETM des plantes dont les principaux résultats sont résumés dans les tableaux VII et VIII. En général, les auteurs ont étudié l'effet de quelques espèces fongiques (1 à 6) sur la sensibilité aux ETM de quelques espèces végétales (1 à 2).

L'apport des champignons à la phytoremédiation a été particulièrement étudié dans le cadre de la symbiose endomycorhizienne. Le tableau VII résume les études les plus récentes effectuées sur le sujet mais de nombreuses études antérieures ont déjà été rapportées (Gaur & Adholeya, 2004). Dans la plupart des cas, l'impact des champignons endomycorhiziens sur des plantes d'intérêt agronomique est étudié. En effet, de nombreuses études portent sur le maïs (Chen *et al.*, 2004 ; Shen *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2007 ; Xia *et al.*, 2007 ; Liang *et al.*, 2009), l'orge (Chen *et al.*, 2005b ; Chen *et al.*, 2005c), le riz (Zhang *et al.*, 2009) ou la luzerne (Chen *et al.*, 2005a ; Chen *et al.*, 2008 ; Roos & Jakobsen, 2008 ; Redon *et al.*, 2009). En général, l'effet observé est une amélioration de la production de biomasse et donc de la tolérance des plantes étudiées et une diminution de la translocation des ETM vers les parties aériennes ; ce qui présente un fort intérêt en agronomie si les teneurs en ETM dans les parties aériennes se retrouvent en dessous des seuils autorisés. Dans certains cas, la colonisation par un champignon endomycorhizien favorise l'accumulation des ETM dans les parties aériennes, rendant alors les plantes plus intéressantes dans une optique de

Tableau VIII : Etudes récentes sur l'impact des champignons ectomycorhiziens sur la tolérance des plantes aux ETM et principaux effets

ETM testés	Champignons ectomycorhiziens étudiés	Plantes hôtes	Type d'étude	Effets	Références
Al	<i>Pisolithus tinctorius</i>	<i>Pinus densiflora</i>	MA, CA	augmente la tolérance de la plante, excrétion de citrate	Tahara <i>et al.</i> , 2005
Cd	<i>Laccaria bicolor</i> , <i>Paxillus involutus</i>	<i>Picea abies</i>	Pots, CA	diminue le transfert vers les parties aériennes	Jentscke <i>et al.</i> , 1999
	<i>P. involutus</i> , <i>Suillus sp.</i> , <i>Laccaria laccata</i> , <i>Thelephora terrestris</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	MA, CA	diminue le transfert vers les parties aériennes	Colpaert & Van Assche, 1993
	<i>Amanita rubescens</i> , <i>Hebeloma sinapizans</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	Pots, CA	diminue le transfert vers les parties aériennes	Kozdroj <i>et al.</i> , 2007
	<i>Suillus luteus</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	MA, CA	diminue le transfert vers les parties aériennes	Krznaric <i>et al.</i> , 2009
	<i>Hebeloma crustuliniforme</i> , <i>P. involutus</i> , <i>P. tinctorius</i>	<i>Salix viminalis</i> , <i>Populus canadensis</i>	Pots, SP	augmente le transfert vers les parties aériennes	Sell <i>et al.</i> , 2005
	<i>Rhizopogon roseolus</i> , <i>Suillus bovinus</i>	<i>Pinus pinaster</i>	Pots, CA	augmente le transfert vers les parties aériennes	Sousa <i>et al.</i> , 2012
Cu	<i>S. bovinus</i> , <i>T. terrestris</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	MA, CA	diminue le transfert vers les parties aériennes	Van Tichelen <i>et al.</i> , 2001
	<i>S. luteus</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	MA, CA	diminue le transfert vers les parties aériennes, tolérance de la plante améliorée si le champignon est tolérant	Adriensen <i>et al.</i> , 2005
Ni	<i>Pisolithus albus</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Pots, CA	diminue le transfert vers les parties aériennes	Jourand <i>et al.</i> , 2010b
Zn	<i>S. bovinus</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	MA, CA	augmente la tolérance de la plante	Adriensen <i>et al.</i> , 2006
	<i>P. involutus</i> , <i>S. bovinus</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	MA, CA	diminue le transfert vers les parties aériennes	Colpaert & Van Assche, 1992
	<i>T. terrestris</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	MA, CA	augmente le transfert vers les parties aériennes	Colpaert & Van Assche, 1992
	<i>S. bovinus</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	MA, CA	augmente la tolérance de la plante	Adriensen <i>et al.</i> , 2004
Cd, Zn	inoculum naturel	<i>Populus tremula</i>	Pots, CA	diminue le transfert vers les parties aériennes	Langer <i>et al.</i> , 2012
	<i>S. luteus</i> , <i>P. involutus</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	MA, CA	diminue le transfert vers les parties aériennes	Krznaric <i>et al.</i> , 2010
Cr, Ni	<i>Pisolithus sp.</i>	<i>Eucalyptus urophylla</i>	MA, CA	augmente la tolérance de la plante	Aggangan <i>et al.</i> , 1998
Cu, Pb	Inoculum naturel du sol étudié	<i>Betula pendula</i>	Pots, SP	diminue le transfert vers les parties aériennes	Bojarczuk & Kieliszewska-Rokicka, 2010
Cd, Pb, Zn	<i>Hebeloma mesophaeum</i> , <i>P. involutus</i>	<i>Salix alba</i> , <i>Populus nigra</i>	Pots, SP	diminue le transfert vers les parties aériennes	Mrnka <i>et al.</i> , 2011
	<i>Scleroderma citrinum</i> , <i>Amanita muscaria</i> , <i>Lactarius rufus</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	Pots, CA	diminue le transfert vers les parties aériennes	Krupa & Kozdroj, 2007
Al, Cd, Cu, Ni, Zn	<i>H. crustuliniforme</i>	<i>Picea abies</i>	MA, CA	diminue le transfert vers les parties aériennes, ETM (sauf Cu) présents dans le réseau de Hartig et Zn dans le manteau	Brunner & Frey, 2000

MA : milieu artificiel ; Pots : test en pots ; CA : contamination artificielle en ETM ; SP : substrat issu de site pollué ; en vert : profil intéressant en phytostabilisation ; en rouge : profil intéressant en phytoextraction ; en bleu : profil intéressant en phytoremédiation

phytoextraction (Turnau & Mesjasz-Przybylowicz, 2003 ; Toler *et al.*, 2005 ; Marques *et al.*, 2007). Cet effet peut être « espèce fongique »-dépendant, par exemple la colonisation de la luzerne par *Glomus mosseae* diminue la translocation de cadmium ou zinc vers les parties aériennes alors que la colonisation par *G. intraradices* la favorise (Redon *et al.*, 2009). Il a également été montré que l'ajout d'un amendement phosphaté influence la translocation des ETM vers les parties aériennes de la plante (Xia *et al.*, 2007).

L'apport des champignons ectomycorhiziens à la phytostabilisation a également été étudié, le tableau VIII en résume les principales études. Celles-ci portent sur une douzaine d'espèces végétales seulement, appartenant au genre *Pinus* pour la plupart. De même, seule l'interaction avec une dizaine de genres fongiques a été explorée. Les plus étudiés appartiennent aux genres *Suillus*, *Paxillus*, *Pisolithus* ou *Hebeloma*. D'une manière générale, la mycorhization par des champignons ECM augmente la tolérance des plantes et diminue le transfert des ETM vers les parties aériennes. Il a aussi été montré que les champignons tolérants aux ETM étaient plus performants pour protéger la plante de leurs effets toxiques et amélioraient ainsi sa tolérance (Adriaensen *et al.*, 2005 ; Colpaert *et al.*, 2011).

A ce jour, peu d'études ont été réalisées sur l'impact des champignons endophytes sur la phytoremédiation. Le genre *Neotyphodium* a particulièrement été étudié. Dans le cas d'une contamination du substrat au cadmium, il augmenterait la tolérance de la plante étudiée et en favoriserait la translocation vers les parties aériennes de *Lolium arundinaceum* ou *Festuca arundinacea* et *pratensis* (Soleimani *et al.*, 2010 ; Ren *et al.*, 2011). En revanche, dans le cas d'une contamination au zinc, *Neotyphodium lolii* protège et limite le transfert de cet élément vers les parties aériennes de *Lolium perenne* (Monnet *et al.*, 2001). Le même effet est observé pour le cadmium, le plomb et le zinc dans le cadre de l'interaction entre le maïs et un champignon DSE *Exophiala pisciphila* (Li *et al.*, 2011). De même, un champignon endophyte, *Piriformospora indica*, associé au blé, permet de réduire la translocation du cadmium vers les parties aériennes, et cet effet est plus marqué en cas de co-inoculation de la plante avec le champignon endomycorhizien *G. mosseae* (Shahabivand *et al.*, 2012). De plus, des études portant sur les communautés fongiques associées aux racines du saule marsault (*Salix caprea*) ont montré une importante diversité de DSE sur sol pollué et ont noté une colonisation des racines plus importante par les DSE sur les sols les plus pollués (Likar & Regvar, 2009 ; Regvar *et al.*, 2010). Les auteurs ont alors suggéré que ces DSE pouvaient améliorer la croissance du saule sur les sites fortement pollués.

Cependant, l'interaction entre les champignons et les plantes est souvent observée en conditions contrôlées (test en pots en chambre de culture, hydroponie ou substrat artificiel de culture) sur un substrat contaminé artificiellement par des sels d'ETM facilement disponibles, ce qui ne reflète pas les conditions du terrain. De plus, la plupart des études réalisées se focalisent uniquement sur la production de biomasse des plantes colonisées ou non par les champignons et sur les quantités d'ETM présentes dans les racines et les

parties aériennes. Seules quelques équipes ont montré que la tolérance de la plante est améliorée grâce à l'excrétion d'acides organiques par le champignon (Tahara *et al.*, 2005 ; Klugh & Cumming, 2007) ou par la stimulation de la production de molécules détoxifiantes comme les enzymes antioxydantes (Garg & Aggarwal, 2012) ou les métallothionéines (Cicatelli *et al.*, 2010). Enfin, pour des espèces végétales capables de former plusieurs types d'interactions mycorhiziennes comme le peuplier ou le saule, peu de données sont disponibles. Dans la plupart des cas, seule l'interaction avec une espèce endomycorhizienne (Todeschini *et al.*, 2007 ; Lingua *et al.*, 2008 ; Cicatelli *et al.*, 2010) ou ectomycorhizienne (Sell *et al.*, 2005 ; Langer *et al.*, 2012) a été étudiée. Seule l'équipe de Mrnka *et al.* (2011) a testé l'apport d'une mycorhization par des champignons endo- (*G. intraradices/claroideum*) et ectomycorhiziens (*H. mesophaeum*, *P. involutus*) sur le potentiel de phytoremédiation du peuplier (*P. nigra*) et du saule (*S. alba*). Une diminution de la translocation des ETM vers les parties aériennes a été observée principalement due à la présence d'*Hebeloma mesophaeum*.

Tous ces résultats indiquent qu'il existe une variation interspécifique dans la capacité des champignons à réduire la sensibilité de la plante hôte. Dans la plupart des cas, les champignons améliorent la tolérance de leur symbiote vis-à-vis du métal considéré. Cependant, l'amélioration de la tolérance de leurs symbiotes dépend, entre autres, de l'espèce fongique considérée, de la combinaison d'ETM présents dans le sol et aussi de l'apport de fertilisants. De plus, les champignons diminuent la quantité d'ETM transférés dans les parties aériennes de la plante dans la plupart des cas. Si cette diminution réduit la quantité d'ETM accumulée en dessous des seuils autorisés, la biomasse produite peut alors être récoltée et exploitée sans représenter un danger pour la population. En revanche, dans quelques cas, le transfert des ETM vers les parties aériennes est augmenté. Il est donc important d'étudier la combinaison métal-plante-champignon influencée par les conditions du sol et le ou les mécanismes de tolérance mis en place, afin d'obtenir un couple champignon mycorhizien-plante performant en terme de phytostabilisation.

3.2.3. Association des plantes avec des bactéries

Certaines bactéries rhizosphériques peuvent participer à la phytostabilisation en améliorant la croissance et la tolérance aux ETM des plantes. Les bactéries permettant d'améliorer la croissance de la plante sont appelées PGPR pour « *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* ». Les PGPR peuvent participer à la phytostabilisation soit en améliorant la croissance de la plante, soit en diminuant la biodisponibilité des ETM, réduisant ainsi leur toxicité pour la plante. L'effet positif des PGPR sur la croissance végétale est dû à divers mécanismes : i) production de phytohormones ; ii) mobilisation d'éléments essentiels (P, N...) ; iii) protection contre les pathogènes par production d'antibiotiques ou d'antifongiques (Ma *et al.*, 2011).

Par exemple, il a été montré qu'une bactérie du genre *Serratia* améliore la croissance et la tolérance de *Lupinus luteus* sur un substrat contaminé par de l'arsenic, du cuivre, du plomb ou du zinc. De plus, les plants inoculés accumulent moins ces éléments dans leurs parties aériennes ou leurs racines (El Aafi *et al.*, 2012). De même, une bactérie appartenant au genre *Brevibacillus* améliore la croissance et la tolérance du trèfle blanc (*Trifolium repens*) sur un substrat contaminé par du zinc. Cette stimulation de la croissance végétale semble liée à la production d'acide indole-3-acétique (AIA), une phytohormone impliquée dans la division et l'élongation cellulaires (Vivas *et al.*, 2006). Certaines bactéries sont également capables d'apporter à la plante des nutriments essentiels, comme les bactéries fixatrices d'azote atmosphérique des genres *Rhizobium* (association avec les Fabacées) ou *Frankia* (association avec les plantes actinorhiziennes). Notamment, l'association de bactéries du genre *Frankia* avec l'aulne permet de l'aider à s'établir dans des environnements perturbés (Roy *et al.*, 2007).

Dans certains cas, l'effet des PGPR sur l'amélioration du potentiel de phytostabilisation de la plante est dû à une association tripartite. En effet, certaines bactéries peuvent avoir une interaction positive avec la symbiose mycorhizienne, soit en aidant l'établissement de la symbiose, soit en interagissant positivement avec le symbiote fongique déjà établi. Ces bactéries sont alors appelées MHB pour « *Mycorrhiza Helper Bacteria* » (Frey-Klett *et al.*, 2007). Dans le cas d'une symbiose ectomycorhizienne entre le pin sylvestre et *Amanita rubescens* ou *Hebeloma sinapizans*, l'inoculation avec des MHB, *Bacillus cereus* ou *Pseudomonas putida*, améliore la tolérance et la croissance des plantes en présence de cadmium. De plus, une diminution de l'accumulation du cadmium dans les parties aériennes est observée chez les plants ectomycorhizés (environ - 30 %) et cette diminution est plus importante lorsque les bactéries sont co-inoculées (environ - 50 %) (Kozdroj *et al.*, 2007). Un effet similaire sur l'accumulation de zinc dans les racines a été observé dans le cadre d'une association tripartite entre la plante *Trifolium repens*, le champignon ectomycorhizien *G. mosseae* et la bactérie *Brevibacillus* sp. (Vivas *et al.*, 2006).

Cependant, tout comme dans les associations plantes-champignons mycorhiziens ou endophytes, l'effet de l'inoculation de plants mycorhizés ou non par des bactéries sur l'accumulation des ETM dans les parties aériennes est souche fongique-, souche bactérienne- et élément-dépendant. Par exemple, une étude portant sur l'interaction entre le saule (*S. viminalis*), le champignon ectomycorhizien *H. mesophaeum* et quatre souches de *B. cereus* (B1, B2, B3 et B4) sur un substrat contaminé par du zinc et du cadmium a montré des différences d'accumulation dans les parties aériennes selon les différentes combinaisons testées. Ainsi, la souche B1 inoculée seule permet de réduire de 30 % l'accumulation de cadmium alors qu'une augmentation de 20 % est observée lorsqu'elle est associée au champignon. Un effet similaire a été observé avec B2 pour le zinc. En revanche, dans le cas d'une co-inoculation avec B3 ou B4 et le champignon,

l'effet observé avec la bactérie seule est accentué en présence d' *H. mesophaeum*. Par exemple avec B3 seule, une diminution de - 5 % et une augmentation de + 25 % d'accumulation du zinc sont observées, passant respectivement à - 40 % et + 30 % en présence du champignon (Hrynkiewicz *et al.*, 2012).

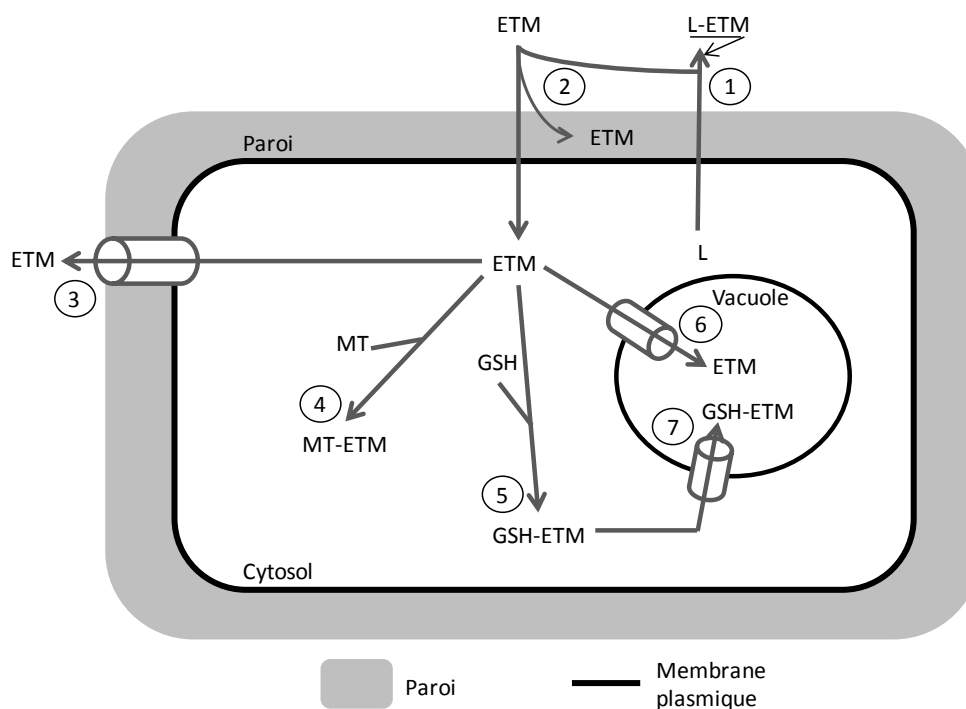


Figure 15 : Principaux mécanismes de résistance des champignons aux éléments traces métalliques (ETM) (d'après Bellion *et al.*, 2006). L : Ligand ; MT : MétalloThionéine ; GSH : glutathion.

1 : précipitation extracellulaire par un ligand sécrété ; 2 : biosorption à la paroi ; 3 : efflux ; 4 : complexation par des métallothionéines ; 5 : complexation par du glutathion ; 6 : compartimentation vacuolaire ; 7 : compartimentation vacuolaire du complexe glutathion/ETM.

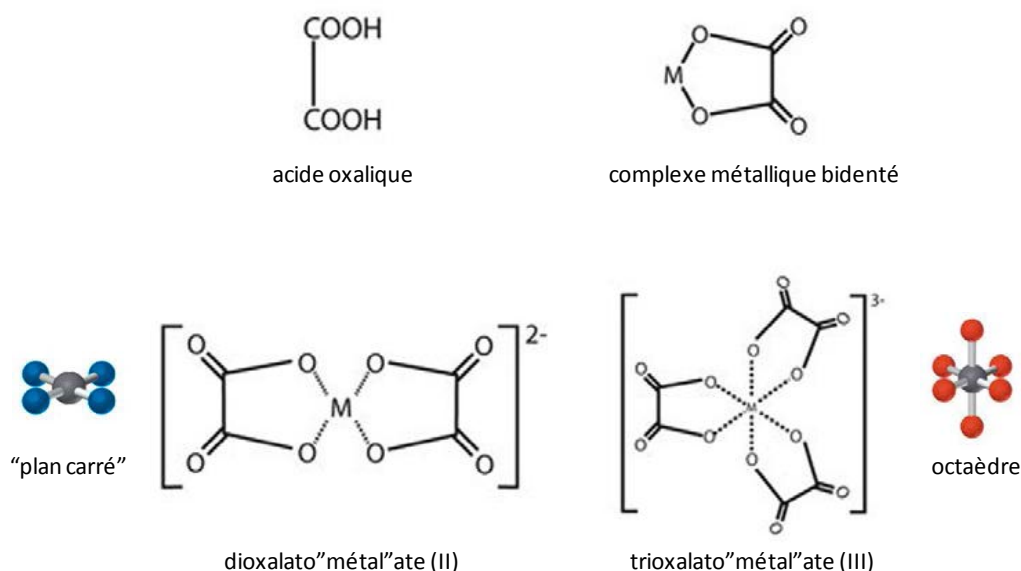


Figure 16 : Exemples de complexes formés entre un ETM et l'acide oxalique (d'après Gadd *et al.*, 2012). Un complexe est dit bidenté lorsque le ligand lie l'ETM par deux liaisons, dans le cas de l'acide oxalique, il y a deux liaisons avec les atomes d'O. Le préfixe di- ou tri- fait référence au nombre de molécules ligantes d'oxalate impliquées dans le complexe ; la charge ionique du complexe est précisée entre parenthèses. Les ETM divalents comme le cuivre forment des complexes anioniques de coordination 4 (= nombre d'atomes liés avec l'ETM) "plan carré" alors que les ETM trivalents comme l'aluminium, le fer ou le chrome forment des complexes anioniques de coordination 6 octaédrique.

4. Mécanismes de résistance et tolérance des champignons aux ETM

Les différents mécanismes de tolérance et résistance aux ETM mis en place par les champignons peuvent permettre l'amélioration du potentiel de phytostabilisation de leur plante hôte. Ces mécanismes sont souvent communs avec ceux mis en place par les plantes pour se protéger de la toxicité des ETM (Hall, 2002 ; Bellion *et al.*, 2006 ; Göhre & Paszkowski, 2006). Ce mémoire traitant principalement de l'apport des champignons mycorhiziens et endophytes à la phytostabilisation, nous utiliserons la cellule fongique comme modèle.

La figure 15 décrit ces différents mécanismes de résistance et tolérance mis en place. La résistance peut se faire par le biais d'une sécrétion d'agents chélateurs ou complexants, qui fixent les ETM dans le sol à proximité de l'hyphe (Figure 15 ①). Certains champignons lient les ETM à leur paroi fongique par biosorption aspécifique (Figure 15 ②) alors que chez d'autres, les ETM passent outre la paroi mais sont bloqués par la membrane plasmique qui joue un rôle de barrière sélective. Il existe également des stratégies faisant intervenir des transporteurs d'ETM spécifiques et non spécifiques ainsi que des pores permettant à ces ETM de traverser la membrane plasmique et d'entrer dans la cellule fongique. Une fois dans le cytosol, les éléments métalliques sont soit complexés par des métallothionéines ou du glutathion par exemple (Figure 15 ④,⑤), soit exportés hors de la cellule fongique via des transporteurs spécifiques ou non spécifiques, actifs ou passifs (Figure 15 ③). D'autres méthodes de tolérance telles que la séquestration des ETM dans la vacuole de la cellule sont possibles (Figure 15 ⑥,⑦). Plusieurs de ces mécanismes interviennent souvent simultanément et peuvent se cumuler afin d'accroître la tolérance.

4.1. Précipitation extracellulaire des ETM

Un des principaux mécanismes permettant la tolérance aux ETM des cellules implique l'excrétion d'acides organiques, en particulier des acides di- et tricarboxyliques de faible poids moléculaire (Bellion *et al.*, 2006). Il a notamment été montré qu'en présence d'aluminium, le champignon endomycorhizien *Glomus clarum* excréta du citrate et du malate permettant de complexer jusqu'à 99 % de l'aluminium disponible et ainsi protégeait son hôte, *Liriodendron tulipifera* (Klugh & Cumming, 2007). L'oxalate est l'un des acides organiques le plus souvent excrété pour complexer les ETM dont l'action complexante est illustrée dans la figure 16. En effet, il a été reporté qu'en cas de stress au plomb ou au cadmium, l'excrétion d'oxalate de plants de pins mycorhizés par plusieurs souches différentes de champignons ectomycorhiziens était augmentée de 15 à 45 % en fonction de la souche étudiée (Johansson *et al.*, 2008), le même effet a été reporté pour d'autres souches ectomycorhiziennes en présence d'aluminium (Ahonen-Jonnarth *et al.*, 2000).

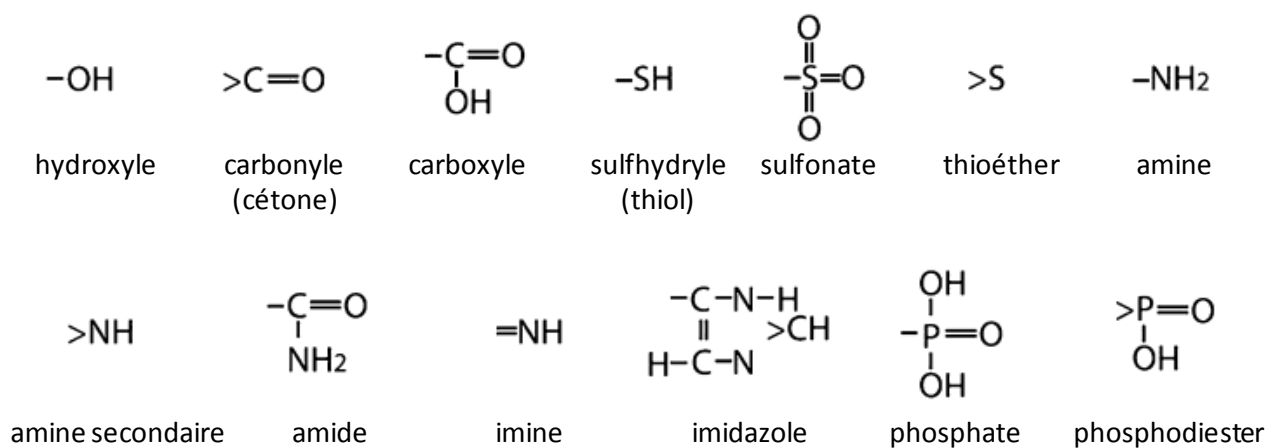


Figure 17 : Principaux groupements fonctionnels de la paroi, capables de se lier aux ETM, impliqués dans la biosorption des ETM (d'après Gadd *et al.*, 2012)

En revanche, toutes les espèces de champignons n'adoptent pas la même stratégie. Par exemple, lors de l'expérience d'Ahonen-Jonnarth *et al.* (2000), *Paxillus involutus* ne sécrétait pas d'oxalate en présence d'aluminium. De même, des plants d'eucalyptus mycorhizés par *Pisolithus tinctorius*, un champignon ectomycorhizien, excrétaient peu d'oxalate dans le milieu en présence de nickel au contraire des plants non mycorhizés (5 à 12 fois plus) ; la tolérance des plants étant pourtant largement améliorée par la présence du champignon (biomasse 20 à 30 fois plus importante) (Jourand *et al.*, 2010b).

Dans certains cas, les acides organiques peuvent mobiliser des ETM sous forme insoluble. Par exemple, le champignon éricoïde *Oidiodendron maius* est capable de solubiliser l'oxyde de zinc (ZnO) et le phosphate de zinc ($Zn_3(PO_4)_2$), insolubles dans la solution du sol, en excréant du malate et du citrate (Martino *et al.*, 2003). En revanche, les souches isolées de sites pollués au zinc ont montré une faible capacité à mobiliser le zinc insoluble par rapport à celles isolées de sites non contaminés, ce qui pourrait refléter des stratégies spécifiques de maintien de l'homéostasie des métaux essentiels chez ces isolats (Martino *et al.*, 2003).

4.2. Fixation des ETM à la paroi fongique

La paroi cellulaire est le premier site d'interaction entre les métaux et la cellule fongique. Les interactions physico-chimiques (échange ionique, adsorption, complexation, précipitation et cristallisation) responsables de l'association des ETM aux parois cellulaires portent le nom de biosorption. La paroi des champignons est composée de polymères comprenant des glucanes, de la chitine et des polymères de galactosamines ainsi que quelques protéines. Elle possède donc un grand nombre de sites de liaison potentiels pour les métaux tels que des groupes carboxyles, amines, hydroxyles, phosphates et thiols (Figure 17) et agit ainsi en tant que première barrière contrôlant l'absorption d'espèces potentiellement toxiques pour la cellule (Gadd, 1993 ; Gadd *et al.*, 2012).

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la biosorption sur la paroi du cadmium a pu être mise en évidence par microscopie électronique à transmission ou à balayage et analysée par spectroscopie à énergie dispersive. Certaines souches résistantes aux métaux présentent souvent un épaississement de leur paroi corrélé positivement à leur capacité d'adsorption du cadmium (Park *et al.*, 2003).

Chez un champignon ectomycorhizien comme *Paxillus involutus*, il a notamment été montré que le cadmium absorbé est à 50 % environ adsorbé à la paroi (Blaudez *et al.*, 2000a). Chez *Suillus luteus*, une expérience de localisation du fer, du plomb et du zinc a permis de mettre en évidence que ces éléments sont présents principalement au niveau de la paroi du mycélium extramatriciel et du manteau (Turnau *et al.*, 2001 ; Turnau *et al.*, 2002).

Les champignons endomycorhiziens sont également capables de fixer les ETM au niveau de leur paroi. Par exemple, *Glomus mosseae* présente une forte capacité de biosorption du cadmium, cuivre et zinc

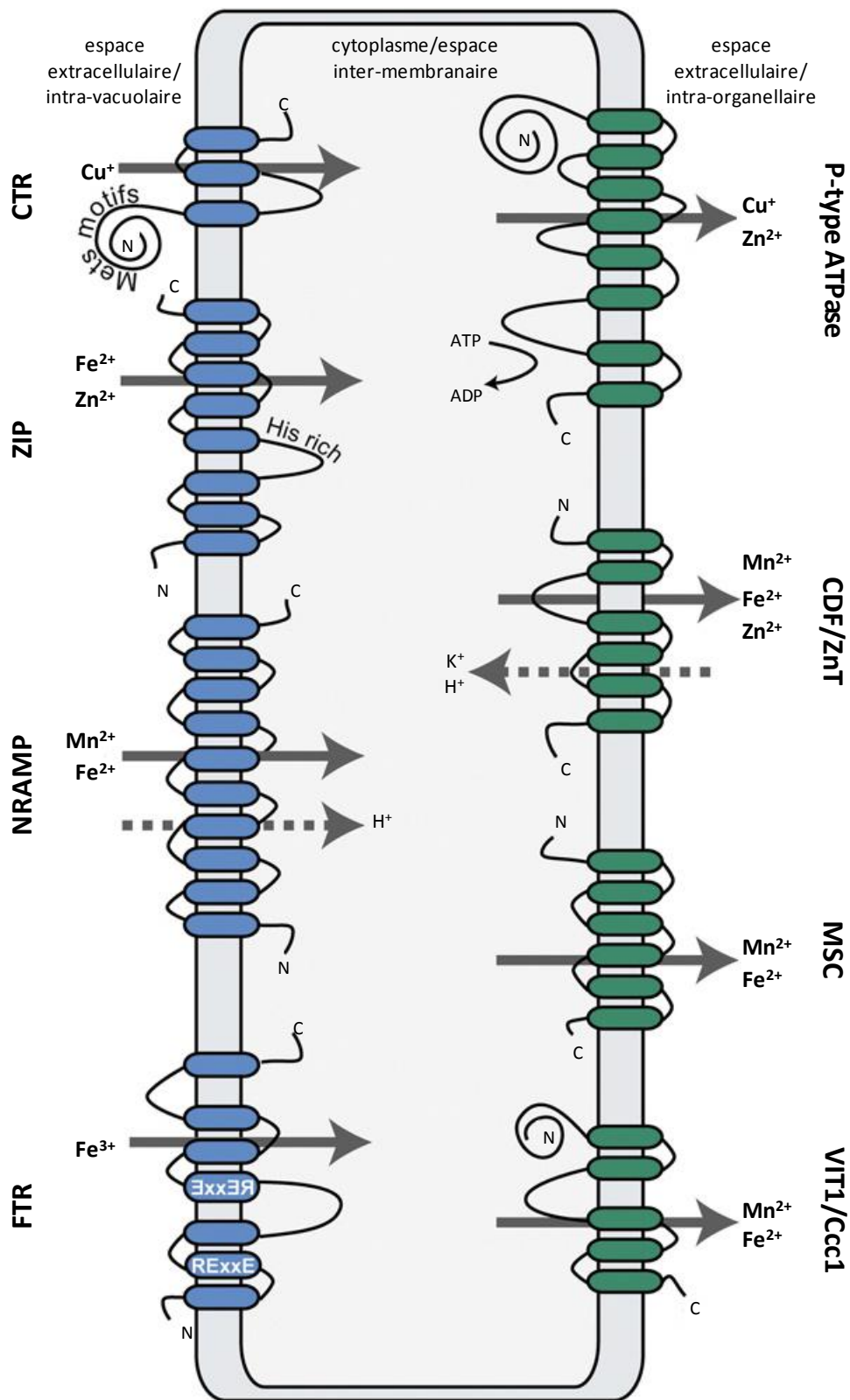


Figure 18 : Différentes familles de transporteurs d'ETM chez les eucaryotes (d'après Blaby-Haas & Merchant, 2012). La topologie prédite des domaines transmembranaires et les principaux métaux essentiels transportés sont présentés sur le schéma. Les flèches représentent la direction du flux d'ETM, qui est principalement vers le cytoplasme pour les transporteurs en bleu, et vers l'espace extracellulaire ou les organelles intracellulaires pour les transporteurs en vert.

FTR : *Fe TR*ansporter ; NRAMP : *Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins* ; ZIP : *Zrt-Irt like Proteins* ; CTR : *Cu TR*ansporter ; VIT1/Ccc1 : *Vacuolar Iron Transporter 1/Ca(II)-sensitive Cross-Complement 1* ; MSC : *Mitochondrial Solute Carrier* ; CDF/ZnT : *Cation Diffusion Facilitator/Zn Transporter*.

au niveau du mycélium extramatriciel, encore améliorée lorsque la souche utilisée est tolérante aux ETM (Joner *et al.*, 2000 ; Gonzalez-Chavez *et al.*, 2002). Cet effet serait dû à la présence sur la paroi fongique d'une glycoprotéine, la glomaline. La glomaline a été découverte en 1996 et définie comme une protéine excrétée permettant l'agrégation et la stabilisation du sol (Wright *et al.*, 1996) et sera plus tard renommée « protéines du sol associées à la glomaline » (PSAG) (Rillig, 2004). Plusieurs études plus récentes ont montré que cette protéine n'était pas ou peu excrétée (80 % de présence dans le mycélium) et liée principalement aux parois du mycélium extramatriciel et des spores (Driver *et al.*, 2005 ; Purin & Rillig, 2008). En présence de cuivre, le taux de PSAG est souvent corrélé négativement avec la quantité de cuivre disponible (Cornejo *et al.*, 2008) et positivement avec le pourcentage de colonisation des racines par le champignon (Bedini *et al.*, 2010) ce qui suggère une forte implication des PSAG dans la tolérance des champignons AM aux ETM (Ferrol *et al.*, 2009).

4.3. Absorption cellulaire des ETM

Certains ETM étant essentiels et pouvant servir de cofacteurs d'enzymes, la cellule fongique doit posséder un système de transporteurs permettant l'absorption de ces éléments. Chez les eucaryotes, il existe quatre familles de transporteurs permettant l'influx des ETM du milieu extérieur ou des organites intracellulaires vers le cytoplasme : la famille ZIP (*Zrt-Irt like Proteins*) ; la famille NRAMP (*Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins*) ; la famille FTR (*Fe TRansporter*), spécifiquement impliquée dans le transport du fer et la famille CTR (*Cu TRansporter*), spécifiquement impliquée dans le transport du cuivre (Figure 18) (Blaby-Haas & Merchant, 2012). Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à la famille de transporteurs ZIP, largement impliquée dans l'absorption des ETM chez les champignons, c'est donc cette dernière qui sera plus particulièrement décrite ci-après.

Les membres de la famille ZIP sont principalement impliqués dans le transport du zinc, du fer, du manganèse et du cadmium et ont été très bien décrits chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Figure 19) (Rutherford & Bird, 2004 ; Eide, 2006) mais très peu chez les autres champignons. Ces transporteurs se différencient principalement par leur spectre et leur spécificité de substrat (Guerinot, 2000). Les transporteurs de la famille ZIP regroupent les homologues de ScZRT1 et ScZRT2 (*Zinc-Regulated Transporter*) qui sont respectivement des transporteurs de zinc à forte et à faible affinité chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Zhao & Eide, 1996a ; Zhao & Eide, 1996b) et les homologues de AtIRT1 (*Iron-Regulated Transporter*) qui est un transporteur de cations exprimé dans les racines de plantes (*Arabidopsis thaliana*) carencées en fer (Eide *et al.*, 1996). Il a été démontré que ces protéines transportaient le zinc et/ou d'autres ions métalliques depuis l'espace extracellulaire ou les organites intracellulaires vers le cytoplasme. Chez *S. cerevisiae*, il a été mis en évidence que ScZRT1 et ScZRT2 étaient des transporteurs de zinc au niveau de la

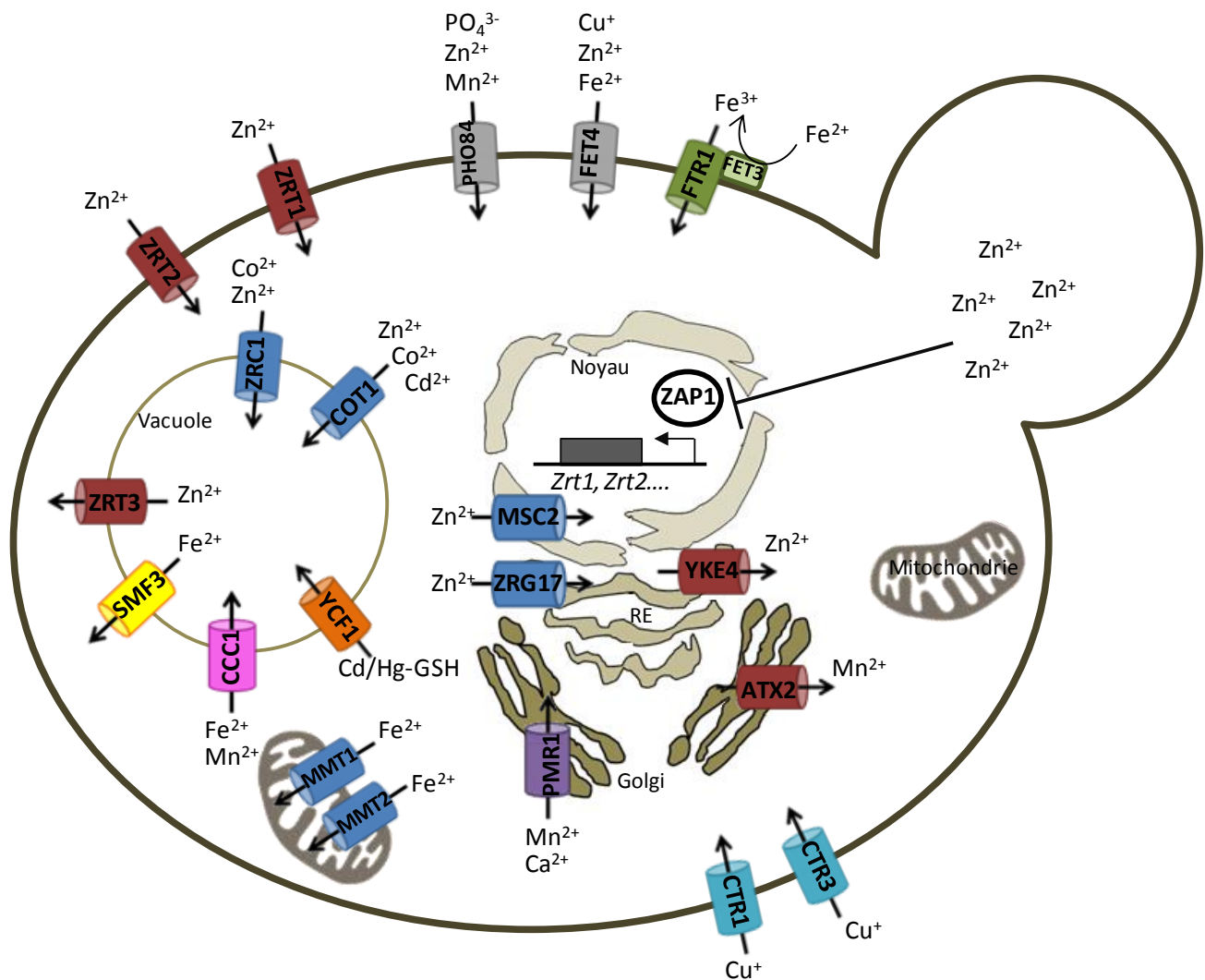


Figure 19 : Principaux transporteurs impliqués dans l'homéostasie métallique chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (d'après Eide, 2006 ; Rutherford & Bird, 2004). Sont représentés ici en rouge : les transporteurs de la famille ZIP ; en bleu foncé : les transporteurs de la famille CDF ; en jaune : les transporteurs de la famille NRAMP ; en turquoise : les transporteurs de la famille CTR ; en vert : les transporteurs de la famille FTR ; en violet : les transporteurs de la famille P-type ATPase ; en rose : les transporteurs de la famille VIT ; en orange : les transporteurs de la famille ABC ; en gris : les transporteurs d'autres familles de gènes. Les principaux éléments transportés sont précisés sur la figure.

membrane plasmique (MacDiarmid *et al.*, 2000). Chez *Aspergillus fumigatus*, deux homologues de ScZRT1 et ScZRT2, AfZRFA et AfZRFB, ont été identifiés avec un rôle biologique équivalent en milieu acide (Vicentefranqueira *et al.*, 2005). Un troisième transporteur impliqué dans l'absorption du zinc en milieu neutre ou alcalin proche des ScZRT a été identifié chez *A. fumigatus* : AfZRFC (Figure 20) (Amich *et al.*, 2010). Deux autres homologues de ScZRT1 et ScZRT2 ont été trouvés chez *Neurospora crassa* : NcTZN1 et NcTZN2 (Kiranmayi *et al.*, 2009). Un homologue de ScZRT1 ayant le même rôle biologique a également été identifié chez *Schizosaccharomyces pombe* : SpZRT1 (Dainty *et al.*, 2008). La levure possède trois autres transporteurs apparentés à la famille ZIP : ScZRT3 qui transporte le zinc de la vacuole vers le cytoplasme (MacDiarmid *et al.*, 2000) et ScYKE4 qui exporte le zinc depuis le réticulum endoplasmique (Kumànovics *et al.*, 2006). ScATX2 est quant à lui impliqué dans l'homéostasie du manganèse (Lin & Culotta, 1996).

En cas de fortes concentrations des ETM dans le domaine extracellulaire, des mécanismes de limitation de l'absorption des éléments sont mis en place. Par exemple chez la levure, le gène Zap1 code une protéine de 93 kDa, ZAP1, (*Zinc-responsive Activator Protein*) responsable de la régulation transcriptionnelle de près de 80 gènes impliqués dans l'homéostasie du zinc (Zhao & Eide, 1997 ; Eide, 2009). ZAP1 est un activateur de transcription, actif en cas de carence en zinc dans la cellule, qui reconnaît spécifiquement les motifs ZRE (*Zinc Responsive Elements*) de ses gènes cibles (Zhao *et al.*, 1998). En cas d'excès de zinc, ZAP1 est également capable de réprimer l'expression des gènes codant ZRT1 et ZRT2, limitant ainsi la production de ces transporteurs et par conséquent l'entrée de zinc dans les cellules (Eide, 2003). Ce facteur de transcription est autorégulé par le zinc intracellulaire grâce à deux domaines de liaison au zinc AD1 et AD2 (*Activation Domain*) (Frey & Eide, 2011). Un facteur de transcription ayant le même rôle que ScZAP1 a été identifié chez *Aspergillus fumigatus*, AfZAFA (Moreno *et al.*, 2007).

Chez la levure, l'absorption du zinc est également régulée au niveau post-traductionnel. En effet, en cas d'excès de zinc, un signal induit l'endocytose puis la dégradation dans la vacuole des transporteurs ScZRT1 et ScZRT2 (Gitan *et al.*, 1998). En fait, un motif particulier des transporteurs ScZRT, situé dans le cytoplasme entre les domaines transmembranaires III et IV, est reconnu (Gitan *et al.*, 2003) et sert de site de fixation à l'ubiquitine, une protéine responsable de la dégradation par endocytose des protéines (Figure 21) (Gitan & Eide, 2000).

4.4. Complexation intracellulaire des ETM

Malgré les mécanismes de régulation de la quantité d'ETM présents dans le cytoplasme cités ci-dessus, les ETM peuvent être présents en grande quantité dans la cellule. Une solution pour détoxifier les cellules est alors la chélation des ETM à l'aide de ligands. Chez les champignons, il a été mis en évidence que les métallothionéines, le glutathion et dans une moindre mesure les phytochélatines pouvaient jouer ce rôle

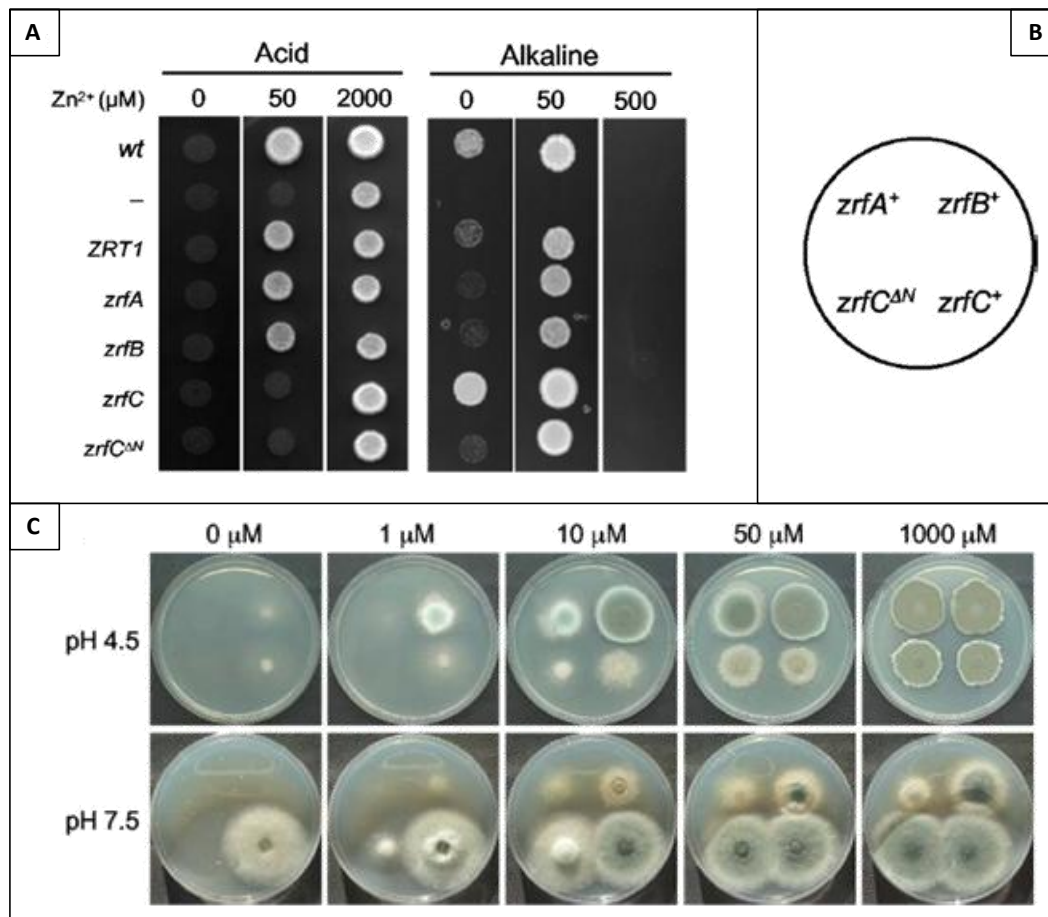


Figure 20 : Caractérisation des gènes *ZrfA*, *ZrfB* et *ZrfC* d'*Aspergillus fumigatus* par complémentation fonctionnelle en levures (A) et chez le champignon (C) (d'après Amich *et al.*, 2010).

A : Test de complémentation de la levure mutante *Zhy3* (délétée des gènes *ScZrt1* et *ScZrt2*) déficiente en absorption du zinc (-), exprimant un gène d'*A. fumigatus*, *AfZrfA* (*zrfA*), *AfZrfB* (*zrfB*), *AfZrfC* (*zrfC*) ou *AfZrfC* délété de son extrémité N-ter (*zrfC*^{ΔN}), ou exprimant le gène *ScZrt1* (*ZRT1*) ; ou de la levure sauvage (*wt*) transformée avec un plasmide vide. La souche - sert de témoin négatif alors que les souches *wt* et *ZRT1* servent de témoins positifs. Des gouttes contenant 10⁴ cellules de levures ont été déposées sur un milieu pauvre en zinc à pH 4,4 (acid) ou 7,5 (alkaline) supplémenté de zinc aux concentrations indiquées. A pH acide, l'expression des gènes *AfZrfA* et B restaurent la croissance de la souche mutante. A pH alcalin, l'expression du gène *AfZrfC* restaure la croissance de la souche mutante ; la suppression de l'extrémité N-terminale de la protéine *AfZrfC* supprime cette fonction.

B : Plan des boîtes de Pétri utilisées pour le test de complémentation de la souche AF2511 d'*A. fumigatus*, déficiente en absorption du zinc. *zrfA*⁺ : souche mutante exprimant le gène *AfZrfA* ; *zrfB*⁺ : souche mutante exprimant le gène *AfZrfB* ; *zrfC*⁺ : souche mutante exprimant le gène *AfZrfC* ; *zrfC*^{ΔN} : souche mutante exprimant le gène *AfZrfC* délété de son extrémité N-ter.

C : Test de complémentation de la souche AF2511 d'*A. fumigatus*, déficiente en absorption du zinc. Des implants fongiques ont été déposés sur un milieu de culture pauvre en zinc à pH 4,5 ou 7,5 supplémenté de zinc aux concentrations indiquées. A pH acide, l'expression des gènes *AfZrfA* et B restaurent la croissance de la souche mutante. A pH alcalin, l'expression du gène *AfZrfC* restaure la croissance de la souche mutante ; la suppression de l'extrémité N-terminale de la protéine *AfZrfC* supprime cette fonction.

(Bellion *et al.*, 2006). Chez les plantes, ces trois molécules sont également largement impliquées dans la tolérance aux ETM (Yadav, 2010).

Les métallothionéines (MTs) furent découvertes en 1957 à partir de l'isolement du cortex d'un rein de cheval présentant une petite protéine à forte teneur en cadmium (Margoshes & Vallee, 1957). Elle fut nommée « métallothionéine » en raison de son importante concentration en métaux et d'une protéine riche en soufre : la thionéine. Ce sont de petites protéines (30 à 70 acides aminés), riches en cystéine (environ 30 %), ne formant pas de ponts disulfures (Figure 22 (A)). Les métallothionéines sont capables de complexer plusieurs ETM différents comme par exemple le cadmium et le cuivre chez *Paxillus involutus* ou *Hebeloma cylindrosporum* (Bellion *et al.*, 2007 ; Ramesh *et al.*, 2009), l'argent chez *Amanita muscaria* (Osobova *et al.*, 2011) et le cuivre chez *Glomus intraradices* (Gonzalez-Guerrero *et al.*, 2007). Ces protéines sont codées par des gènes spécifiques et peuvent être régulées différemment par les ETM en fonction de l'isoforme produite (Osobova *et al.*, 2011).

Le glutathion (GSH) est un tri-peptide contenant une cystéine, responsable de son activité biologique et est synthétisé par voie enzymatique (Figure 22 (B)). La nature nucléophile du groupement SH porté par la cystéine lui permet également de complexer les ions métalliques. Le pouvoir complexant du glutathion a notamment été mis en évidence chez le champignon ectomycorhizien *Paxillus involutus*, dont la production de glutathion est stimulée en cas de stress induit par les ETM comme le cadmium (Courbot *et al.*, 2004 ; Hegedus *et al.*, 2007). Le rôle du glutathion comme un chélateur d'ETM chez les champignons est désormais clairement établi (Pocsi *et al.*, 2004). De plus, il a été montré que la transcription du gène codant l'enzyme impliquée dans la synthèse du glutathion, la glutathion S-transférase est stimulée lorsque le taux d'ETM extracellulaire (Cd, Cu et Zn) augmente chez le champignon endomycorhizien *G. intraradices* (Waschke *et al.*, 2006).

Les phytochélatines (PC) constituent une famille de petits peptides riches en cystéines capables de fixer les ions métalliques via leurs groupes SH. Les phytochélatines sont constituées de plusieurs dipeptides de glutamate et cystéine répétés *n* fois (généralement *n* = 2 à 5 mais pouvant aller jusqu'à 11) et suivis d'un résidu glycine terminal (Figure 22 (C)) (Pal & Rai, 2010). Les phytochélatines sont synthétisées de façon enzymatique, par la phytochélatine synthase, à partir de γ -glutamylcystéine qui est un composé intermédiaire de la voie de biosynthèse du glutathion. Les phytochélatines se retrouvent principalement chez les plantes et les algues, mais quelques espèces de champignons en possèdent. Par exemple, des phytochélatines ont été identifiées chez des levures comme *Schizosaccharomyces pombe* (Clemens & Simm, 2003) ou *Candida glabrata* (Zhou & Goldsbrough, 1994) ou chez des champignons ectomycorhiziens comme *Boletus edulis* (Collin-Hansen *et al.*, 2007) ou *Tuber melanosporum* (Bolchi *et al.*, 2011).

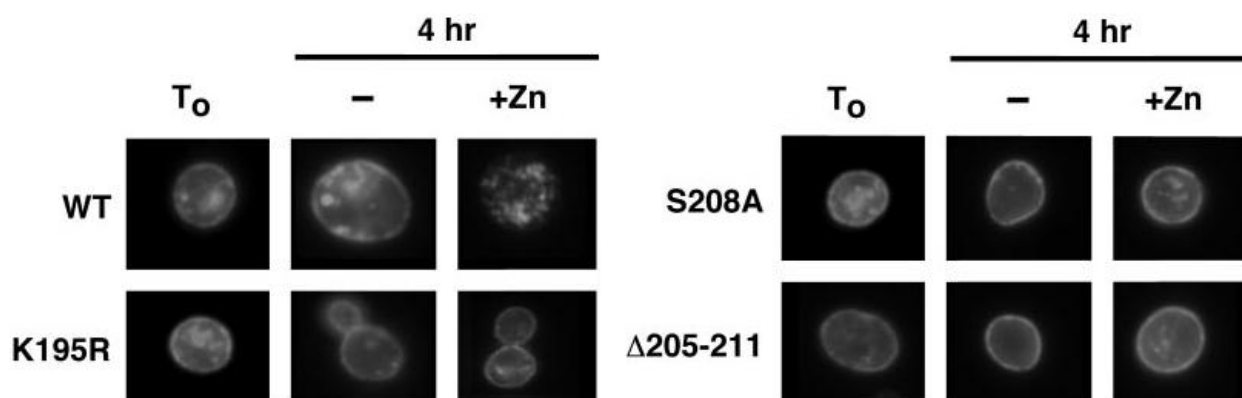


Figure 21 : Localisation par immunofluorescence de protéines ScZRT1 sauvages (WT) et mutantes (K195R, S208A et $\Delta 205-211$) (Gitan *et al.*, 2003). La souche de levure mutante Zhy3 exprimant les gènes ScZrt1 sauvage ou mutants ont été cultivées dans un milieu pauvre en zinc (T_0) puis transférées et cultivées pendant 4 heures dans un milieu pauvre en zinc (-) ou supplémenté de 2 mM de zinc (+). Les cellules ont ensuite été récoltées et analysées par immunofluorescence indirecte. La protéine ScZRT1 est localisée à la membrane plasmique en absence de zinc et présente dans de petites vésicules d'endocytose en présence de zinc dans le milieu. La mutation de la lysine en position 195 ou de la sérine en position 208, ou la délétion des acides aminés 205-211 empêchent la dégradation de la protéine ScZRT1 ; ces acides aminés situés entre les domaines transmembranaires III et IV sont certainement impliqués dans le signal d'ubiquitination.

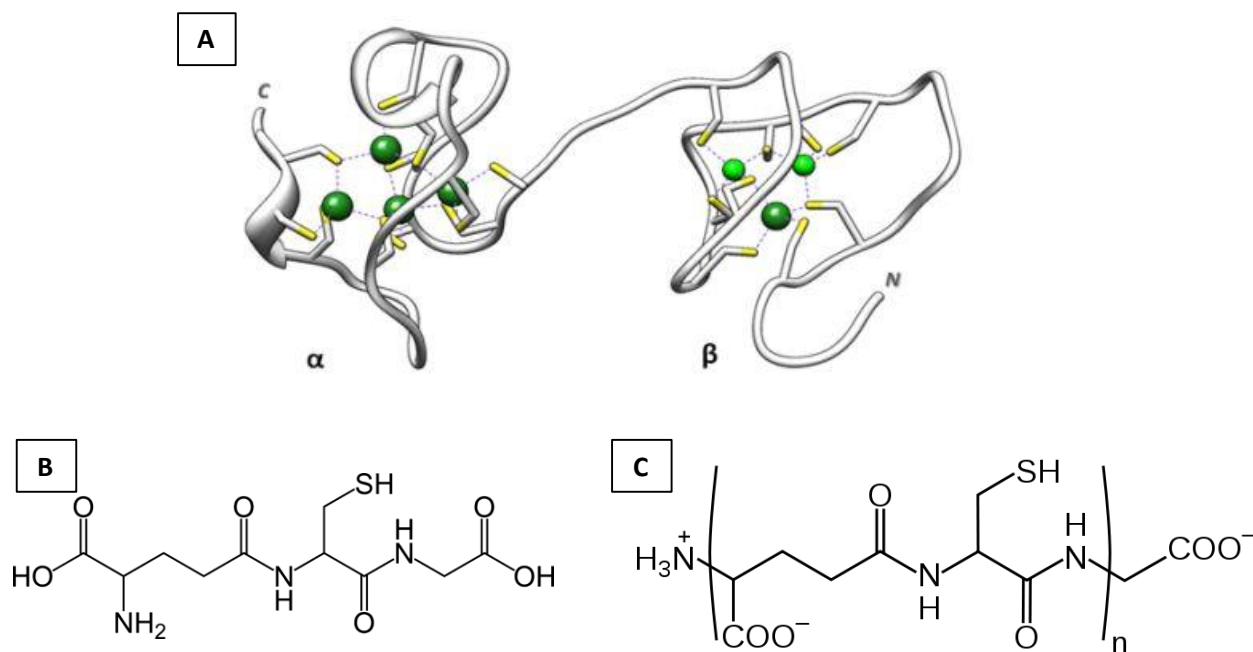


Figure 22 : Principales molécules impliquées dans la complexation intracellulaire des ETM.

A : exemple de métallothionéine, les cystéines apparaissent en jaune et les ETM complexés en vert¹² ;

B : molécule de glutathion (auteur : NEUROtiker) ;

C : structure d'une phytochélatine, n = 2 à 11 (auteur : Fvasconcellos).

¹² http://www.protein.pl/?name=molecular_mechanisms_of_zinc_homeostasis

4.5. Séquestration dans les organites intracellulaires

Les ETM présents dans le cytoplasme en quantité toxiques pour la cellule peuvent également être expulsés de la cellule ou internalisés dans les organites intracellulaires où ils ne pourront plus exercer leur effet toxique. Chez les eucaryotes, il existe quatre familles de transporteurs permettant l'efflux des ETM libres du cytoplasme vers les organites intracellulaires ou l'extérieur : la famille CDF (*Cation Diffusion Facilitator*) largement impliquée dans la tolérance aux ETM et les familles P-type ATPase, VIT1/Ccc1 (*Vacuolar Iron Transporter 1/Ca(II)-sensitive Cross-Complementer 1*) et MSC (*Mitochondrial Solute Carrier*), peu représentées (Figure 18) (Blaby-Haas & Merchant, 2012). Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à la famille de transporteurs CDF, largement impliquée dans la tolérance aux ETM chez les champignons et notamment impliquée dans la séquestration vacuolaire des ETM.

Les protéines CDFs, présentes chez les bactéries, les champignons, les plantes et les mammifères, ont été découvertes en 1995 (Nies & Silver, 1995). Ce sont majoritairement des antiports $\text{Me}^{2+}/\text{H}^+$ (MacDiarmid *et al.*, 2002) catalysant l'efflux de cations métalliques tels que Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} ou Mn^{2+} , depuis le cytoplasme vers l'extérieur de la cellule ou vers les compartiments subcellulaires (Delhaize *et al.*, 2003 ; Hall & Williams, 2003). Chez la levure, *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) les transporteurs de cette famille : COT1, ZRC1, MSC2, ZRG17, MMT1 et MMT2 ont été caractérisés (Figure 19). Il apparaît que ScMMT1 et ScMMT2 sont des transporteurs mitochondriaux de fer (Li & Kaplan, 1997). ScMSC2 est un transporteur de zinc localisé au niveau du réticulum endoplasmique et du noyau (Li & Kaplan, 2001). ScZRG17 est également un transporteur de zinc localisé à la membrane du réticulum endoplasmique (Ellis *et al.*, 2005). ScCOT1 est un transporteur de cobalt, de zinc et de cadmium (Conklin *et al.*, 1992) alors que ScZRC1 transporte le zinc et le cobalt (Kamizono *et al.*, 1989) ; tous deux sont localisés au niveau de la membrane des vacuoles. Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, un transporteur de zinc, SpZHF1, impliqué dans la tolérance au zinc, localisé à la membrane du réticulum endoplasmique a également été identifié (Clemens *et al.*, 2002). Chez le champignon endomycorhizien *Glomus intraradices*, un transporteur de zinc, GintZNT1 a également été caractérisé (Gonzalez-Guerrero *et al.*, 2005). Récemment, des transporteurs de zinc, HcZNT1 et OmZNT1, localisés au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique ont été identifiés chez le champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum* et le champignon éricoïde *Oidiodendron maius*, et sont impliqués dans la tolérance au zinc (Blaudez & Chalot, 2011 ; Khouja *et al.*, 2013).

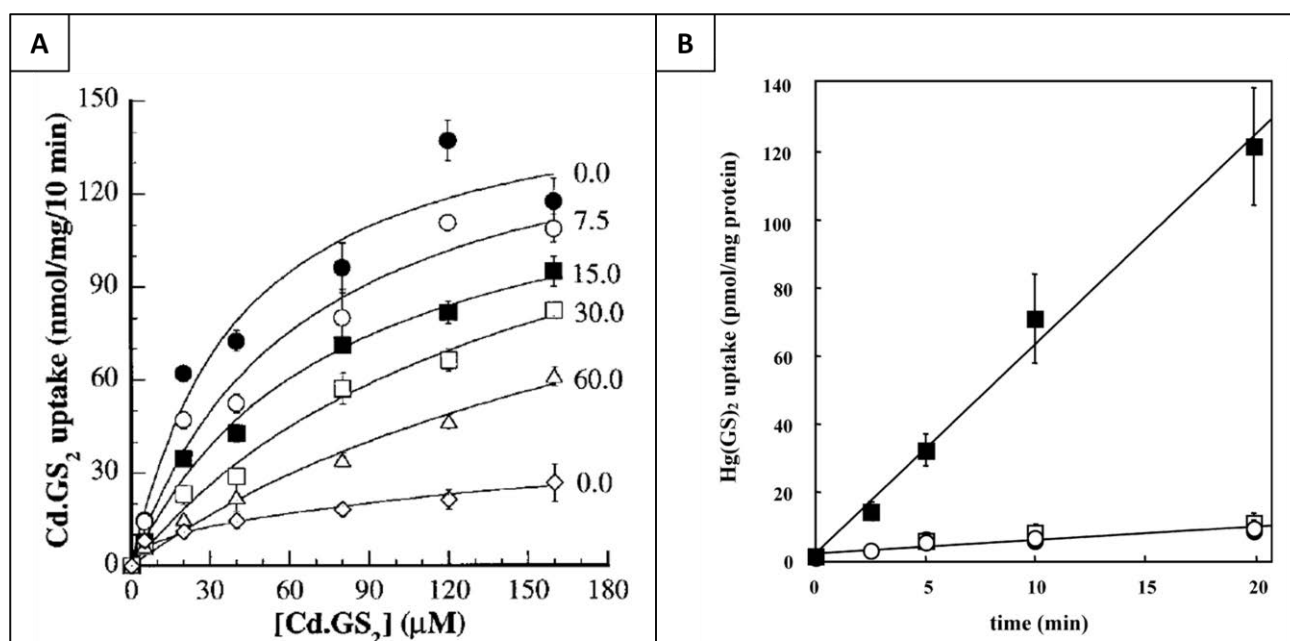


Figure 23 : Caractérisation des complexes glutathion-métal transportés par la protéine ScYCF1 (d'après Li *et al.*, 1997 (A) et Gueltry *et al.*, 2003 (B)).

A : Cinétique d'absorption du complexe Cd(GSH)₂ (Cd.GS₂) dans les membranes des vacuoles de la souche sauvage en présence de différentes concentrations de S-(2,4-dinitrophényle)glutathion (DNP-GS), de forme proche du complexe Cd(GSH)₂, à des concentrations de 0 (●) ; 7,5 (○) ; 15 (■) ; 30 (□) et 60 μM (Δ) ; et de la souche mutante délétée du gène ScYcf1 en absence de DNP-GS (◇). La protéine ScYCF1 est donc impliquée dans le transport du complexe Cd(GSH)₂ dans les vacuoles, et le DNP-GS emprunte la même voie de transport.

B : Cinétique d'absorption du complexe Hg(GSH)₂ dans une souche de levures mutante délétée du gène ScYcf1, exprimant le gène ScYcf1 (■, □) ou n'exprimant pas ce gène (●, ○), en présence (■, ●) ou en absence d'ATP (□, ○). La protéine ScYCF1 est donc impliquée dans le transport du complexe Hg(GSH)₂ dans les vacuoles et ce transport nécessite de l'ATP.

Une autre famille de transporteurs, la famille ABC (*ATP Binding Cassette*) est impliquée dans la séquestration des complexes glutathion-ETM ou phytochélatine-ETM dans les organites intracellulaires (Bellion *et al.*, 2006). Le transporteur HMT1 situé au niveau du tonoplaste est notamment impliqué dans l'accumulation dans la vacuole de complexes glutathion-cadmium ou phytochélatine-cadmium chez *Schizosaccharomyces pombe* (Ortiz *et al.*, 1992). Le gène Ycf1, quant à lui, code un transporteur responsable de la séquestration vacuolaire des complexes glutathion-cadmium (Li *et al.*, 1997) ainsi que glutathion-mercure (Gueldry *et al.*, 2003) chez *Saccharomyces cerevisiae* (Figure 19 et 23).

4.6. Autres mécanismes de tolérance

Les autres mécanismes de tolérance mis en place par les champignons ou les plantes ne sont pas spécifiques aux ETM, mais sont plutôt des mécanismes de réparation des dommages cellulaires. En effet, la plupart des ETM génèrent des ROS dans la cellule qui vont induire un stress oxydatif. Certaines enzymes produites par les champignons ou les plantes permettent alors d'éliminer les ROS comme les thiorédoxines, les superoxyde dismutases ou les catalases (Bellion *et al.*, 2006). Par exemple, les superoxydes dismutases (SOD) sont des métalloprotéines qui catalysent la dismutation de l'ion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et oxygène. Chez le champignon ectomycorhizien, *Paxillus involutus*, une Mn-SOD a été mise en évidence qui permet au champignon de résister à un stress au cadmium (Jacob *et al.*, 2001). De même, une Cu,Zn-SOD a été caractérisée chez le champignon éricoïde *Oidiodendron maius* dont la transcription est stimulée par un stress au zinc. Cette SOD serait exprimée dans le cytoplasme et également excrétée dans le milieu extracellulaire ce qui pourrait étendre le rôle protecteur de cette enzyme à la plante également (Vallino *et al.*, 2009).

D'autres molécules comme le glutathion ou les flavonoïdes ont également des propriétés antioxydantes. De plus, des protéines impliquées dans la réparation, ou la dégradation de protéines lorsqu'elles sont trop endommagées, les « *Heat Shock Proteins* » (HSP) permettent de contrer les effets délétères de nombreux stress dont le stress oxydatif sur les cellules (Hall, 2002).

4.7. Mécanismes de tolérance et résistance et phytostabilisation

Parmi les mécanismes de tolérance et résistance aux ETM décrits, certains peuvent participer activement à la phytostabilisation. En effet, la précipitation extracellulaire des ETM permet de limiter le transfert de ces éléments du sol vers d'autres compartiments, notamment hydriques et/ou végétaux. De plus, la capacité des champignons à fixer les ETM au niveau de leur paroi et/ou à absorber et séquestrer ces éléments dans leurs hyphes permet de limiter la fraction d'ETM biodisponible dans le sol pour la plante. Cependant, dans une optique de phytostabilisation, il est alors important que les champignons

endomycorhiziens ou endophytes ne favorisent pas le transfert des ETM du sol à la plante lors de leurs échanges trophiques.

Objectifs

La toxicité engendrée par les éléments traces métalliques (ETM) présents dans de nombreux sites pollués par les activités agricoles ou industrielles, présente un risque sanitaire important pour l'homme. Parmi les techniques de réhabilitation de sites pollués, la phytostabilisation, assistée ou non par des champignons, constitue une alternative « douce » et « verte » aux objectifs de gestion d'un site pollué dans le cas où la durée de traitement n'est pas une contrainte. Cependant, cette technique doit apporter des avantages par rapport aux autres techniques de remédiation disponibles et se révéler économiquement viable. Il est alors important de valoriser économiquement les sites traités par phytostabilisation. Une des stratégies visée est de valoriser la biomasse produite dans des filières non alimentaires notamment pour la production de bioénergie.

Expérimenté depuis quelques décennies sur sols pollués, le peuplier s'avère être un genre intéressant pour les phytotechnologies, eu égard de sa tolérance aux ETM, de son potentiel de croissance, produisant une biomasse annuelle élevée (> 10 t/an/ha en TTCR). Il est aussi largement exploité en France, avec environ 2,5 millions de m³ de bois produits par an ce qui le place en deuxième position des espèces feuillues récoltées, alors que la populiculture représente seulement 1,6 % de la forêt française (source : AFOCEL). L'exploitation du peuplier est également facilitée puisque la plantation se fait par bouturage à l'aide de plançons de 2 m. Il a également été montré que dans un cadre de valorisation énergétique de la biomasse pérenne contaminée, en excluant la biomasse foliaire, les teneurs en ETM dans le combustible d'entrée peuvent être limitées. Les teneurs en ETM retrouvées dans les fumées sont dix fois inférieures aux normes imposées par exemple dans les usines d'incinération d'ordures ménagères (UIOM) pour autant qu'un filtre à manche soit installé sur la chaudière (Chalot *et al.*, 2012). Enfin, le peuplier est capable de former des associations symbiotiques à la fois avec des champignons endomycorhiziens et ectomycorhiziens. Or, ces champignons pourraient participer à la phytostabilisation en immobilisant les ETM dans leurs hyphes et/ou en limitant les transferts vers la plante.

L'objectif général de ma thèse, financée par l'ADEME et la région Lorraine, était alors de développer une stratégie de réduction des teneurs en ETM dans la biomasse du peuplier dédiée à la valorisation énergétique, par l'utilisation de filtres biologiques naturels, ses champignons associés. Le projet ANR PHYTOPOP (programme PRECODO) a permis de mettre en évidence des cultivars de peupliers présentant une combinaison extrême de forte biomasse et faible accumulation d'ETM. Mes travaux de thèse s'intégraient dans le projet ANR international BIOFILTREE, qui a débuté au printemps 2011 et qui vise à réduire les ETM dans la biomasse du peuplier à l'aide d'organismes symbiotiques mycorhiziens. Les objectifs majeurs du projet BIOFILTREE sont (i) la réalisation originale *in situ* d'essais de phytostabilisation à grande échelle, basés sur des co-cultures de peupliers et d'aulnes en mode taillis à courte rotation (TCR) associés à des champignons endo- et ectomycorhiziens ; (ii) l'utilisation de la biomasse produite dans un but de valorisation énergétique (combustion ou gazéification) ; (iii) la sélection de symbiotes microbiens participant à la réduction de la teneur en ETM dans les parties aériennes des arbres ainsi que l'étude aux niveaux physiologique et moléculaire des mécanismes de tolérance de ces champignons.

C'est dans le cadre du projet BIOFILTREE que s'est déroulée ma thèse dont les trois objectifs principaux sont décrits ci-dessous :

➤ **l'identification des communautés fongiques mycorhiziennes du peuplier sur sol pollué :**

Une partie de cet objectif consistait à s'assurer de la présence de champignons en association avec le peuplier sur un site pollué. Pour cela, le pourcentage de racines mycorhizées (par des champignons ecto- ou endomycorhiziens) a été analysé par une approche de microscopie. Une observation de racines fines au microscope photonique, après traitement et coloration, a permis de quantifier le taux de mycorhization du système racinaire de peupliers prélevés sur un site pollué. Une deuxième partie de cet objectif consistait à identifier au niveau moléculaire (amplification des séquences ITS fongiques et séquençage) les espèces fongiques associées aux racines afin de sélectionner des candidats potentiellement adaptés à la pollution et intéressants dans une optique de phytostabilisation.

➤ **l'isolement et la sélection de souches fongiques performantes dans la séquestration des ETM :**

Ce deuxième objectif visait à sélectionner des souches fongiques performantes dans la séquestration des ETM permettant une amélioration du potentiel de phytostabilisation de leur plante hôte. Cette sélection s'est alors déclinée en plusieurs étapes successives : i) isolement de souches ectomycorhiziennes à partir de racines ou de carpophores ; ii) identification et caractérisation des souches isolées ; iii) étude de leurs capacités de tolérance aux ETM ; iv) étude de leurs capacités de mycorhization ; v) étude du potentiel de phytostabilisation des souches d'intérêt en conditions contrôlées et sur le terrain.

L'isolement de souches endomycorhiziennes a été dévolu au partenaire industriel Agronutrition dans le cadre du projet BIOFILTREE, et mon travail de thèse a donc porté uniquement sur les souches ectomycorhiziennes.

➤ **la caractérisation des mécanismes de séquestration des ETM par les champignons mycorhiziens :**

Deux mécanismes principaux de séquestration des ETM par les cellules ont été démontrés dans la littérature (Bellion *et al.*, 2006) : biosorption non spécifique au niveau des parois cellulaires et absorption intracellulaire puis séquestration des ETM dans les organites intracellulaires impliquant des transporteurs spécifiques. Les transporteurs impliqués dans l'absorption et la séquestration des ETM sont encore mal connus chez les champignons mycorhiziens. Le génome d'un champignon ectomycorhizien modèle, *Laccaria bicolor*, récemment séquencé (Martin *et al.*, 2008), a permis de comparer ses données génomiques à celles d'autres champignons déjà étudiés (*S. cerevisiae* principalement). Une approche post-génomique de caractérisation fonctionnelle de quelques gènes candidats a également été mise en œuvre. Les familles de transporteurs ZIP, impliqués dans l'absorption des ETM, et CDF, impliqués dans la séquestration, ont été particulièrement ciblées.

Matériels et méthodes

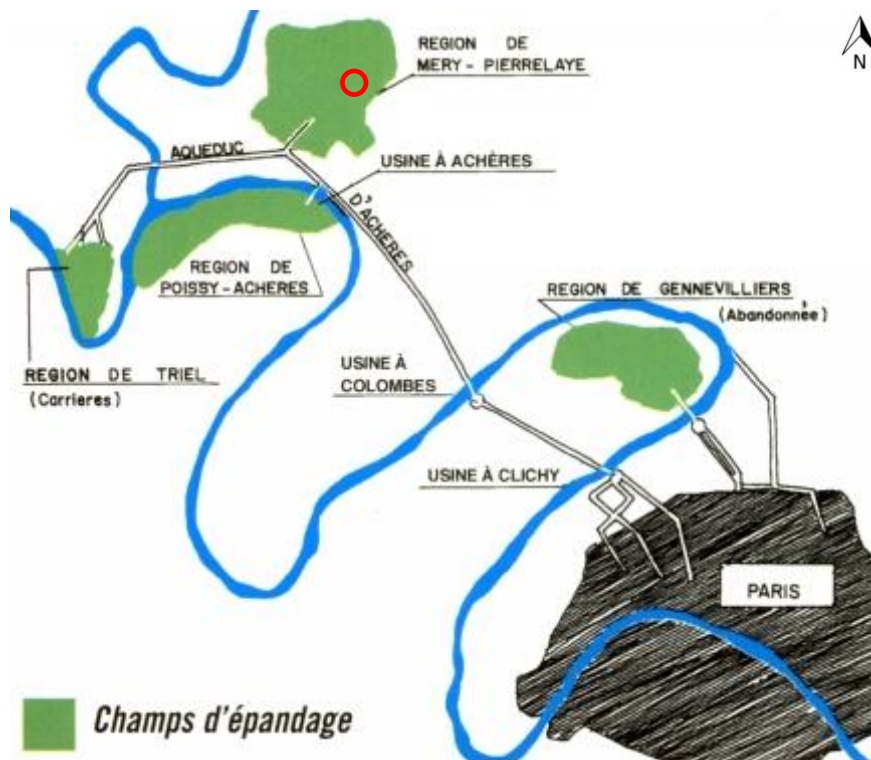


Figure 24 : Différentes zones d'épandage des eaux usées de Paris dans les départements du Val d'Oise et des Yvelines¹³. La localisation des dispositifs expérimentaux de Pierrelaye est représentée par le cercle rouge.

¹³ <http://colleges.ac-rouen.fr/guillaume/spip1/IMG/didapages/Paris2008/index.html>

1. Les sites d'études

Au cours de ce travail de thèse, plusieurs sites pollués ont été utilisés, soit pour des prélèvements de matériel biologique (végétaux et champignons) et/ou de sol, soit pour des expérimentations sur le terrain. La localisation, les principales caractéristiques du sol, l'historique des sites, l'origine de la pollution ainsi que la teneur en ETM des sols seront décrites pour chaque site dans les paragraphes suivants.

1.1. Le site de Pierrelaye-Bessancourt

La plaine de Pierrelaye-Bessancourt, d'une surface de 890 ha, est située dans le département du Val d'Oise dans la région Ile-de-France, sur les communes de Méry-sur-Oise, Pierrelaye, Bessancourt et Pontoise principalement. L'activité principale de la commune portait sur la culture maraîchère. En 1899, furent inaugurés 2150 hectares de champs d'épandage avec la mise en service d'une usine de relevage à Colombes permettant d'assurer l'épandage d'eaux usées sur les plaines d'une douzaine de communes des départements du Val d'Oise et des Yvelines, dont celles de Pierrelaye et de Méry-sur-Oise notamment. La figure 24 illustre les différentes zones concernées par l'épandage des eaux usées de Paris. La pollution du sol de la plaine par les ETM fut détectée en 1997. Un arrêté préfectoral interdit alors, en 1999, la mise sur le marché des légumières et plantes aromatiques produites dans ce secteur. A partir de cette date la monoculture de maïs à destination animale pris la place des cultures maraîchères (Baize & Tercé, 2002).

Différentes études ont été mises en œuvre pour appréhender cette problématique de pollution suite à l'épandage des eaux usées brutes de la ville de Paris. Notamment l'étude « EPANDAGRI », réalisée en 2004, a permis d'obtenir des données précises sur l'état de la pollution, l'évaluation des risques liés à cette pollution et a apporté des éléments pour une aide à la décision quant à l'avenir de la plaine. Le maintien de l'agriculture sur cette zone est essentiel puisque l'activité agricole est jugée indispensable par les scientifiques pour l'équilibre des sols et éviter le relargage des ETM dans la nappe phréatique sous-jacente. EPANDAGRI a aussi permis de définir un référentiel de "normalité" de présence des ETM sur la base de sols déclarés comme n'ayant pas reçu d'apports d'eaux usées brutes. Des valeurs de Fond Pédo-Géochimique Naturel (FPGN) et de Teneur Agricole Habituelle Locale (TAHL) peuvent ainsi être définies (Lamy *et al.*, 2004). La TAHL est tout à fait cohérente avec des références nationales et confirme que ces sols dits "non pollués" contiennent des ETM à hauteur de la concentration originelle (FPGN) auxquels se sont ajoutés les apports standards liés aux activités agricoles (apports de fertilisants/pesticides) et aux dépôts atmosphériques. L'étude confirme la forte contamination pluri-métallique des sols de la plaine de Pierrelaye-Bessancourt. Les

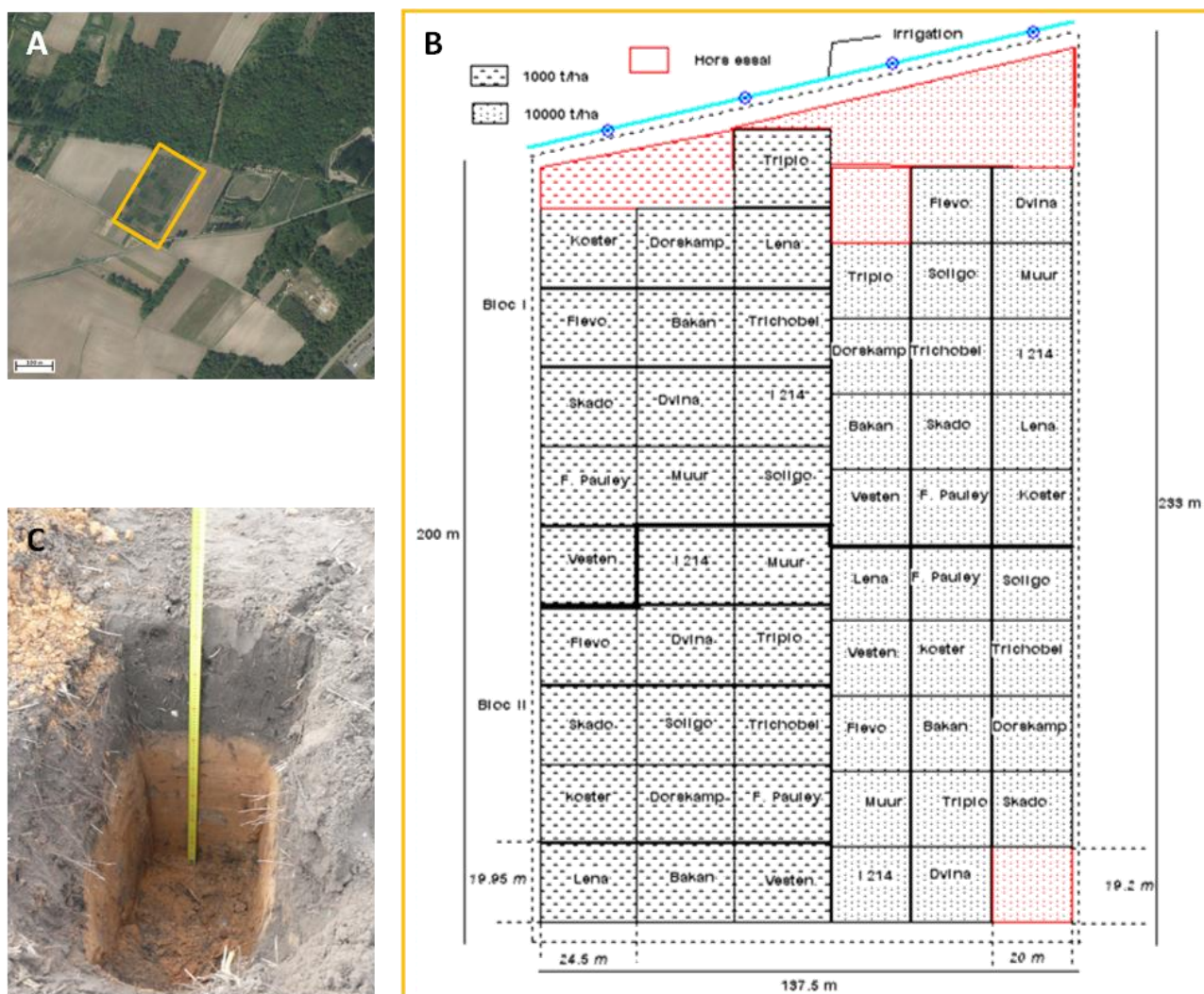


Figure 25 : Localisation et plan du dispositif expérimental PHYTOPOP de Pierrelaye

A : Localisation du dispositif expérimental PHYTOPOP de Pierrelaye¹⁴.

B : Plan du dispositif expérimental PHYTOPOP de Pierrelaye : 14 clones différents de peupliers ont été plantés par parcelle, avec deux modes culturaux différents (TCR 1000 tiges/ha et TCR 10000 tiges/ha), répétés deux fois.

C : Profil de sol du dispositif expérimental PHYTOPOP de Pierrelaye. L'horizon supérieur (couche noire) est riche en matière organique et contaminé par des ETM et des polluants organiques, l'horizon inférieur (couche ocre) est riche en argile et faiblement contaminé. Profondeur : 90 cm.

¹⁴ maps.google.com

polluants métalliques apportés au cours d'un siècle d'irrigation par les eaux usées de la ville de Paris sur ces sols agricoles, ou par tout autre source dans

un tel contexte périurbain, ont été progressivement incorporés dans l'horizon superficiel, soit directement par infiltration de l'eau, soit mécaniquement suite aux labours annuels et retournement des croûtes de particules solides séchées en surface. Cette incorporation progressive a abouti à un horizon de labour fortement anthropisé (Bourennane *et al.*, 2006 ; Dère *et al.*, 2007).

Le site de Pierrelaye-Bessancourt est situé dans le département du Val-d'Oise dans la région Ile-de-France (Latitude : 49° 1' 21" Nord ; Longitude : 2° 9' 1" Est). Deux dispositifs expérimentaux de respectivement trois et un ha, ont été mis en place sur la plaine de Pierrelaye dans le cadre des projets PHYTOPOP « Stratégies culturales, valorisation de la biomasse, et sélection de géotypes plus performants appliquées à l'utilisation du peuplier pour la remédiation de sols pollués » (ANR PRECODO) (Figure 25 (A)) et BIOFILTREE « Filtration biologique pour la réduction des éléments traces dans la biomasse des arbres » (Figure 26 (A)). Le sol du site de Pierrelaye est sablonneux et calcaire. La réalisation de profils de sol révèle, en surface, une couche de matière organique noire de 20 à 60 cm dont la profondeur dépend de la pente (Figure 25 (C) et 26 (D)). Cette couche est particulièrement contaminée par divers ETM tels que le zinc, le cadmium, le plomb et le cuivre (Tableau IX). L'horizon profond (20 cm à 1 m) est argileux et présente de faibles niveaux de contamination, décroissant avec la profondeur (Lamy *et al.*, 2004).

1.2. Le site de Fresnes-sur-Escaut

Le dispositif expérimental du site de Fresnes-sur-Escaut (Latitude : 50° 25' 46" Nord, Longitude : 3° 35' 4" Est) a été mis en place dans le cadre du projet BIOFILTREE et est situé au bord de la rivière Escaut dans le département du Nord, de la région Nord-Pas-de-Calais (Figure 27 (A)). Le terrain appartient à l'organisme public VNF (Voies Navigables de France) et a été utilisé pendant plusieurs années pour le dépôt de sédiments issus du curage de l'Escaut. Aucune donnée n'est disponible quant à la fréquence et la quantité de sédiments déposés sur ce site. Plusieurs couches de sédiments successives ont ainsi été apportées dont l'épaisseur totale varie de quelques centimètres (20 à 40 cm) à plusieurs mètres (2 à 3 m) (Figure 27 (D)). Les différents polluants, organiques ou métalliques, sont ainsi concentrés dans ces différentes couches de sédiments (Tableau X). Les polluants majeurs de ce site sont le cadmium, le zinc, l'arsenic et le plomb. Le site a principalement été exploité comme prairie et pour la chasse. Des études de risques menées par l'INERIS ont montré que l'ingestion de gibier issu de la chasse ne présentait pas de danger pour la population car la consommation annuelle de lapins par personne reste limitée (maximum 4 lapins par personne et par an) et largement inférieure au seuil de risque évalué (Valérie Bert : communication personnelle).

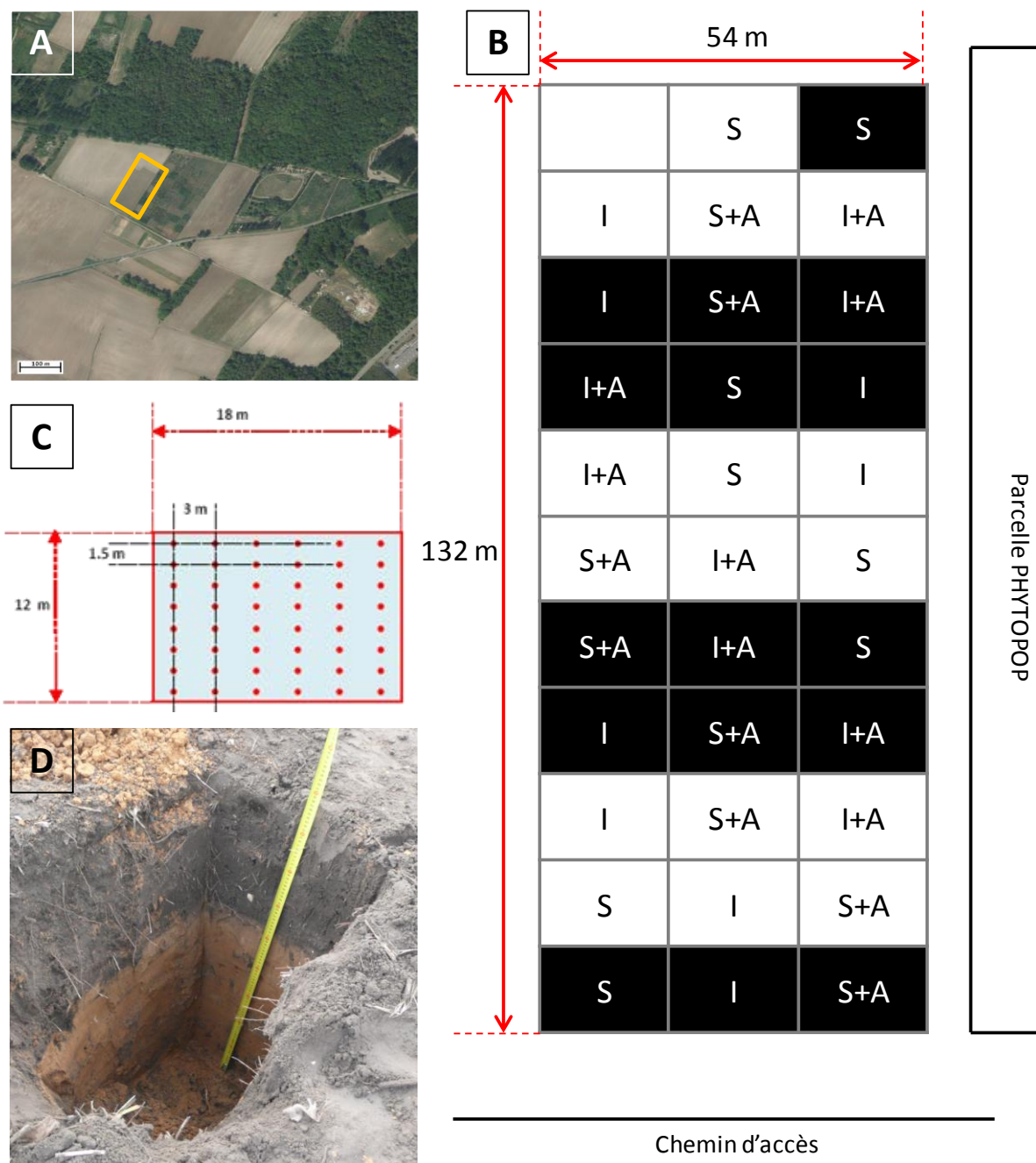


Figure 26 : Localisation et plan du dispositif expérimental BIOFILTREE de Pierrelaye

A : Localisation du dispositif expérimental BIOFILTREE de Pierrelaye. La barre représente 100 m¹⁵.

B : Plan du dispositif expérimental BIOFILTREE de Pierrelaye. S : peupliers « Skado » ; I : peupliers « I214 » ; A : aulne (*Alnus glutinosa*) ; en noir : arbres inoculés ; en blanc : arbres non inoculés. Chaque modalité est répétée 4 fois.

C : Détail d'une placette. 48 arbres ont été plantés par placette, un rang sur deux dans le cadre du mélange aulne/peuplier.

D : Profil de sol du dispositif expérimental BIOFILTREE de Pierrelaye. L'horizon supérieur (couche noire) est riche en matière organique et contaminé par des ETM et des polluants organiques, l'horizon inférieur (couche ocre) est riche en argile et faiblement contaminé. Profondeur : 90 cm.

¹⁵ maps.google.com

1.3. Le site de Tavaux

Le dispositif expérimental du site de Tavaux (Latitude : 47° 4' 52 " Nord, longitude : 5° 20' 14" Est) a été mis en place dans le cadre du projet BIOFILTREE et est situé sur la commune de Saint-Symphorien-sur-Saône, dans le département de la Côte d'Or, dans la région Bourgogne (Figure 28 (A)). Le site est situé dans un ancien bassin de décantation des eaux usées provenant de l'usine chimique Solvay de Tavaux (département du Jura, région Franche-Comté).

L'usine de Solvay à Tavaux a démarré son activité en 1930. L'usine produit actuellement des matières plastiques comme du PVC (PolyChlorure de Vinyle) et plusieurs composés chimiques tels que de la soude caustique, de l'eau de javel, de l'acide chlorhydrique, du chloroforme ou d'autres produits organiques chlorés¹⁶. Les composés chlorés produits dans l'usine sont principalement issus de l'électrolyse du sel (NaCl), le sous-sol du Jura étant riche en sel gemme. L'électrolyse du sel permet de générer du chlore sous forme gazeuse (Cl₂) et de la soude (NaOH). Plusieurs techniques permettent la production de chlore et de soude comme l'électrolyse à mercure longtemps utilisée par l'usine Solvay. Parfois, du chlorure de baryum est utilisé pour éliminer les ions sulfates du *process*. En 2010, l'usine a remplacé ses deux salles d'électrolyse mercure par une salle d'électrolyse membrane de capacité équivalente, moins nocive pour l'environnement, car l'utilisation de l'électrolyse à mercure sera interdite à partir de 2020.

L'usine Solvay à Tavaux et les communes environnant le site de l'usine (Damparis, Abergement-la-Ronce) font l'objet d'une surveillance des pouvoirs publics et sont enregistrées dans la base de données Basol¹⁷. En effet, de 1964 à 1986, une décharge interne de résidus de produits organiques chlorés (POC) dans une alvéole en argile a été exploitée par l'usine. En 1987, une pollution de la nappe par ces POC a été détectée, une « bulle » de divers composés (hexachlorobutadiène, hexachloroéthane, perchloroéthylène, pentachlorobenzène, tétrachlorure de carbone, trichloroéthylène, hexachlorobenzène essentiellement) s'étant formée. Des mesures ont été prises afin d'éliminer cette poche de POC, notamment un système de pompage a été installé en 2007 et a permis en trois ans d'exploitation de récolter 25 000 tonnes de POC « purs ». De plus, un arrêté préfectoral interdit l'utilisation de l'eau pour la consommation ou l'arrosage dans les communes concernées, notamment celles d'Abergement-la-Ronce et Damparis. L'usine est également classée « Seveso » (la directive « Seveso » impose aux États membres de l'Union Européenne d'identifier les sites industriels présentant des risques d'accidents majeurs) en raison notamment des natures toxiques et inflammables de nombreux produits.

Les eaux usées provenant de l'usine sont acheminées via un canal partiellement couvert et déversées dans des bassins de décantation sur la commune de Saint-Symphorien-sur-Saône, avant de

¹⁶ http://www.solvay.fr/FR/SolvayenFrance/nos_sites_en_france/tavaux/tavaux_les_produits_fabriques.aspx

¹⁷ http://basol.environnement.gouv.fr/fiche.php?page=1&index_sp=39.0001

Tableau IX : Concentrations moyennes en ETM et caractéristiques du sol de Pierrelaye dans le fond pédogéochimique naturel (FPGN), les teneurs agricoles habituelles locales (TAHL) et les dispositifs expérimentaux PHYTOPOP et BIOFILTREE

Eléments	Unités	FPGN	TAHL	Dispositif PHYTOPOP 2007		Dispositif BIOFILTREE 2011	
				mini	maxi	mini	maxi
Cd pseudo-total	mg/kg	0,02 à 0,14	0,19 à 0,42	1,94	4,44	2,00	6,11
Co pseudo-total	mg/kg	2,31 à 3,64	3,02 à 7,71	4,00	13,5	4,67	9,07
Cr pseudo-total	mg/kg	13,9 à 21,0	15,4 à 29,2	36,7	89,0	36,3	92,1
Cu pseudo-total	mg/kg	2,42 à 5,93	8,01 à 19,4	69,3	230	94,4	353
Ni pseudo-total	mg/kg	4,21 à 8,23	6,03 à 20,2	14,1	41,7	14,3	31,3
Pb pseudo-total	mg/kg	3,74 à 8,34	18,1 à 43,0	74,7	484	176	11700
Zn pseudo-total	mg/kg	8,61 à 19,4	34,0 à 63,2	314	761	218	689
Cd extrait au DTPA	mg/kg	nd	nd	0,70	1,83	nd	nd
Cu extrait au DTPA	mg/kg	nd	nd	17,5	66,3	nd	nd
Pb extrait au DTPA	mg/kg	nd	nd	14,0	53,8	nd	nd
Zn extrait au DTPA	mg/kg	nd	nd	68,9	180,0	nd	nd
Cd biodisponible	µg/kg	nd	nd	17,9*	39,1*	2,0**	11,0**
Cu biodisponible	µg/kg	nd	nd	414*	1000*	15**	121**
Pb biodisponible	µg/kg	nd	nd	13,9*	33,8*	6**	115**
Zn biodisponible	µg/kg	nd	nd	1200*	2300*	60**	1556**
pH	-	nd	nd	6,82	7,47	7,48	7,97
C total	g/kg	nd	nd	24,5	66,5	nd	nd
N total	g/kg	nd	nd	1,16	2,70	nd	nd
P₂O₅	g/kg	nd	nd	2,30	5,08	nd	nd
Mg²⁺	g/kg	nd	nd	0,043	0,116	0,77	2,30
Ca²⁺	g/kg	nd	nd	1,57	3,99	4,72	17,0
K⁺	g/kg	nd	nd	0,068	0,206	2,87	4,69

* La fraction biodisponible a été évaluée grâce à une extraction au NH₄NO₃ à 1 M.

** La fraction biodisponible a été évaluée grâce à une extraction au (CaNO₃)₂ à 0,01 M.

nd : non déterminé

Tableau X : Concentrations moyennes en ETM et caractéristiques du sol du dispositif expérimental de Fresne-sur-Escaut

Eléments	Unités	Dispositif BIOFILTREE 2011	
		mini	maxi
As pseudo-total	mg/kg	8,69	28,6
Cd pseudo-total	mg/kg	2,00	67,1
Co pseudo-total	mg/kg	7,90	19,4
Cr pseudo-total	mg/kg	6,60	87,5
Cu pseudo-total	mg/kg	19,6	126
Ni pseudo-total	mg/kg	15,3	43,0
Pb pseudo-total	mg/kg	40,5	8154
Zn pseudo-total	mg/kg	79	2710
As biodisponible*	µg/kg	9,0	2,7
Cd biodisponible*	µg/kg	2,0	1,4
Zn biodisponible*	µg/kg	60,0	770
pH	-	7,13	7,78

* La fraction biodisponible a été évaluée grâce à une extraction au (CaNO₃)₂ à 0,01 M.

rejoindre l'étang de l'Aillon. Cette étape permet d'éliminer une majorité des polluants et de diminuer le pH de l'eau, très alcalin en raison de la présence de soude. Le sol de ces bassins est donc contaminé avec du mercure et du baryum principalement, et présente un pH alcalin (Tableau XI).

1.4. Les sites de Micheville

Les sites de Micheville, appelés « boues » et « pins » dans le cadre de cette thèse, sont respectivement situés sur la commune de Russange dans le département de la Moselle (Latitude : 49° 28' 45" Nord, Longitude : 5° 56' 17" Est), et sur la commune de Villerupt dans le département de la Meurthe-et-Moselle, dans la région Lorraine (Latitude : 49° 28' 59" Nord, Longitude : 5° 55' 19" Est). Ces deux sites sont situés sur le domaine de l'usine de Micheville dont l'activité a cessé définitivement en 1985.

L'usine de Micheville était située sur les communes de Russange (Moselle), Villerupt et Audun-le-Tiche (Meurthe-et-Moselle). L'usine de Micheville a été construite en 1872. Un vaste complexe sidérurgique a été construit sur le site comprenant toutes les activités d'une usine intégrée avec les mines, la cokerie, les hauts-fourneaux, les laminoirs et les activités de parachèvement. Les différents ateliers ont été disposés sur plusieurs plates-formes en escalier séparées par des murs de soutènement¹⁸. Les activités principales du site ont été arrêtées en 1974, seules quelques activités comme le *blooming* et le parachèvement ont continué jusqu'en 1985. En 1986, le site a été acquis par l'EPML (Etablissement Public de la Métropole Lorraine), un établissement public chargé de la mise en valeur de terrains industriels libérés par la reconversion industrielle, devenu en 2001 l'EPF (Etablissement Public Foncier) de Lorraine. Une partie du site a été réhabilitée, certains bâtiments ont été rasés et des plantations d'arbres, notamment de pins ont été réalisées. Actuellement, seuls quelques bâtiments industriels subsistent et sont occupés par des entreprises. Certains terrains sont restés à l'état de friche industrielle et font l'objet de décharge sauvage.

Le site appelé « pins » est situé dans une plantation de pins proche de l'ancienne cokerie (Figure 29). Les taux d'ETM relevés sur ce site sont faibles (Tableau XII), en revanche la présence de divers HAP a été détectée. Le site appelé « boues » est quant à lui situé dans un ancien bassin de déversement de boues provenant de l'usine sidérurgique (Figure 29). Le technosol est ainsi très riche en ETM, particulièrement en zinc, plomb et aluminium (Tableau XII). Le site s'est partiellement revégétalisé de façon naturelle par des bouleaux, saules et peupliers principalement. En dehors des arbres qui s'y sont développés, le technosol est à nu, aucune végétation herbacée ne pouvant s'y développer à l'exception de quelques zones faiblement colonisées en bordure du site, probablement en raison de la forte concentration en ETM.

¹⁸ http://basol.environnement.gouv.fr/fiche.php?page=1&index_sp=54.0016

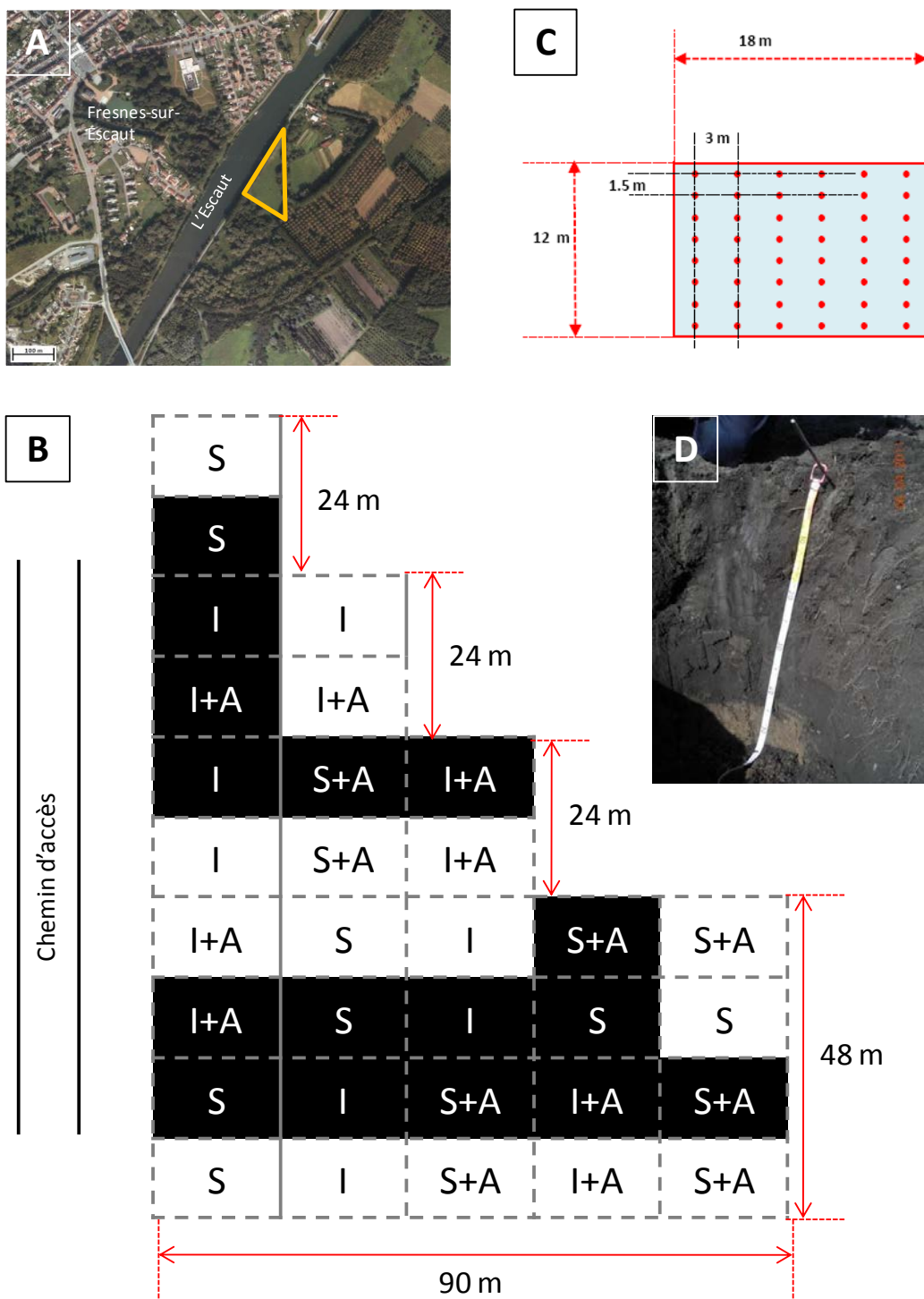


Figure 27 : Localisation et plan du dispositif expérimental BIOFILTREE de Fresnes-sur-Escaut

A : Localisation du dispositif expérimental BIOFILTREE de Fresnes-sur-Escaut. La barre représente 100 m¹⁹.

B : Plan du dispositif expérimental BIOFILTREE de Fresnes-sur-Escaut. S : peupliers « Skado » ; I : peupliers « I214 » ; A : aulne (*Alnus glutinosa*) ; en noir : arbres inoculés ; en blanc : arbres non inoculés. Chaque modalité est répétée 4 fois dont une modalité dans une zone n'ayant pas reçu de sédiments, non polluée, délimitée par les pointillés sur le schéma.

C : Détail d'une placette. 48 arbres ont été plantés par placette, un rang sur deux dans le cadre du mélange aulne/peuplier.

D : Profil de sol du dispositif expérimental BIOFILTREE de Fresnes-sur-Escaut. L'horizon supérieur (couche noire) est riche en matière organique issue des dépôts de sédiments et contaminé par des ETM, l'horizon inférieur (couche grise) est faiblement contaminé. Profondeur : 50 cm.

¹⁹ maps.google.com

1.5. Le site de Metaleurop

Le dispositif expérimental du site de Metaleurop a été mis en place dans le cadre du projet PHYTOPOP et est situé sur la commune de Leforest, dans le département du Pas-de-Calais, de la région Nord-Pas-de-Calais (Latitude : 50° 25' 48" Nord, Longitude : 3° 2' 51" Est). Le site est localisé à proximité de l'usine désaffectée Metaleurop Nord, située sur les communes de Noyelles-Godault et Courcelles-lès-Lens dans le département du Pas-de-Calais.

Cette usine, fondée en 1894 par la société anonyme des mines de Malfidano, était une fonderie dont la principale activité était le raffinage de zinc et de plomb. Le procédé thermique permettant le raffinage de ces métaux était très consommateur de charbon. L'usine a subi des dégâts pendant les deux guerres mondiales et a été reconstruite plusieurs fois. A partir de 1970, les filtres à gaz de l'usine sont progressivement modernisés ou remplacés. Les rejets atmosphériques ont alors été réduits de manière drastique de 350 tonnes de plomb canalisées en 1970 à une quinzaine de tonnes en 2002. En 1988, l'usine prend le nom de Metaleurop Nord et appartient au groupe Glencore, un conglomérat suisse spécialisé dans la production et le courtage de métaux. A sa fermeture en 2003, l'usine raffinait le zinc et d'autres métaux (plomb, cuivre, antimoine, indium, germanium, or, argent, cadmium). En 2003, la société Metaleurop Nord SA dépose le bilan et est en liquidation judiciaire. Le site sera alors repris en 2003 par la société SITA qui sera en charge du démantèlement à partir de 2004 et de la réhabilitation du site.

Lorsque l'usine était en activité, divers ETM dont principalement du zinc, du plomb et du cadmium, contenus dans les fumées, se sont déposés sur les sols alentour (Sterckeman *et al.*, 2002 ; Douay *et al.*, 2009). Malgré la fermeture de l'usine Metaleurop Nord, les sols sont toujours fortement contaminés en ETM, sur une surface de 120 km² sur laquelle vivent 55000 habitants. Des lignes d'isoconcentration pour les principaux polluants ont été définies (Figure 30) (Fritsch *et al.*, 2011) dont la répartition est liée au sens du vent dominant dans la région. Le tableau XIII montre les teneurs en ETM mesurées sur les sols aux alentours de Metaleurop Nord à Noyelles-Godault et sur un site témoin de référence. Les moyennes de teneurs en cadmium sont 23 fois plus importantes à Noyelles-Godault, celles de plomb 13 fois plus importantes et celles de zinc 9 fois plus importantes que sur le site loessique de référence (Sterckeman *et al.*, 2002). La profondeur moyenne polluée par les ETM est de 40 cm environ, et ces éléments restent confinés dans les couches superficielles du sol à l'exception du zinc, plus mobile (Sterckeman *et al.*, 2002).

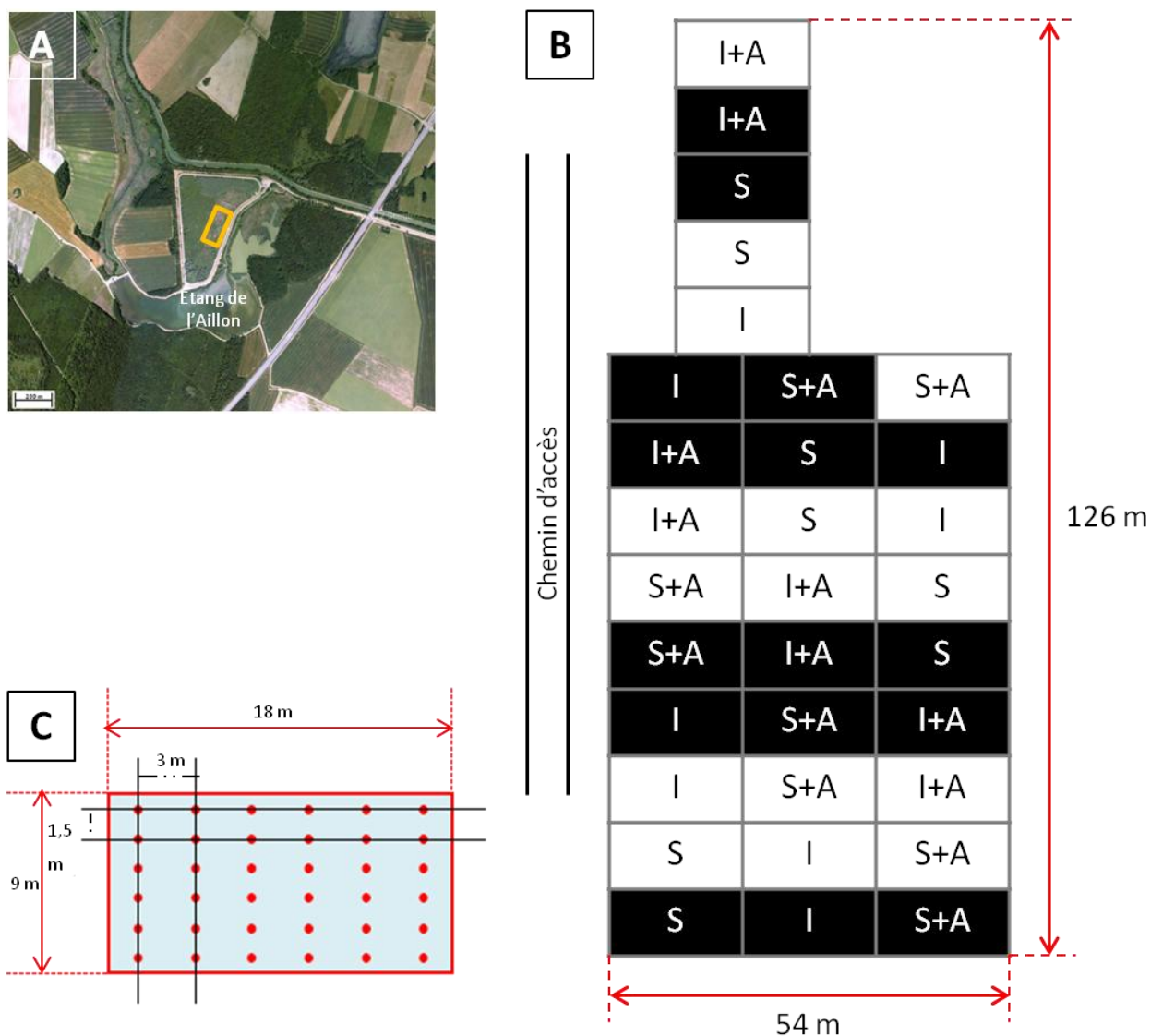


Figure 28 : Localisation et plan du dispositif expérimental BIOFILTREE de Tavaux

A : Localisation du dispositif expérimental BIOFILTREE de Tavaux. La barre représente 200 m²⁰.

B : Plan du dispositif expérimental BIOFILTREE de Tavaux. S : peupliers « Skado » ; I : peupliers « I214 » ; A : aulne (*Alnus glutinosa*) ; en noir : arbres inoculés ; en blanc : arbres non inoculés. Chaque modalité est répétée 4 fois.

C : Détail d'une placette. 36 arbres ont été plantés par placette, un rang sur deux dans le cadre du mélange aulne/peuplier.

²⁰ maps.google.com

2. Matériels biologiques

2.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé au cours de cette thèse est soit issu de plusieurs campagnes d'échantillonnage des différents sites présentés dans le paragraphe 1, soit issu de pépinières et utilisé pour des tests en conditions contrôlées au laboratoire.

2.1.1. Peupliers des dispositifs expérimentaux du projet PHYTOPOP

Deux dispositifs expérimentaux ont été mis en place dans le cadre du projet PHYTOPOP en 2007, un sur la commune de Pierrelaye (Val d'Oise) et l'autre sur la commune de Leforest (Pas-de-Calais). L'objectif général du projet PHYTOPOP est d'évaluer l'efficacité du peuplier pour la production de biomasse sur sites pollués par les ETM et notamment de rechercher les solutions les plus adaptées à la phytoremédiation, au traitement et à la valorisation de la biomasse produite²¹. Pour ces deux sites expérimentaux, plusieurs clones de peupliers ont ainsi été plantés afin de tester leurs capacités d'accumulation des ETM dans les parties aériennes. Les plants d'origine sont des boutures de 30 cm environ, mises en place manuellement sur toute leur longueur, dont seul le bourgeon dépassant du sol donnera naissance à la future tige. La pose de clôture autour des dispositifs a été rendue nécessaire par la présence de ravageurs (lapins) en grand nombre.

Le dispositif expérimental du projet PHYTOPOP localisé sur la commune de Pierrelaye est pollué par les eaux usées de la Ville de Paris (Figure 25). Ce dispositif de trois ha présente deux modes de culture différents : en taillis à courte rotation (TCR) et en taillis à très courte rotation (TTCR) (respectivement à 1000 et 10000 tiges.ha⁻¹) et deux parcelles ont été réalisées pour chaque mode de culture. Pour chaque parcelle, quatorze clones différents de peupliers (Fritzi-Pauley, Muur, Skado, Trichobel, Vesten, Dvina, I214, Lena, Soligo, Triplo, Dorskamp, Flevo, Koster et Bakan), dont les principales caractéristiques sont données dans le tableau XIV ont été plantés en mars 2007. Il y a deux modes de culture et deux parcelles par mode de culture soit quatre parcelles au total ce qui équivaut à cinquante-quatre placettes unitaires de 489 m² pour la condition TCR et 389 m² pour la condition TTCR. Cela représente 49 plants par placette unitaire en condition TCR et 384 plants en condition TTCR (Figure 25).

Le dispositif expérimental du projet PHYTOPOP localisé sur la commune de Leforest est situé à quelques kilomètres de l'ancienne usine de Metaleurop Nord (Figure 31), a une surface de 1 hectare et une texture de sol argilo-limoneuse. Le sol est bien alimenté en eau. Les mêmes clones de peuplier ont été

²¹ <http://dendroremediation.univ-fcomte.fr/spip.php?rubrique5>

Tableau XI : Concentrations moyennes en ETM (mg.kg⁻¹) des sols en France (Baize, 1997) et du **dispositif** expérimental de Tavaux

Éléments	Valeurs observées dans les sols « ordinaires »	Valeurs observées dans le cas d'anomalies naturelles modérées	Valeurs observées dans le cas de fortes anomalies naturelles	Valeurs mesurées dans le dispositif BIOFILTREE
As	1,0 à 25	30 à 60	60 à 284	18,07 ± 0,44
Cd	0,05 à 0,45	0,7 à 2,0	2,0 à 16,0	0,27 ± 0,02
Cr	10 à 90	90 à 150	150 à 3180	14,62 ± 0,84
Cu	2 à 20	20 à 62	65 à 102	9,41 ± 0,72
Hg	0,02 à 0,10	-	-	3,71 ± 0,23
Ni	2 à 60	60 à 130	130 à 2076	7,06 ± 0,69
Pb	9 à 50	60 à 90	100 à 3000	11,67 ± 0,63
Zn	10 à 100	100 à 250	250 à 3800	44,92 ± 4,65



Figure 29 : Localisation des sites de Micheville²² (A) : les sites des « boues » et des « pins » sont entourés en rouge, les anciens emplacements des différents ateliers de l'usine sont également indiqués²³ (B).

²² www.agape-ped.org

²³ maps.google.com

plantés sur ce dispositif au mois de mai 2007 à l'exception des clones « Koster » et « Bakan », à une densité de 1000 tiges par hectare (Tableau XIV). Deux parcelles ont été mises en place par le FCBA, la répartition des cultivars a été faite au hasard dans ces deux parcelles (Figure 31). Cela représente donc 24 placettes unitaires de 359 m² avec 36 plants par placette unitaire.

En octobre 2009, des racines et des feuilles de trois clones : « Triplo » (*Populus deltoides* x *Populus nigra*), « Bakan » (*P. trichocarpa* x *P. maximowiczii*) et « Skado » (*P. trichocarpa* x *P. maximowiczii*) de peupliers ont été prélevées, sur les deux parcelles TTCR et sur une des parcelles TCR du dispositif expérimental de Pierrelaye. Cet échantillonnage de racines nous servira à quantifier le taux de mycorhization et à identifier les espèces fongiques mycorhiziennes associées. Les feuilles ont été prélevées afin d'étudier un effet potentiel de la mycorhization sur la teneur en ETM des parties aériennes. Plus précisément, des échantillons racinaires et des feuilles matures de dix arbres par clone de peuplier et par placette ont ainsi été prélevés. Une deuxième campagne de prélèvement de racines a été réalisée en juin 2011 sur cinq clones : « Triplo » (*Populus deltoides* x *Populus nigra*), « I214 » (*Populus deltoides* x *Populus nigra*), « Skado » (*P. trichocarpa* x *P. maximowiczii*), « Lena » (*Populus deltoides*) et « Fritz-Pauley » (*P. trichocarpa*). Les racines de cinq arbres par placette unitaire ont été prélevées dans une parcelle TCR et une parcelle TTCR, afin d'identifier les espèces fongiques mycorhiziennes associées aux peupliers et d'isoler des champignons endophytes ou mycorhiziens à partir de ces racines.

En juin 2011, des racines de dix arbres des clones « Skado » et « Fritz-Pauley » ont été prélevées sur le dispositif expérimental de Metaleurop afin d'isoler des champignons endophytes ou mycorhiziens à partir des racines. Des racines de peupliers « Beaupré » (*P. deltoides* x *P. trichocarpa*) provenant d'une autre plantation située à proximité du site Metaleurop Nord ont également été prélevées avec le même objectif.

2.1.2. Peupliers et aulnes des sites expérimentaux du projet BIOFILTREE

Trois dispositifs expérimentaux ont été mis en place dans le cadre du projet BIOFILTREE en mars et avril 2011 sur les communes de Symphorien-sur-Saône (Côte d'Or), Fresnes-sur-Escaut (Nord) et Pierrelaye (Val d'Oise). Les objectifs principaux du projet BIOFILTREE sont i) la réalisation originale *in situ* d'essais de phytostabilisation à grande échelle, basés sur des co-cultures de peupliers et d'aulnes en TCR associés à des champignons endo- et ectomycorhiziens ; ii) l'utilisation de la biomasse produite dans un but de valorisation énergétique et l'étude de sa faisabilité économique ; iii) la sélection de symbiotes mycorhiziens participant à la réduction en ETM dans les parties aériennes des arbres. Suite aux données issues du projet PHYTOPOP, deux clones de peupliers « Skado » (*P. trichocarpa* x *P. maximowiczii*) et « I214 » (*Populus deltoides* x *Populus nigra*) ont été sélectionnés pour leur forte production de biomasse et leur faible accumulation en ETM dans les parties aériennes. L'aulne glutineux (*Alnus glutinosa*) a été sélectionné dans le cadre de ce projet car c'est

Tableau XII : Concentrations moyennes totales et biodisponibles en ETM (mg.kg^{-1}) des sites de Micheville (Turnau *et al.*, 2002 ; Blaudez *et al.*, 2000).

Eléments	Site des « boues »		Site des « pins »
	totales	biodisponibles*	totales
Al	1500 ± 200	nd	nd
Cd	$2,0 \pm 1,0$	$0,105 \pm 0,099$	0,04
Cu	$28,0 \pm 5,0$	$0,07 \pm 0,04$	2,10
Fe	6100 ± 1000	nd	nd
Ni	$33,0 \pm 4,0$	$0,013 \pm 0,002$	74,9
Pb	32200 ± 4500	$1,058 \pm 0,137$	nd
Zn	106000 ± 5900	$75,4 \pm 5,7$	249

* La fraction biodisponible a été évaluée grâce à une extraction au $(\text{CaNO}_3)_2$ à 0,01 M.

nd : non déterminé

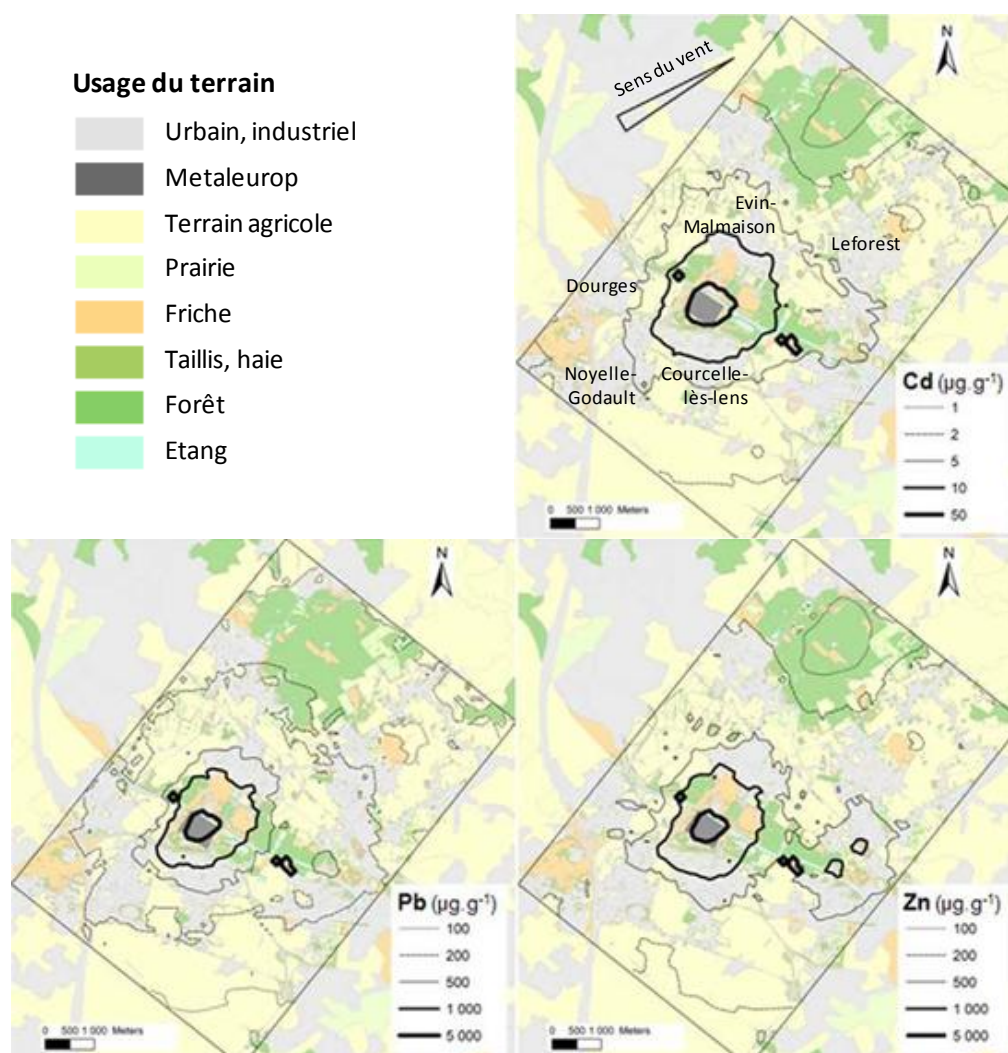


Figure 30 : Lignes d'isoconcentration prédites en cadmium, plomb et zinc dans les sols environnant l'usine de Metaleurop Nord (d'après Fritsch *et al.*, 2011). Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g.g}^{-1}\text{MS}$.

l'espèce d'aulne la plus répandue en France et c'est une espèce qui accumule peu les ETM dans ses parties aériennes. Pour les peupliers, les plants d'origine sont des plançons de 2,50 m, enfoncés de 60 cm minimum dans le sol ; pour les aulnes, des plants enracinés de deux ans ont été utilisés.

Sur chaque site, des placettes unitaires ont été implantées, soit en culture de peuplier pure (« I214 » ou « Skado »), soit en co-culture avec de l'aulne (1 rang sur 2 « I214 »-aulne ou « Skado »-aulne). Ces placettes unitaires ont été inoculées ou non avec un mélange commercial de champignons endo- et ectomycorhiziens fourni par les sociétés Symbiom et Agronutrition. Au total, il y a donc huit modalités possibles pour les placettes unitaires, répétées quatre fois chacune sur chaque site. L'inoculum fongique se composait d'un mélange de champignons endomycorhiziens (*Glomus intraradices* BEG140, *G. mosseae* BEG95, *G. claroideum* BEG96, *G. microaggregatum* BEG56, *G. etunicatum* BEG92, *G. geosporum* BEG199, *G. irregulare/intraradices* DAOM197198) et ectomycorhiziens (*Hebeloma mesophaeum*, *Amanita rubescens*, *Laccaria proxima* et *Paxillus involutus*).

Pour les dispositifs expérimentaux de Pierrelaye (Figure 26) et Fresnes-sur-Escaut (Figure 27), 48 tiges ont été plantées par placette unitaire à une densité de 2222 tiges par hectare ; soit des placettes unitaires de 12 m (8 arbres plantés avec 1,5 m d'espacement entre les arbres dans chaque rangée) x 18 m (6 arbres plantés avec 3 m d'espacement entre deux rangées). Huit modalités ont été testées, répétées quatre fois, sur une surface totale de 7200 m² ; soit 576 tiges de peupliers « I214 » ou « Skado » et 384 aulnes.

Pour le dispositif expérimental de Tavaux (Figure 28), le nombre de plants par placette unitaire a été réduit à 36 tiges car le site expérimental était plus petit, soit des placettes unitaires de 9 m (6 arbres plantés avec 1,5 m d'espacement entre les arbres dans chaque rangée) x 12 m (6 arbres plantés avec 3 m d'espacement entre deux rangées). La surface plantée pour les 32 placettes unitaires (8 modalités x 4 répétitions) est donc de 5184 m², avec un total de 432 tiges de peupliers « I214 » ou « Skado » et 288 aulnes plantés.

Plusieurs campagnes de prélèvements de racines ont été effectuées afin de réaliser un suivi de l'inoculation au champ des peupliers par mesure du taux de mycorhization et identification moléculaire. En novembre 2011, les racines de cinq peupliers « I214 » par placette unitaire ont été prélevées sur le dispositif expérimental de Pierrelaye, les racines des peupliers « Skado » n'ont pas été prélevées sur ce dispositif car elles étaient trop peu nombreuses dans l'horizon supérieur du sol. En mars 2012, les racines de six peupliers « Skado » par placette unitaire ont été prélevées sur le dispositif expérimental de Tavaux. Les peupliers « I214 » ont été écartés sur ce site en raison d'une forte mortalité due à une sécheresse et une attaque de chenilles en mai 2011. En octobre 2012, des racines de dix peupliers « Skado » ont été prélevées sur le

Tableau XIII : Concentrations moyennes en ETM et caractéristiques des sols de référence, et des sols autour de l'usine de Metaleurop Nord (d'après Sterckeman *et al.*, 2002 ; Douay *et al.*, 2009) et du dispositif expérimental PHYTOPOP situé sur la commune de Leforest

Éléments	Unités	Sols lœssiques de référence	Sols autour de Metaleurop Nord	Sols du dispositif PHYTOPOP	
		moyenne	moyenne	mini	maxi
Cd total	mg/kg	0,42	9,79	4,6	5,4
Cu total	mg/kg	16,7	27,6	18,2	25,5
Ni total	mg/kg	24,7	20,2	20,6	26,5
Pb total	mg/kg	38,4	522,7	228	274
Tl total	mg/kg	0,25	0,48	0,58	0,63
Zn total	mg/kg	73,7	644,6	324	379
pH	-	8,0	6,8	6,0	6,8
Cd extrait au DTPA	mg/kg	nd	nd	3,2	3,7
Cu extrait au DTPA	mg/kg	nd	nd	3,7	4,9
Ni extrait au DTPA	mg/kg	nd	nd	2,2	2,8
Pb extrait au DTPA	mg/kg	nd	nd	108	133
Zn extrait au DTPA	mg/kg	nd	nd	44,4	74,2
Cd biodisponible*	µg/kg	nd	nd	272	1180
Cu biodisponible*	µg/kg	nd	nd	289	2440
Pb biodisponible*	µg/kg	nd	nd	4490	32900
Zn biodisponible*	µg/kg	nd	nd	<15	30,8

*La fraction biodisponible a été évaluée grâce à une extraction au NH_4NO_3 à 1 M.

nd : non déterminé

Tableau XIV : Liste et principales caractéristiques des cultivars utilisés pour les essais de terrain dans le cadre du projet PHYTOPOP

Nom du clone	Espèce	Pays	Nom botanique	Sexe
Fritzi Pauley	T	B	<i>P. trichocarpa</i>	femelle
Bakan	TM	B	<i>P. maximowiczii</i> x <i>P. trichocarpa</i>	mâle
Muur	DN	B	<i>P. euramericana</i>	mâle
Skado	TM	B	<i>P. maximowiczii</i> x <i>P. trichocarpa</i>	femelle
Trichobel	T	B	<i>P. trichocarpa</i>	mâle
Vesten	DN	B	<i>P. euramericana</i>	femelle
Dvina	D	I	<i>P. deltoides</i>	mâle
I-214	DN	I	<i>P. euramericana</i>	femelle
Lena	D	I	<i>P. deltoides</i>	mâle
Soligo	DN	I	<i>P. euramericana</i>	mâle
Triplo	DN	I	<i>P. euramericana</i>	mâle
Dorskamp	DN	NL	<i>P. euramericana</i>	mâle
Flevo	DN	NL	<i>P. euramericana</i>	mâle
Koster	DN	NL	<i>P. euramericana</i>	mâle

D : *Populus deltoides*, N : *P. nigra*, T : *P. trichocarpa* et M : *P. maximowiczii* ; *P. euramericana* est un hybride *P. deltoides* x *P. nigra* ; B : Belgique, I : Italie, NL : Pays-Bas.

dispositif de Fresnes-sur-Escaut dans quatre placettes unitaires, deux inoculées et deux non-inoculées, avec à chaque fois une placette échantillonnée dans la zone la plus polluée et l'autre dans la zone la moins polluée.

2.1.3. Espèces ligneuses utilisées en conditions contrôlées au laboratoire

Des clones de peupliers « Skado » et « I214 » ont été utilisés au laboratoire pour des tests en conditions contrôlées en culture en pots. Des boutures de 20 cm ont été utilisées et seul le bourgeon terminal était conservé pour obtenir une seule tige.

Afin de tester les capacités de mycorhization de souches fongiques isolées, des plantules de peuplier « clone INRA 717-1-B4 » (*Populus tremula* x *P. alba*), cultivées *in vitro*, ont été utilisées, permettant de travailler dans un système axénique de petite taille. Des plantules de pins (*Pinus pinaster*) issues de graines ont également été utilisées pour cette étude car certaines souches fongiques isolées pourraient également être des hôtes du pin.

2.2. Micro-organismes utilisés

2.2.1. Souche bactérienne d'*Escherichia coli*

La souche d'*Escherichia coli* DH5 α F'IQ (F ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r $_{K}^{-}$, m $_{K}^{+}$) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ^{-}) a été utilisée pour les étapes de clonage et de multiplication de plasmides. Elle est conservée au laboratoire à -80 °C. Cette souche est cultivée sur milieu Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989) (Tableau XV) à 37 °C. Son taux de transformation est élevé. Elle permet la synthèse d'un grand nombre de copies des plasmides.

2.2.2. Souches de levures *Saccharomyces cerevisiae*

Les souches de levures déficientes utilisées sont des mutants de *Saccharomyces cerevisiae* et sont toutes isogéniques de la souche parentale BY4741, considérée comme la souche sauvage dans cette étude. Elles sont conservées au laboratoire à -80 °C dans une solution de glycérol à 30 %. Leurs génotypes sont présentés dans le tableau XVI.

Les différentes souches de *S. cerevisiae* déficientes en transporteurs sont réactivées sur milieu YPD (Yeast Peptone Dextrose) gélosé (Tableau XVII). En fonction de la souche de levure déficiente utilisée, le milieu de culture employé n'est pas le même. En effet, on ajoute au milieu utilisé, des agents de sélection (métal à la concentration désirée et/ou chélateur de métaux) suivant l'expérience envisagée.

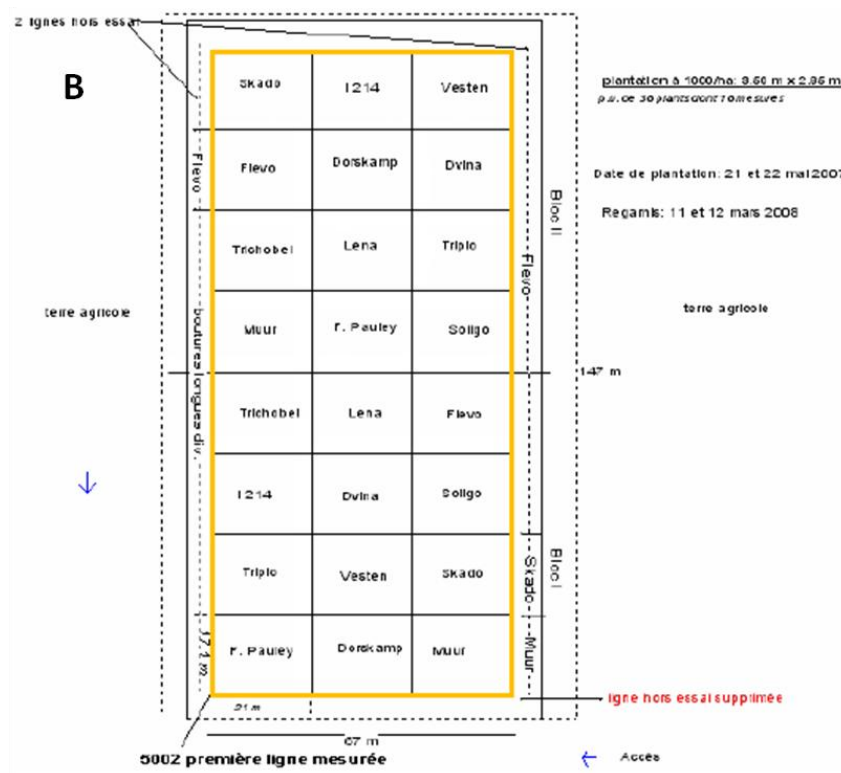


Figure 31 : Localisation et plan du dispositif expérimental PHYTOPOP de Metaleurop

A : Localisation du dispositif expérimental PHYTOPOP de Metaleurop²⁴.

B : Plan du dispositif expérimental de Metaleurop (commune de Leforest) : deux répétitions (parcelles 1 & 2) de 12 clones de peupliers ont été plantés en mode TCR (1000tiges/ha) sur une surface de 1 ha.

²⁴ maps.google.com

Les cultures sont réalisées en aérobiose, à 30 °C. Toutes les expériences nécessitant une culture liquide ont été effectuées sur des cellules en phase exponentielle de croissance ($DO_{600nm} = 0,6$ à $0,9$).

2.2.3. Souche de *Laccaria bicolor*

L'isolat utilisé est la souche monocaryotique S238N-H82 du champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor* (Di Battista *et al.*, 1996). La souche parente S238N provient d'une fructification récoltée en 1976 sous un conifère, *Tsuga mertensiana*, dans le parc national de Crater Lake aux Etats-Unis (Oregon). C'est un Basidiomycète qui appartient à la famille des Tricholomataceae, ordre des Agaricales.

L'entretien de la souche de *Laccaria bicolor* est assuré par repiquages successifs à partir de la souche mère conservée à 25 °C et à l'obscurité. Cette dernière est cultivée pendant 30 jours sur milieu Pachlewski gélosé (Pachlewski & Pachlewska, 1974) (Tableau XVIII). La souche S238N-H82 est également entretenue en milieu Pachlewski liquide à 25 °C sous agitation à l'obscurité. Elle est repiquée tous les 15 jours après filtration à vide de la culture-mère à l'aide d'un Büchner. Cette souche a été utilisée pour l'étude de l'expression des gènes LbZips et LbCdfs.

2.2.4. Autres souches de champignons ectomycorhiziens ou endophytes conservées au laboratoire

Plusieurs souches de champignons ectomycorhiziens et endophytes, issues de la collection du laboratoire ou issues de plusieurs campagnes de prélèvements, sont conservées au laboratoire à 25 °C à l'obscurité. L'entretien de ces différentes souches se fait par repiquages successifs sur milieux malt (malt : 12 g/l ; agar : 15 g/l ; autoclavage 20 min à 120 °C), MMN (Tableau XIX) (Brundrett *et al.*, 1996), N2P2 (Gay, 1990) (Tableau XX) ou Pachlewski (Tableau XVIII) solides.

2.3. Plasmides utilisés

2.3.1. Plasmides de clonage

2.3.1.1. Plasmide pGEM®-T

Le plasmide pGEM®-T (3000 pb) (Promega) possède le gène de résistance à l'ampicilline (Figure 32) et une origine de réplication du phage f1. Il possède également un multi-site de clonage localisé dans le gène lacZα utilisé pour le clonage des produits d'amplification par PCR dans *E. coli*. Les amorces SP6 et T7 encadrent la cassette de clonage et permettent d'amplifier le fragment d'ADN cloné dans ce vecteur pour

Tableau XV : Composition du milieu LB (Luria-Bertani)

Composés	Concentration finale
Tryptone	10 g/l
NaCl	10 g/l
Extrait de levures	5 g/l
Agar	20 g/l
Autoclaver 20 min à 120 °C	
Ampicilline	100 mg/l

Tableau XVI : Génotypes des souches de levures utilisées

Souch	Génotype	Phénotype
BY4741	MATa <i>his3 Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0 ura3 Δ0</i>	sauvage
Smf1Δ	MATa <i>his3 Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0 ura3 Δ0 YOL122C::kanMX4</i>	déficiente en absorption de Mn
Zrt1-Zrt2Δ	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 YGL255w::kanMX4 YLR130c::kanMX4</i>	déficiente en absorption de Zn
Fet3-Fet4Δ	MATa <i>his3 Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0 ura3 Δ0 YMR058w::kanMX4 YMR319c::kanMX4</i>	déficiente en absorption de Fe
Ctr1Δ	MATa <i>his3 Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0 ura3 Δ0 YPR124w::kanMX4</i>	déficiente en absorption de Cu
Zrt3Δ	MATa <i>his3 Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0 ura3 Δ0 YKL175w::kanMX4</i>	accumule le Zn dans les vacuoles
End4Δ	MATa <i>his3 Δ1 leu2 Δ0 lys2 Δ0 ura3 Δ0 YNL243w::kanMX4</i>	absence d'endocytose
Zrc1Δ	MATa <i>his3 Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0 ura3 Δ0 YMR243c::kanMX4</i>	sensible au zinc
Pmr1Δ	MATa <i>his3 Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0 ura3 Δ0 YGL167c::kanMX4</i>	sensible au manganèse
Ccc1Δ	MATa <i>his3 Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0 ura3 Δ0 YLR220w::kanMX4</i>	sensible au fer
Ycf1Δ	MATa <i>his3 Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0 ura3 Δ0 YDR135c::kanMX4</i>	sensible au cadmium
Cot1Δ	MATa <i>his3 Δ1 leu2 Δ0 met15 Δ0 ura3 Δ0 YOR316c::kanMX4</i>	sensible au cobalt

Tableau XVII : Composition du milieu YPD

Composés	Concentration finale
Tryptone	20 g/l
Extrait de levures	10 g/l
Glucose	20 g/l
Agar	20 g/l
Autoclaver 20 min à 120 °C	

vérifier son insertion. Ce plasmide linéaire possède une base thymidine à chaque extrémité 3'OH permettant d'augmenter l'efficacité de ligation des produits PCR.

Ce plasmide a été utilisé pour le clonage des fragments d'amplification des séquences ITS fongiques à partir de racines de peuplier dans *E. coli*.

2.3.1.2. Plasmide pGEM®-T easy

Le plasmide pGEM®-T easy (3015 pb) (Promega) est quasi identique au plasmide pGEM®-T (Figure 32). Il possède des sites de restriction supplémentaires (*NotI*, *EcoRI* et *BstZI*) dans le multi-site de clonage. Cet ajout permet le sous-clonage de gènes en utilisant uniquement l'enzyme *NotI* ou *EcoRI* pour extraire l'insert.

Ce plasmide a été utilisé pour le sous-clonage des gènes des familles Zip et Cdf de *L. bicolor*.

2.3.2. Plasmides navette *E. coli* – *S. cerevisiae*

2.3.2.1. Plasmide pFL61

Le plasmide pFL61 (5425 pb) (Minet *et al.*, 1992) possède le gène de résistance à l'ampicilline et deux sites de clonages (*NotI* et *BstXI*) en aval du promoteur de la phosphoglycérokinase de *S. cerevisiae* (Figure 33). Les régions L2 et R2 encadrent la cassette de clonage. A l'aide d'amorces spécifiques de ces régions L2 et R2, il est alors possible d'amplifier le fragment cloné dans ce vecteur pour vérifier à la fois sa présence et/ou son orientation. Ce plasmide est pourvu du gène marqueur *ura3*. En effet, les souches de levures utilisées, mutées pour le gène *ura3*, sont auxotrophes pour l'uracile et sont donc incapables de se développer en absence d'uracile dans le milieu. Le gène *ura3*, porté par le plasmide, permet de restaurer la croissance des souches transformées en absence d'uracile et facilite ainsi leur sélection. Ce plasmide a été utilisé pour exprimer les gènes étudiés dans la levure.

2.3.2.2. Plasmide pYES2-GFP

Le plasmide pYES2 (5900 pb) (Invitrogen) est un vecteur navette *Escherichia coli*-*Saccharomyces cerevisiae* contenant les origines de répllication pUCori (pour les bactéries) et 2 μ (pour les levures) (Figure 34). Le promoteur pGAL1 de levure, en amont du site de clonage, est induit par le galactose et réprimé par le glucose. Ce plasmide porte le gène marqueur d'auxotrophie *ura3* et le gène de résistance à l'ampicilline. Le plasmide pYES2-GFP contient le gène codant la « *green fluorescent protein* » (GFP) inséré au

Tableau XVIII : Composition des milieux Pachlewski et Pach 10

Composés	Pachlewski (concentration finale)		Pach 10 (concentration finale)	
Glucose	20 g/l		5 g/l	
Maltose	5 g/l		5 g/l	
Tartrate d'ammonium	2,3 g/l		1 g/l	
KH ₂ PO ₄	1 g/l		1 g/l	
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,5 g/l		0,5 g/l	
Thiamine hydrochloride	10 µg/l		10 µg/l	
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,63 mg/l	3,2 µM	0,63 mg/l	3,2 µM
MnSO ₄ , H ₂ O	1,54 mg/l	11,7 µM	1,54 mg/l	11,7 µM
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,25 mg/l	0,47 µM	0,25 mg/l	0,47 µM
Mo ₇ O ₂ NH ₄ , 4H ₂ O	0,05 mg/l	0,28 µM	0,05 mg/l	0,28 µM
H ₃ BO ₃	1,28 mg/l	20,6 µM	1,28 mg/l	20,6 µM
Fe-EDTA	3,44 mg/l	10,7 µM	3,44 mg/l	10,7 µM
Ajuster le pH à 5,5				
Agar (si milieu solide)	20 g/l		-	
Autoclaver 20 min à 120 °C				

Solution
de Kanieltra

Tableau XIX : Composition des milieux MMN (Modified Melin-Norkrans) et MMN optimisé

Composés (à ajouter dans l'ordre)	Concentration (solution mère)	pour 1L de milieu MMN	pour 1L de milieu MMN optimisé
KH ₂ PO ₄	50 g/l	10 ml	10 ml
(NH ₄) ₂ HPO ₄	25 g/l	10 ml	10 ml
CaCl ₂ , 2H ₂ O	5 g/l	10 ml	10 ml
NaCl	2,5 g/l	10 ml	10 ml
MgSO ₄ , 7H ₂ O	15 g/l	10 ml	10 ml
Thiamine	1 g/l	100 µl	100 µl
FeCl ₃ , 6H ₂ O	10 g/l	100 µl	100 µl
Glucose	-	10 g	1,25 g
Maltose	-	-	5 g
Ajuster le pH à 4,3			
Agar	-	10 g	-
Autoclaver 20 min à 120 °C			

niveau du site *Xba*I. Il est utilisé dans les expériences de localisation subcellulaire des protéines d'intérêt chez la levure.

Tableau XX : Composition du milieu N2P2

Composés (à ajouter dans l'ordre)	Concentration (solution mère)	Volume pour 1L	Concentration finale
CaCl ₂ , 2H ₂ O	5 g/l	10 ml	50 mg/l
MgSO ₄ , 7H ₂ O	15 g/l	10 ml	150 mg/l
Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	16 g/l	10 ml	160 mg/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	25 g/l	10 ml	250 mg/l
KH ₂ PO ₄	50 g/l	5 ml	250 mg/l
NaH ₂ PO ₄	45 g/l	100 µl	4,5 mg/l
Citrate ferrique	12 g/l	1 ml	12 mg/l
Glucose	-	2,5 g	2,5 g/l
Thiamine	1 g/l	40 µl	40 µg/l
Kanieltra	-	100 µl	100 µl/l
H ₂ O ultra-pure	-	qsp 950 ml	
Ajuster le pH à 5,7			
Agar	-	15 g	15 g/l
Autoclaver 20 min à 120 °C			
MES pH 5,7 filtré	100 g/l	50 ml	5 g/l
Ampicilline	100 mg/ml	1 ml	100 mg/l
Chloramphenicol (dissoudre dans EtOH)	100 mg/ml	1 ml	100 mg/l

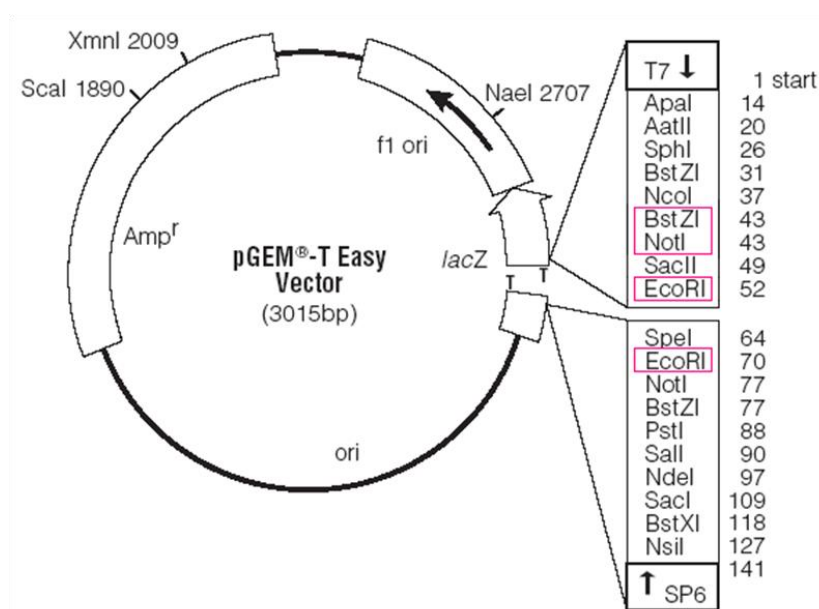


Figure 32 : Vecteurs de clonage pGEM®-T et pGEM®-T easy (Promega). Les sites de restriction absents chez le vecteur pGEM®-T (3000 pb) sont encadrés en rose. ori : site de réplication du plasmide pour la bactérie ; f1 ori : site de réplication du plasmide pour le phage f1 ; Amp^r : gène de résistance à l'ampicilline ; lacZ : gène qui code la β-galactosidase (ne peut s'exprimer si une séquence est insérée dans le plasmide) ; SP6 et T7 : sites de reconnaissance des amorces SP6 et T7 qui encadrent le multi-site de clonage ; T : plasmide linéarisé avec deux bases thymidine à chaque extrémité 3'OH.

3. Méthodes

3.1. Quantification du taux de mycorhization

Les échantillons de racines fines sont lavés plusieurs fois à l'eau distillée jusqu'à élimination de la terre. Les racines sont ensuite observées à la loupe binoculaire afin de quantifier le taux d'ectomycorhization. Pour cela, 300 apex racinaires au minimum ont été observés par système racinaire et le nombre d'apex ectomycorhizés (apex plus court, plus épais et souvent d'une couleur différente de celle de la racine) a été relevé ; le pourcentage d'ectomycorhization est ainsi directement obtenu.

Ensuite une partie des racines fines est congelée à -20 °C pour les extractions d'ADN génomique (ADNg), une autre partie séchée pour dosage des ETM en ICP-AES et une dernière traitée en vue de la quantification du taux d'endomycorhization (Figure 35). Les racines sont tout d'abord traitées deux heures au KOH à 10 % à 90 °C afin de les décolorer partiellement. Après une série de lavages à l'eau distillée, les racines traitées au KOH sont incubées une nuit dans une solution de bleu de méthyle à 0,1 % préparée dans de l'acide lactique à 80 %. Le bleu de méthyle se fixe spécifiquement aux parois fongiques et permet de révéler la présence des différentes structures fongiques par une coloration bleue de celles-ci. Après plusieurs rinçages dans l'acide lactique à 25 %, les racines fines sont conservées dans de l'acide lactique à 85 % afin de fixer la coloration. Des fragments de 1 cm de longueur sont montés entre lame et lamelle, à raison de 15 fragments par lame et 5 lames par échantillon. Les lames sont ensuite observées au microscope (grossissement x100 ou x200). La quantification du taux d'endomycorhization se fait par observation microscopique (Trouvelot *et al.*, 1986). Le logiciel MycoCalc permet de calculer le pourcentage d'endomycorhization total (M %) ainsi que la proportion d'arbuscules (A %), les structures fonctionnelles de la symbiose.

3.2. Isolement de souches fongiques ectomycorhiziennes

La figure 36 illustre différentes étapes de l'isolement de souches fongiques ectomycorhiziennes à partir de racines ou de carpophores.

3.2.1. A partir de carpophores

En condition stérile, la fructification d'un champignon est sectionnée en deux du pied au chapeau, et un fragment d'environ 1 cm² est découpé à l'aide d'un scalpel dans la zone interne du chapeau. Les fragments sont ensuite déposés sur différents milieux gélosés supplémentés avec 100 mg/l d'ampicilline et

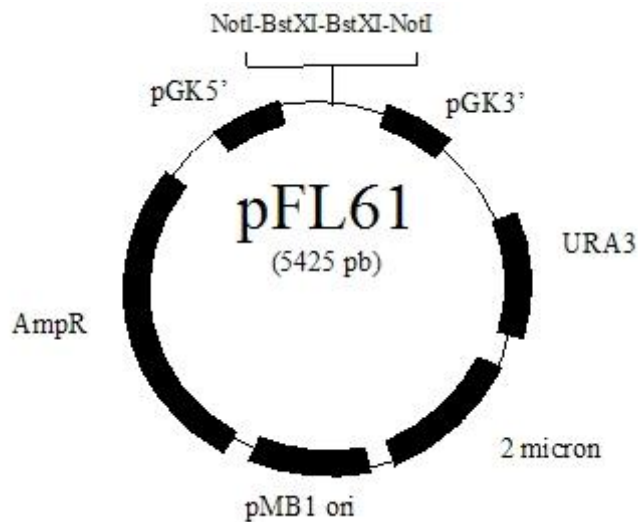


Figure 33 : Vecteur de clonage pFL61. Amp^r : gène de résistance à l'ampicilline ; ura3 : gène de prototrophie à l'uracile ; 2 micron : origine de réplication du plasmide pour la levure ; pMB1 ori : origine de réplication du plasmide pour la bactérie.

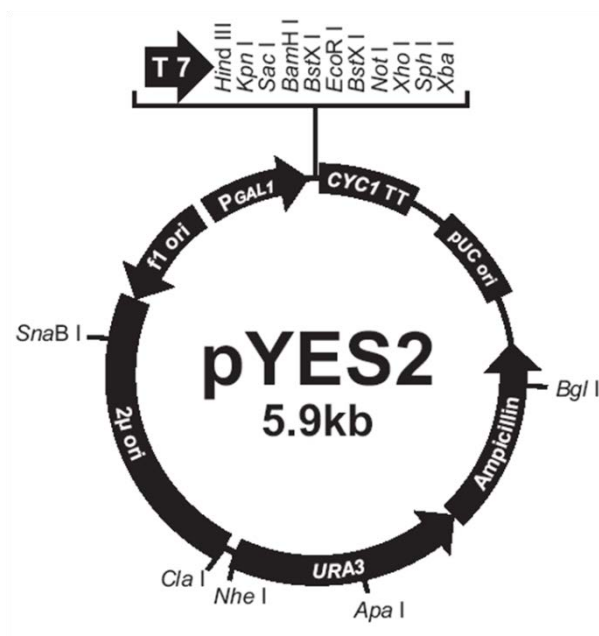


Figure 34 : Vecteur de clonage pYES2 (Invitrogen). Ampicillin : gène de résistance à l'ampicilline ; ura3 : gène de prototrophie à l'uracile ; 2μ ori : origine de réplication du plasmide pour la levure ; pUC ori : origine de réplication du plasmide pour la bactérie ; f1 ori : origine de réplication du plasmide pour le phage f1 ; PGAL1 : promoteur inducible par le galactose ; CYC1 TT : site de terminaison de la transcription.

100 mg/l de chloramphénicol : MMN (Tableau XIX), Pachlewski (Tableau XVIII), N2P2 (Tableau XX) ou malt (extrait de malt : 12 g/l ; agar : 15 g/l ; autoclavage 20 min à 120 °C).

3.2.2. A partir de racines d'espèces ligneuses

Les racines d'arbres (peupliers, pins, saules...) sont lavées à l'eau jusqu'à retirer toutes les particules de terre. Ensuite, les racines sont observées à la loupe binoculaire et les parties contenant plusieurs ectomycorhizes sont prélevées. Une étape de désinfection des racines est ensuite nécessaire afin d'éliminer un maximum d'organismes saprophytes (bactéries ou champignons). Une immersion de 30 secondes des échantillons est ainsi réalisée dans de l'eau oxygénée (H₂O₂) à 35 %. Les échantillons sont ensuite rincés au moins trois fois à l'eau distillée stérile.

Enfin, chaque mycorhize sélectionnée est déposée sur une boîte de pétri (Ø 55 mm) contenant un milieu gélosé supplémenté de 100 mg/l d'ampicilline et 100 mg/l de chloramphénicol. Les quatre milieux de culture cités ci-dessus sont également utilisés. Plusieurs milieux sont testés car les différentes espèces fongiques ne nécessitent pas les mêmes conditions de culture.

3.3. Tests de tolérance des souches fongiques aux éléments traces métalliques

Des tests de tolérance aux ETM des différentes souches isolées ont été réalisés avec différents milieux culture (choisis en fonction du milieu optimal de croissance déterminé pour chaque souche) contenant différents ETM (cadmium, cuivre, nickel et/ou zinc). Le milieu sans ajout d'ETM constituait le milieu contrôle. Les différentes souches étudiées ont été cultivées à 25 °C à l'obscurité dans des boîtes de Pétri sur les différents milieux solides préalablement recouverts d'une feuille de cellophane bouillie 10 minutes dans une solution d'EDTA à 10 mM afin de permettre une récolte plus aisée des champignons. Le pH du milieu a été ajusté à 4,3 afin d'augmenter la biodisponibilité des ETM. Les souches ont été récoltées lorsque la colonie avait atteint un diamètre de 4 cm sur le milieu après un minimum de 15 jours de croissance ou un maximum de 70 jours. La croissance radiale de chaque colonie est mesurée puis les masses sèches sont mesurées après séchage des échantillons pendant 48 heures à 65 °C.

3.4. Tests de mycorhization en milieu contrôlé

3.4.1. Tests de mycorhization en boîtes de Pétri

Avant la mise en contact avec la plante, les souches fongiques sont utilisées pour inoculer un mélange de tourbe et de vermiculite additionné d'un milieu de culture jusqu'à obtenir un développement du

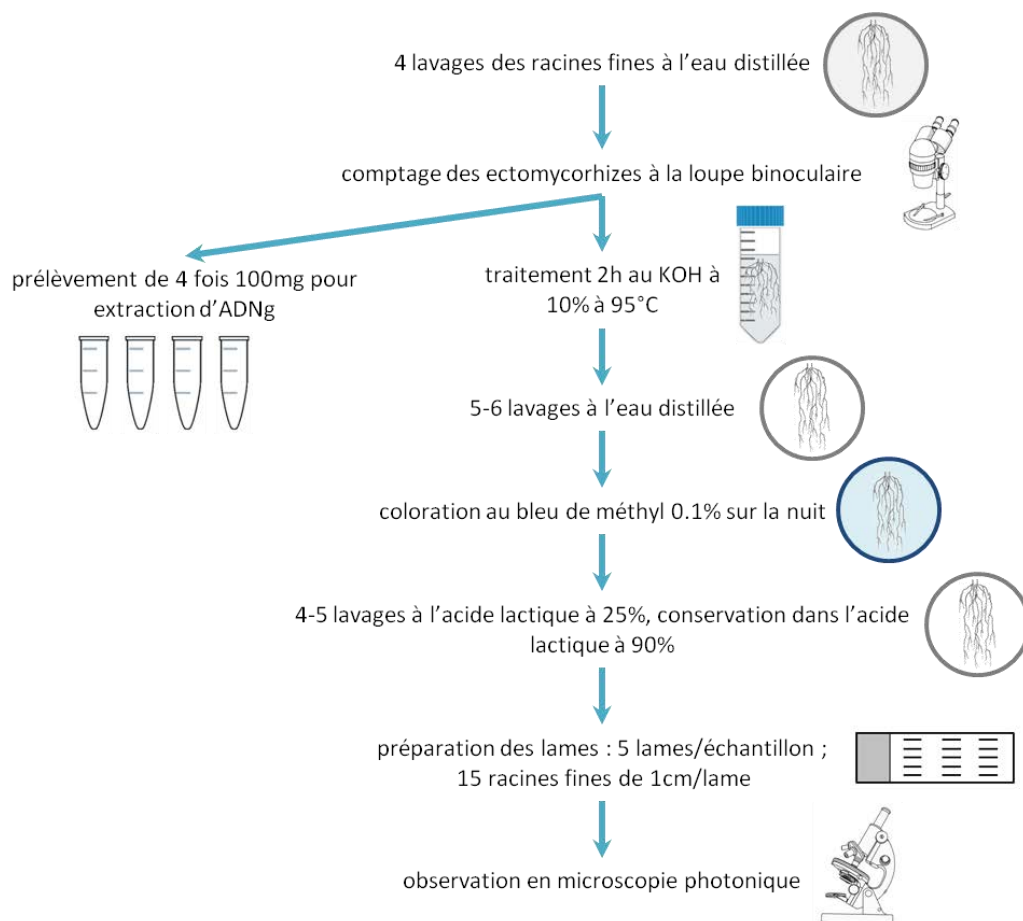


Figure 35 : Protocole de préparation des racines et de quantification du taux de mycorrhization



Figure 36 : Différentes étapes de l'isolement de souches fongiques ectomycorhiziennes. Les souches peuvent être isolées à partir de racines ectomycorhizées. Pour cela, une partie du système racinaire est prélevé, en prenant soin de retracer les racines jusqu'au tronc afin d'identifier l'arbre d'origine (A). Parfois, des ectomycorhizes sont visibles à l'œil nu lors du prélèvement (B). Après lavage des racines, les ectomycorhizes (de couleur brun-jaune sur la photographie (F)) sont prélevées, désinfectées et déposées sur différents milieux de culture. Les souches peuvent également être isolées à partir de carpophores (C : *Laccaria* sp., D : *Hebeloma* sp.). Après récolte, ceux-ci sont triés au laboratoire (E). Puis un fragment du carpophore est prélevé dans une zone « stérile » et déposé sur différents milieux de culture.

mycélium dans toute la boîte de Pétri. Dans un premier temps, un mélange de tourbe et vermiculite en proportion 1/5 est autoclavé puis mélangé avec du milieu MMN optimisé (Tableau XIX) liquide (pour 1 l : 200 ml de tourbe ; 800 ml de vermiculite ; 800 ml de milieu MMN optimisé), et le mélange obtenu est à nouveau autoclavé à 120 °C pendant 20 minutes. Le mélange est disposé dans des boîtes de Pétri carrées (20 cm x 20 cm) et inoculé avec une douzaine d'implants de la souche fongique à tester. Le mycélium s'y développera pendant 15 à 30 jours à 25 °C à l'obscurité, en fonction de la vitesse de développement du mycélium.

En parallèle, des plantules de pins (*Pinus pinaster*) et de peupliers, clone INRA I717-1-B4, sont préparées. Pour la préparation des plantules de pins, les graines ont été désinfectées avec un traitement de 10 minutes dans de l'H₂O₂. Les graines sont ensuite déposées sur un milieu gélosé stérile (agar à 1 %) en chambre de culture à 23 °C pendant une semaine. Après germination des graines, les plantules sont cultivées à 23 °C sous une photopériode de 18 h (200 $\mu\text{mol.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$) et une humidité relative de 70 %. Pour la préparation des peupliers, les plantules ont été obtenues par microbouturage aussi dénommée micro-propagation par bourgeonnement axillaire. Des entrenœuds avec bourgeons axillaires sont prélevés sur des individus âgés de 2 mois et demi et sont déposés sur un milieu MS (Murashige & Skoog, 1962) (Tableau XXI) qui va permettre la mise en place d'une tige feuillée et d'un système racinaire.

Ensuite, les plantules sont transférées sur le milieu de contact. Le système est conservé en condition axénique en scellant la boîte avec du papier Parafilm, et en veillant à laisser les parties aériennes de la plante en contact avec le milieu extérieur (Langer *et al.*, 2008). Les cultures sont alors placées dans une mini-serre saturée en humidité (80 % d'humidité) dans une chambre de culture (23 °C pendant les 16 h de photopériode et 18 °C la nuit). La formation des ectomycorhizes est évaluée macroscopiquement en se basant sur les caractéristiques morphologiques comme par exemple la stimulation de la croissance des racines latérales, la ramification racinaire ou encore la couleur de l'apex racinaire. Une observation microscopique est réalisée, selon le protocole décrit précédemment pour l'analyse des racines inoculées par des champignons endophytes.

3.4.2. Tests de mycorhization en pots

L'inoculum fongique est préparé dans des bocaux d'1,5 litre, fermés par un couvercle percé d'un trou, permettant d'y placer un bouchon en coton afin de maintenir une condition d'aérobiose. Un mélange d'un litre de tourbe et vermiculite, en proportion d'1/5 et 4/5 respectivement, est préparé et autoclavé à 120 °C pendant 20 minutes. Puis 700 ml de milieu Pach 10 (Tableau XVIII) est ajouté au mélange et autoclavé une nouvelle fois. Ensuite, plusieurs implants fongiques d'1 cm² (15 à 20 implants par bocal) sont répartis dans tout le volume du bocal. Le mycélium s'y développera pendant 15 à 60 jours à 25 °C à l'obscurité.

Tableau XXI : Composition du milieu MS (Murashige et Skoog)

Composés	Quantité pour 1l
Saccharose	30 g
Macro-éléments	
NH ₄ NO ₃	,65 g
KNO ₃	1,9 g
CaCl ₂	332 mg
MgSO ₄	180,7 mg
KH ₂ PO ₄	170 mg
Vitamines	
Glycine	2 mg
Myo-inositol	100 mg
Acide nicotinique	0,5 mg
Pyridoxine hydrochloride	0,5 mg
Thiamine hydrochloride	0,1 mg
Micro-éléments	
H ₃ BO ₃	6,2 mg
MnSO ₄ , H ₂ O	16,9 mg
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,25 mg
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,025 mg
FeSO ₄ , 7H ₂ O	27,8 mg
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	8,6 mg
KI	0,83 mg
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,025 mg
Na ₂ -EDTA	37,3 mg
Ajuster le pH à 5,8	
Autoclaver 20 min à 120 °C	

Lorsque le mycélium a entièrement envahi le substrat, l'inoculum est mélangé dans une proportion de 1/10^{ème} au substrat utilisé pour le test en pots. Puis, des boutures de peupliers de 20 cm environ sont enfoncées dans le substrat (2 l par pot). Les peupliers sont ensuite placés dans une chambre de culture (23 °C pendant les 16 h de photopériode et 18 °C la nuit à 80 % d'humidité) pendant deux mois et arrosés au minimum une fois, et jusqu'à trois fois par semaine en fonction de leurs besoins. Les pots sont répartis aléatoirement dans la chambre et déplacés une fois par semaine afin d'éviter tout biais lié à leur position.

3.5. Techniques d'analyse du sol et de dosage des éléments minéraux

3.5.1. Prélèvements de sol

Pour les analyses de sols des dispositifs expérimentaux du projet PHYTOPOP, des échantillons de sols ont été prélevés à la tarière dans l'horizon supérieur (0 à 20 cm de profondeur) à 50 cm du tronc de chaque arbre, selon un référentiel précis pour chaque site. Tout en évitant les bordures de la placette (effet « bordure »), 25 prélèvements par placette unitaire ont été réalisés pour le site de Pierrelaye et 16 pour le site de Metaleurop. Des échantillons composites ont ensuite été réalisés par parcelle unitaire à partir de ces prélèvements.

Pour les analyses des sols des dispositifs expérimentaux du projet BIOFILTREE, dix échantillons par placette unitaire ont été prélevés à la tarière dans l'horizon supérieur (0 à 20 cm de profondeur) à 20 cm du tronc de chaque arbre. Chaque zone de prélèvement a été géoréférencée par GPS. Des échantillons composites pour chaque placette unitaire ont également été réalisés à partir de ces prélèvements.

3.5.2. Détermination de la fraction biodisponible en éléments minéraux du sol

Plusieurs méthodes permettent d'approcher la fraction d'ETM dite « biodisponible », la fraction accessible et utilisable pour la plante ou les micro-organismes du sol. En général, ces méthodes permettent d'évaluer les fractions d'ETM libres dans le sol ou facilement mobilisables car faiblement liées à leur substrat.

3.5.2.1. Extraction par le DTPA (acide Diéthylène Triamine Penta Acétique)

Une extraction au DTPA a été réalisée pour les échantillons de sol provenant des dispositifs expérimentaux PHYTOPOP. Cette méthode est supposée extraire les formes des métaux liées aux matières organiques et aux oxydes de fer et de manganèse, fortement mobilisables (Lindsay & Norvell, 1978). L'extraction a été réalisée par Denis Baize selon la norme NF X 31-121 par une solution mixte ajustée à

pH 7,3 de TEA (TriEthanolAmine), de CaCl_2 et de DTPA. Puis le cadmium, le cuivre, le plomb et le zinc ont été dosés dans les solutions d'extraction par ICP-AES.

3.5.2.2. Extraction par le NH_4NO_3 (nitrate d'ammonium)

Une extraction au NH_4NO_3 a été réalisée pour les échantillons de sol provenant des sites PHYTOPOP par Denis Baize. Une extraction par le NH_4NO_3 est supposée extraire les formes les plus réactives des métaux, celles facilement échangeables et celles présentes dans la solution du sol sous forme ionique (Baize & Tercé, 2002). Pour cela, dix grammes de sol sec (séché à 35 °C) sont mis à agiter (150 trs.min^{-1}) pendant 2 heures à 20 °C en présence de 100 ml d'une solution de NH_4NO_3 à 1 M. Le mélange est alors filtré sur filtre sans cendres (Rotilabo®-Rundfilter, qualitatif, Roth, Allemagne) et le filtrat est dilué, puis acidifié en ajoutant 1 ml d'acide nitrique pur pour 50 ml de filtrat. Des témoins constitués d'eau ultrapure et du même volume d'acide nitrique ont également été réalisés.

3.5.2.3. Extraction par le $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (nitrate de calcium)

Une extraction au $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ a été réalisée pour les échantillons de sols provenant des sites BIOFILTEREE par l'INERIS, un des partenaires du projet. L'extraction par le $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ est décrite comme la méthode permettant d'approcher au mieux la fraction biodisponible (Houba *et al.*, 1996 ; Koster *et al.*, 2005). Soixante grammes de sol sec ont été agités (Heidolph Reax 2) avec 120 ml de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ à 0,01 M pendant 48 heures. Le mélange est alors filtré sur filtre de 0,45 μm (MILLIPORE). Le pH du filtrat est acidifié à 2 pour sa conservation et analysé par ICP-AES.

3.5.3. Analyse des teneurs en éléments minéraux dans les tissus végétaux, fongiques et le sol par ICP-AES (*Inductively-Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry*)

Cette méthode est basée sur le principe que le plasma d'argon échange son énergie avec les atomes présents dans la solution. En retournant à un état moins énergétique, ces atomes émettent des radiations de longueurs d'onde caractéristiques de l'élément dosé. La spectrométrie d'émission plasma permet de doser en routine la plupart des éléments à des concentrations de l'ordre de $1 \mu\text{g.l}^{-1}$, soit de l'ordre de la partie par milliard en masse (ou ppb, *part per billion*). Les analyses en ICP-AES des échantillons biologiques (feuilles, levures, carpophores...) ont été réalisées par Pierre Richaud au CEA de Cadarache.

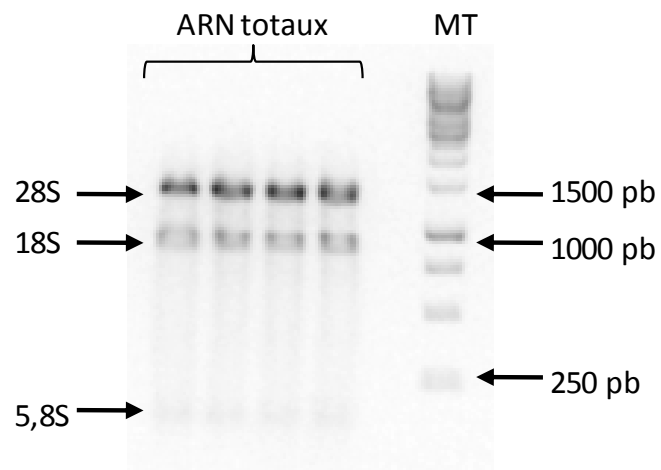


Figure 37 : Exemple de profil électrophorétique d'ARN totaux. MT : marqueur de taille (1 kb, Euromedex) ; les bandes 28S, 18S et 5,8S correspondent respectivement aux ARN ribosomaux 28S (grande sous-unité), 18S (petite sous-unité) et 5,8S.

Une analyse nécessite 100 à 200 mg de matière sèche, que ce soit pour des échantillons de feuilles, de tiges, de racines, de carpophores ou encore de sol. Les échantillons biologiques sont préalablement lavés à l'eau distillée pour éliminer toute contamination de surface, et séchés 3 jours à 65 °C.

Les échantillons sont minéralisés selon la norme NF EN ISO 13656 avec 5 ml de HNO₃ à 70 % dans un four à micro-ondes. Après dilution à une concentration finale de 3,5 % de HNO₃, la teneur en éléments minéraux est déterminée par spectrométrie d'émission atomique couplée à un plasma inductif (Vista MPX, Varian). Le contrôle de la qualité est basé sur l'utilisation de contrôles internes et de solutions étalons certifiées (Astasol-Mix, Analytica Ltd, Prague, République Tchèque) qui permettent d'établir des courbes étalons sur la gamme entière pour chaque élément.

3.5.4. Détermination du pH du sol

Les échantillons de sol (50 g) fraîchement récoltés sont séchés puis mis à agiter à 150 trs.min⁻¹ pendant 20 heures en présence de 50 ml d'eau distillée. Les solutions sont récoltées et centrifugées à 10000 g pendant 15 minutes puis le pH est déterminé.

3.6. Techniques d'extraction et d'analyses des acides nucléiques

3.6.1. Techniques d'extraction des acides nucléiques

3.6.1.1. Extraction d'ADN plasmidique d'*E. coli*

L'extraction d'ADN plasmidique est réalisée à partir de 10ml d'une culture liquide de bactéries *E. coli* en milieu LB (Tableau XV) supplémentée avec de l'ampicilline, afin de favoriser le développement des bactéries ayant intégré le plasmide ; et incubée une nuit à 37 °C. Les bactéries sont récoltées (par centrifugation à 4000 rpm pendant 5 minutes) en phase exponentielle de croissance. L'ADN plasmidique est extrait à l'aide du kit Wizard® Plus SV minipreps (Promega) selon le protocole du fabricant. Pour cela, une première étape de lyse des bactéries est réalisée à l'aide du tampon approprié (contient de la soude pour déstabiliser les lipides des membranes cellulaires) en présence d'une enzyme protéase (permet d'éliminer les protéines). Une étape de centrifugation permet ensuite de séparer l'ADN plasmidique, contenu dans le surnageant, des débris cellulaires et de l'ADN génomique contenus dans le culot. L'ADN plasmidique est ensuite fixé sur une colonne de silice, fixant les acides nucléiques, et lavé plusieurs fois à l'aide d'un tampon contenant de l'éthanol. L'éthanol permet d'éliminer les molécules indésirables fixées à la colonne et permet de maintenir des conditions optimum pour que l'ADN reste lié à la colonne. Les plasmides sont enfin élués de la colonne avec 80 µl d'eau sans DNase. L'eau permet de « décrocher » l'ADN de la colonne. Leurs

Tableau XXII : Composition du tampon TBE 10X

Composé	Concentration
Tris	54 g/l
Borate	27,5 g/l
EDTA	4,65 g/l
Ajuster le pH à 8 à l'aide d'HCl à 12 N	

Tableau XXIII : Composition du tampon de charge (6X)

Composé	Concentration
Tris pH 8	10 mM
EDTA pH 8	1 mM
Bleu de bromophénol	0,25 % w/v
Bleu de xylène cyanol	0,25 % w/v
Glycérol	30 % v/v

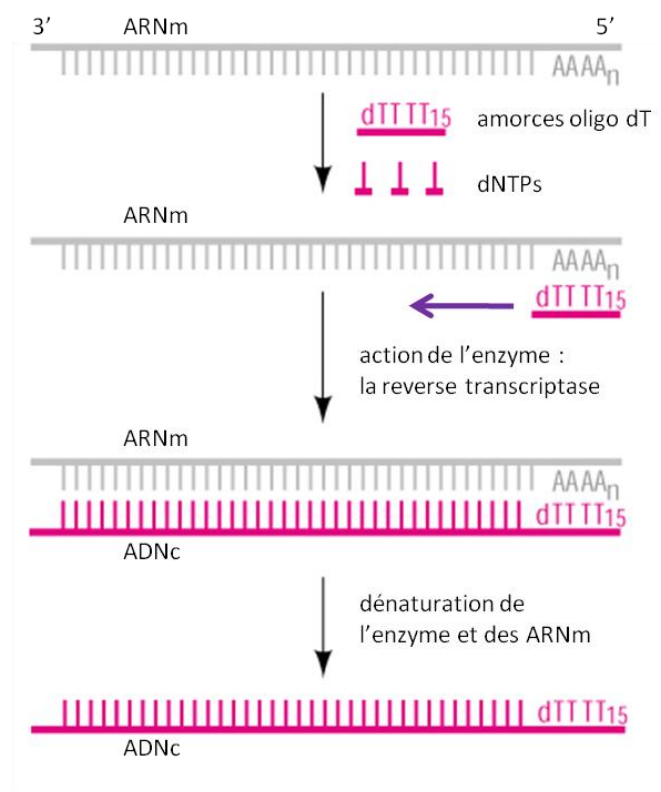


Figure 38 : Principe de la transcription reverse. Des amorces oligodT se fixent sur les queues polyA des ARNm et l'enzyme reverse transcriptase transcrit les ARNm en ADNc. A la fin de la réaction, l'enzyme et les ARNm sont dénaturés.

concentrations sont mesurées par spectrophotométrie. Une unité de DO_{260nm} correspond à $50 \mu g.ml^{-1}$ d'ADN. La solution plasmidique est conservée à $-20^{\circ}C$.

3.6.1.2. Extraction d'ADN génomique

L'ADN génomique total est extrait à l'aide du kit DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN) selon le protocole du fournisseur à partir de 50 à 100 mg de matière fraîche. Le tampon de lyse ainsi que la RNase sont ajoutés avant l'étape de lyse mécanique car nous avons constaté que broyer dans le tampon augmentait l'efficacité de l'extraction. Dans le cas de l'extraction d'ADN génomique de racines d'arbres ou de champignons très pigmentés, dix à vingt milligrammes de PVPP (PolyVinylPolyPyrrolidone) sont aussi ajoutés dans les tubes avant le broyage. Le PVPP présente une forte affinité pour les polyphénols, présents en grande quantité dans les racines ou dans les hyphes de certains champignons. L'ajout de PVPP permet ainsi de neutraliser ces composés qui sont des inhibiteurs de la réaction PCR. Le lysat est ensuite passé sur une première colonne qui permet d'éliminer les débris cellulaires et les protéines. L'éluat est ensuite récolté et transféré sur une deuxième colonne contenant de la silice qui permet de fixer l'ADN génomique. Plusieurs étapes de lavages avec un tampon contenant de l'éthanol sont ensuite réalisées. L'ADN ainsi extrait est enfin récolté lors de l'élution dans $100 \mu l$ de tampon AE préchauffé à $65^{\circ}C$ permettant de « décrocher » l'ADN de la colonne.

3.6.1.3. Extraction d'ARN totaux

L'extraction des ARN totaux est réalisée à l'aide du kit "RNeasy Plant Mini Kit" (Qiagen), en accord avec le protocole du fournisseur, à partir de 50 à 100 mg de mycélium congelé à $-80^{\circ}C$ et broyé à l'aide de billes de tungstène dans un broyeur à billes (MM Retsch 300, Qiagen). Pour les tissus à teneur élevée en métabolites secondaires (mycorhizes), le tampon de lyse est additionné de polyéthylène glycol (PEG 6000 à $20 mg.ml^{-1}$) ce qui permet d'augmenter le rendement d'extraction et de rétro-transcription. Une première colonne permet d'éliminer les débris cellulaires liée à la lyse chimique et mécanique de l'échantillon. Une deuxième colonne contenant de la silice est utilisée afin de fixer les ARN et de les purifier. Une étape de traitement à la DNaseI (Qiagen) est également réalisée sur cette deuxième colonne afin d'éliminer les traces éventuelles d'ADN génomique, qui aurait pu se fixer à la colonne. Les ARN obtenus sont finalement repris dans $40 \mu l$ d'eau stérile sans RNase.

La concentration d'ARN extraite est mesurée par spectrophotométrie, une unité de DO à $260 nm$ correspondant à $40 \mu g.ml^{-1}$ d'ARN. La qualité et la quantité des ARN sont également vérifiées sur gel d'agarose à 1 % à partir d'un dépôt de $1 \mu g$ d'ARN. Les ARN ribosomaux (ARNr) 28S et 18S apparaissent comme deux bandes intenses. La bande correspondant aux ARNr 28S doit être approximativement deux fois plus intense que celle correspondant aux ARNr 18S (Figure 37).

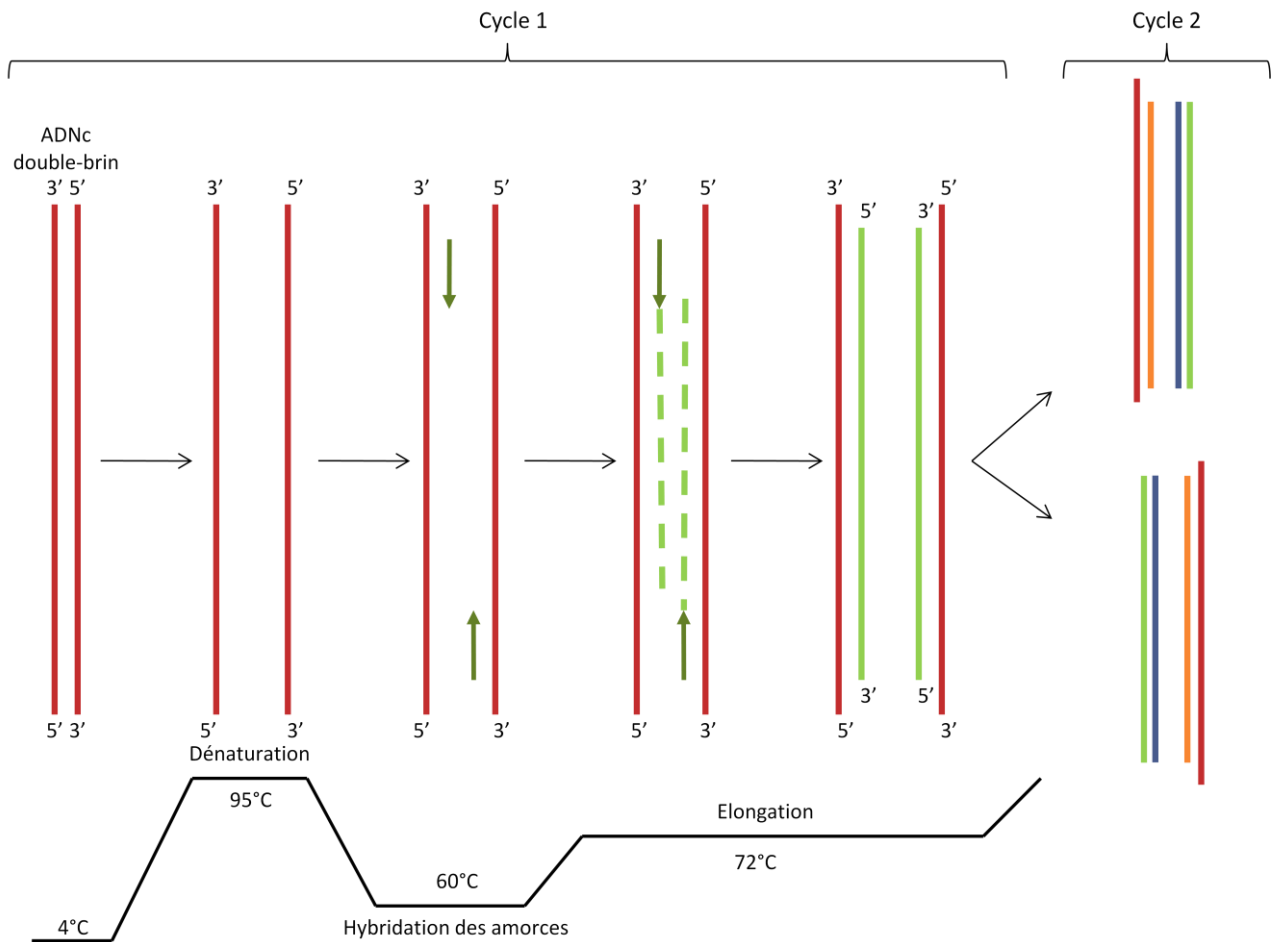


Figure 39 : Principe général de la PCR. Flèches vertes : amorces. En vert : brins néosynthétisés au cycle 1 ; en bleu et orange : brins néosynthétisés au cycle 2. Un cycle de PCR est divisé en trois étapes. En premier lieu, l'étape de dénaturation permet de séparer les deux brins d'ADN. Ensuite, lors de l'étape d'hybridation, les amorces se lient à l'ADN sur leurs séquences complémentaires. Enfin, la Taq polymérase démarre la synthèse des brins néoformés (en vert) et permet leur élongation.

3.6.2. Séparation d'ADN ou d'ARN par électrophorèse en gel d'agarose

La séparation d'acides nucléiques en gel d'agarose est utilisée régulièrement que ce soit pour vérifier la quantité et la qualité d'acides nucléiques extraits ou séparer des fragments d'ADN ou encore pour la visualisation des résultats de RT-PCR.

Généralement, les gels d'agarose sont préparés à 1 % (1 g d'agarose dans 100 ml de solution TBE (Tris-Borate-EDTA) (Tableau XXII)). La concentration d'agarose peut être ajustée en fonction de la taille des fragments à séparer : 2,5 à 3 % pour les petits fragments d'ADN (< 300 pb), ou 0,8 % pour les fragments plus grands (> 5 kb). Du BET (Bromure d'ETHidium), un agent intercalant de l'ADN et de l'ARN, est ajouté à raison de 2 µl pour 100 ml de gel (BET stock à 10 mg/ml). Afin de permettre le dépôt, un tampon de charge est ajouté aux acides nucléiques (Tableau XXIII). Il est composé de glycérol pour leur permettre de tomber au fond du puits de dépôt. Le tampon de charge est également composé de bleu de bromophénol et de xylène cyanol, des colorants qui permettent de suivre le front de migration en temps réel. La migration s'effectue dans une cuve d'électrophorèse horizontale (Sub-Cell GT, Biorad) remplie de tampon TBE, à un voltage généralement compris entre 70 et 100 V.

Après migration, l'ADN est visualisé à l'aide d'un appareil Gel Doc (Biorad) en exposant le gel aux UV, le BET incorporé aux acides nucléiques émet en orange après excitation. Le logiciel Quantity One (Biorad) associé au Gel Doc (Biorad) permet la quantification de l'intensité des bandes d'ADN ou d'ARN.

3.6.3. Purification d'ADN

L'ADN peut être purifié afin d'éliminer des composés inhibiteurs (enzymes, sels) pour la suite des manipulations. Le kit GENECLEAN® *Turbo* (MP Probiomedicals) permet de purifier l'ADN génomique ou des produits PCR directement ou à partir de gel d'agarose. De la même façon que pour les autres kits, l'ADN est fixé spécifiquement sur une colonne de silice, lavé puis élué à l'aide de 30 µl d'eau sans DNase.

3.6.4. Transcription reverse

Cette méthode permet d'obtenir des ADN complémentaires (ADNc) à partir d'ARN totaux. La reverse transcriptase est une ADN polymérase ARN dépendante. Afin d'amplifier spécifiquement les ARN messager (ARNm), des amorces oligo dT qui se fixent aux queues polyA des ARNm sont ajoutées au mélange réactionnel (Figure 38). Les ARNm sont convertis en ADNc en utilisant le kit Masterscript™ (5PRIME) selon les instructions du fournisseur. Pour les analyses de RT-PCR, 1 µg d'ARN totaux sont utilisés par essai de rétrotranscription. La réaction débute par la dénaturation de 1 µg d'ARN en les incubant avec le mix de dNTP

Tableau XXIV : Amorces utilisées au cours de cette thèse

Nom	Utilisation	Séquence	Orientation	Tm
AML1	Identification ITS gloméromycètes	ATCAACTTTCGATGGTAGGATAGA	forward	55 °C
AML2	Identification ITS gloméromycètes	GAACCCAAACACTTTGGTTTCC	reverse	55 °C
ITS1F	Identification ITS basidiomycètes	CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA	forward	55 °C
ITS4B	Identification ITS basidiomycètes	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG	reverse	55 °C
ITS1	Identification ITS champignons	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	forward	55 °C
ITS4	Identification ITS champignons	TCCTCCGCTTATTGATATGC	reverse	55 °C
SP6	PCR sur vecteur pGEMT	TATTTAGGTGACACTATAGAAT	forward	55 °C
T7	PCR sur vecteur pGEMT	GTAATACGACTCACTATAGGGC	reverse	55 °C
L2	PCR sur vecteur pFL61	CAGATCATCAAGGAAGTAATTATCTAC	forward	55 °C
R2	PCR sur vecteur pFL61	GCGTAAAGGATGGGGAAAGAGAAAAAG	reverse	55 °C
Lb-UbqF	RT-PCR	AGCAGCTTGAAGATGGTCGT	forward	60 °C
Lb-UbqR	RT-PCR	AGGTGAAGGGTGCTTTCCTT	reverse	60 °C
LbZipA-1285	RT-PCR	ATCGGCCTCCTCACCCACCCCAAAA	forward	60 °C
LbZipA-1286	RT-PCR	GTTCAGATGAGTTGGACAGAGTCGATC	reverse	60 °C
LbZipA-443	clonage pFL61	ATGTCATCCGATTGTAGTACCGTC	forward	58 °C
LbZipA-444	clonage pFL61	AAGCTAGGCCATTTCCCAAGGAG	reverse	58 °C
LbZipA-551	clonage pYes2-GFP, HindIII	CCCAGGTTATGTCATCCGATTGTAGTAC	forward	60 °C
LbZipA-553	clonage pYes2-GFP, BamHI (no stop)	CCCGGATCCcGGCCATTTCCCAAGGAGC	reverse	60 °C
LbZipA-1374	mutation K119R	TGGGGAACATCGAAGCTCAAGAAAAT	forward	60 °C
LbZipA-1375	mutation K119R	ATTTCTTGAGCTCGATGTTCCCA	reverse	60 °C
LbZipA-1376	mutation S176A	ACTCTTTTGATGACGCGGCGGCAAC	forward	60 °C
LbZipA-1377	mutation S176A	GTTGCCGCCGCTCATCAAAAGAGT	reverse	60 °C
LbZipB-1287	RT-PCR	TACGACACTCTCCTTGCTCCCTC	forward	60 °C
LbZipB-1288	RT-PCR	TCCTCTCCGACTCAACTTCTCAATG	reverse	60 °C
LbZipB-445	clonage pFL61	ATGTCGTCTGATGGCTCTGCCTGTAA	forward	58 °C
LbZipB-446	clonage pFL61	TTATGCCCACTTTCCAAGGAGTGC	reverse	58 °C
LbZipB-554	clonage pYes2-GFP, BamHI	CCCGGATCCATGTCGTCTGATGGCTCTG	forward	60 °C
LbZipB-556	clonage pYes2-GFP, BamHI (no stop)	CCCGGATCCcTGCCCACTTTCCAAGGAGT	reverse	60 °C
LbZipB-1378	mutation K122R	TGGGGAACGTCGAAGCTCAAGGAAGT	forward	60 °C
LbZipB-1379	mutation K122R	ACTTCCTTGAGCTCGACGTTCCCA	reverse	60 °C
LbZipB-1380	mutation S179A	ACTCTCTCGAGGACGCGCAACAAC	forward	60 °C
LbZipB-1381	mutation S179A	GTTGTTGCCGCTCCTCGAGAGAGT	reverse	60 °C
LbZipC-728	RT-PCR, clonage pFL61	ATACAATGCCCGCCGTCCTCGCAAA	forward	60 °C
LbZipC-729	RT-PCR, clonage pFL61	TCACTCGCCTAACCCAACAAGTAC	reverse	60 °C
LbZipC-776	clonage pYes2-GFP, HindIII	CCCAGGTTATGCCCCCGTCCCCTCGCA	forward	60 °C
LbZipC-778	clonage pYes2-GFP, BamHI (no stop)	CCCGGATCCcCTCGCCTAACCCAACAAGT	reverse	60 °C
LbZipD-447	RT-PCR, clonage pFL61	ATGTTATCTCGCAATACCCGCTACTC	forward	60 °C
LbZipD-448	RT-PCR, clonage pFL61	GAGGCTATTCAATCCAAGCGACCAAA	reverse	60 °C
LbZipD-557	clonage pYes2-GFP, HindIII	CCCAGGTTATGTTATCTCGCAATACCCG	forward	60 °C
LbZipD-559	clonage pYes2-GFP, BamHI (no stop)	CCCGGATCCcTTTCAATCCAAGCGACCAAA	reverse	60 °C
LbZipE-449	RT-PCR	ATGCTTCTACAGCTCGTCGTGATGT	forward	60 °C
LbZipE-450	RT-PCR	TCAATGACCACGCCCAAGGAACGT	reverse	60 °C
LbCdfA-1337	RT-PCR	AGGCCTCTGCATCCCTTCTGGC	forward	64 °C
LbCdfA-1338	RT-PCR	GTACCAGCTTTGGTGAGGTGATCTTTTCT	reverse	64 °C
LbCdfB-1339	RT-PCR	GACAGCGTGTTTCGCATAAAAGGGACTTG	forward	64 °C
LbCdfB-1340	RT-PCR	GATGTATATTGCGTTTCATCAACGTGACTATGA	reverse	64 °C
LbCdfC-1326	RT-PCR	CGACAGCTTCCATATGCTCA	forward	64 °C
LbCdfC-1342	RT-PCR	CAATCCCTCGATCCAATCGTACGA	reverse	64 °C
LbCdfD-732	RT-PCR	AGGTAGTATGCTGTGCCAGAC	forward	64 °C
LbCdfD-1329	RT-PCR	ATTGGGGAATTTGGAAAAGG	reverse	64 °C
LbCdfE-1344	RT-PCR	ATGATCAATCGAACTAACCTTTGGAGACG	forward	64 °C
LbCdfE-1345	RT-PCR	GTTTCTCATGCTCGTGTGCCCC	reverse	64 °C

Les différents couples d'amorces utilisés sont donnés sur deux lignes consécutives, la forward sur la première ligne et la reverse sur la deuxième.

Les codons « START » sont signalés en rouge, les « STOP » en bleu, les sites de restriction sont signalés en vert et les bases supplémentaires pour garder le même cadre de lecture sont signalées en violet, les bases modifiées afin de réaliser une mutagenèse dirigée sont signalées en orange.

et les oligo dT pendant 5 minutes à 65 °C. Le mélange est ensuite rapidement refroidi pour éviter la reformation de structures secondaires. A ce moment, un deuxième mix, contenant l'enzyme : la reverse transcriptase, le tampon adapté à la réaction et un inhibiteur de RNase, est ajouté. La synthèse des brins d'ADNc se déroule à 42 °C pendant 1 heure 30, puis est arrêtée par chauffage à 85 °C de la solution pendant 5 minutes. Les ADNc sont ensuite refroidis et stockés à -20 °C.

3.6.5. Amplification de l'ADN par PCR

La technique PCR, pour *Polymerase Chain Reaction*, a été pour la première fois décrite en 1985 (Saiki *et al.*, 1985). Elle repose sur la capacité de synthèse d'un fragment d'ADN déterminé in vitro à l'aide d'une polymérase thermostable : la Taq polymérase. Pour catalyser cette synthèse, cette enzyme a besoin d'une amorce : un fragment oligonucléotidique complémentaire à une région de l'ADN à amplifier. Un cycle d'amplification est composé de trois étapes : une dénaturation thermique des brins d'ADN matriciel, une hybridation des amorces à leur séquence cible et une élongation à partir des amorces par l'action de la Taq polymérase (Figure 39).

3.6.5.1. Les amorces nucléotidiques

La spécificité de la réaction PCR repose sur la spécificité d'hybridation entre les amorces oligonucléotidiques et leur séquence cible sur l'ADN matriciel. Pour cela différents critères ont été définis dans le choix des amorces : une longueur minimale en dessous de laquelle l'hybridation n'est plus fiable (20 nucléotides) ; une absence de complémentarité entre les amorces ; un Tm théorique proche pour que la température d'hybridation choisie soit adéquate pour les deux amorces. Le Tm est la température de fusion qui correspond à la température pour laquelle les deux brins d'ADN sont associés par 50 % de leurs séquences complémentaires. Chaque couple d'amorces utilisé pour l'amplification de chaque gène est testé préalablement sur l'ensemble des gènes appartenant à la même famille afin de s'assurer de la bonne spécificité des amorces utilisées. Le Tableau XXIV résume les différentes amorces utilisées au cours de cette thèse.

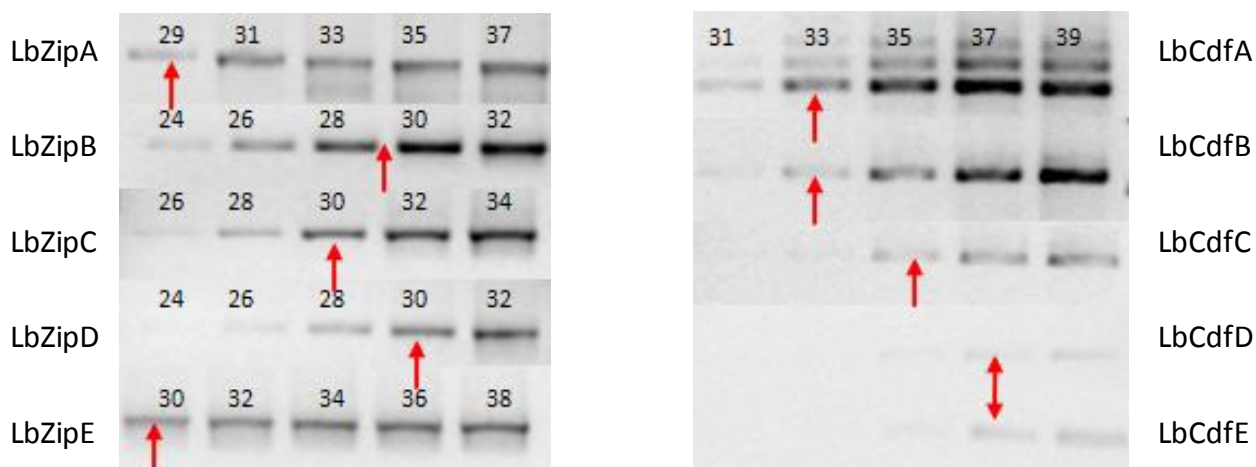


Figure 40 : Test du nombre optimal de cycles d'amplification par PCR pour l'amplification des ADNc Zips et Cdfs de *L. bicolor*. Les flèches rouges indiquent pour chaque gène le nombre de cycles d'amplification choisi. Les chiffres au-dessus des bandes indiquent le nombre de cycles PCR réalisés pour obtenir l'amplification observée. Une saturation du signal est visible lorsque le nombre de cycles est trop élevé.

Tableau XXV : Conditions de RT-PCR pour l'amplification des ADNc de *Laccaria bicolor*

Composition du milieu réactionnel		Conditions d'amplification		
Composés	Volume pour 25 µl	Etapes	Durée	Température
Eau stérile	20,25 µl	Dénaturation initiale	2 min	95 °C
Tampon 10X	2,5 µl	Dénaturation	30 sec	94 °C
dNTP 10 mM	0,5 µl	Hybridation	30 sec	variable*
Amorces F+R 10µM	1 µl	Elongation	1 min/kb	72 °C
Taq Paq 5000 5U/µl	0,25 µl			
ADNc	0,5 µl			
Huile minérale	5 µl	Elongation finale	2 min/kb	72 °C

* La température d'hybridation dépend du Tm des amorces utilisées (voir tableau XXIII).

** Voir figure 41 pour le nombre de cycles choisis pour chaque gène

3.6.5.2. Composition d'un mélange réactionnel de PCR

La composition exacte d'un mélange de PCR varie en fonction de l'enzyme Taq polymérase utilisée. En revanche, un mélange de PCR nécessite toujours les mêmes ingrédients :

- de l'eau sans DNase ;
- du tampon spécifique à chaque enzyme contenant les sels nécessaires à l'action de la Taq polymérase, notamment du Mg^{2+} , le cofacteur de l'enzyme ;
- les amorces oligonucléotidiques, « départ » de l'amplification pour la Taq polymérase ;
- les dNTPs, incorporés au cours de l'élongation ;
- la matrice ADN (ADNc, plasmide, lysat cellulaire...).

3.6.5.3. Différentes enzymes Taq ADN polymérases utilisées et leurs applications

L'enzyme couramment utilisée pour les PCR « standards » est la Taq polymérase Paq 5000™ (Stratagene).

3.6.5.3.1. Mesure du taux de transcrits par RT-PCR

Pour la RT-PCR, 0,5 µl d'ADNc matrice (soit 25 ng) est utilisé pour la réaction de PCR. Le nombre de cycles de PCR a été optimisé pour l'étude de l'expression de chaque gène (Figure 40) afin d'être dans les conditions permettant de quantifier les ADNc obtenus et de renseigner s'il y a une différence quantitative au niveau du taux d'expression des gènes. En effet, en pratique, la production des amplifiats par PCR suit une courbe de type sigmoïde avec trois phases clés : i) le bruit de fond où la quantité d'ADN amplifiée est trop faible pour être détectée ; ii) la phase exponentielle où la quantité d'ADN produit est doublée à chaque cycle de PCR ; iii) la phase stationnaire ou de plateau lorsque les produits nécessaires à l'amplification contenus dans le milieu réactionnel commencent à s'épuiser. Il est alors nécessaire de se situer en début de phase exponentielle, dans les meilleures conditions d'amplification, afin d'être certain de correctement visualiser les différences de niveaux d'expression entre les conditions étudiées. De plus, un contrôle interne est nécessaire, à savoir un couple d'amorces s'hybridant sur l'ADNc d'un gène codant l'ubiquitine (Ubq) dont l'expression ne varie pas quelles que soit les différentes conditions testées. Les résultats sont quantifiés et rapportés au taux d'expression du gène de l'ubiquitine. La Taq polymérase utilisée est la Taq Paq 5000™ (Stratagene) dont les conditions d'utilisation et d'amplification sont données dans le tableau XXV. Afin d'éviter l'évaporation des produits PCR au cours de la réaction, de l'huile minérale est ajoutée en surface de l'échantillon.

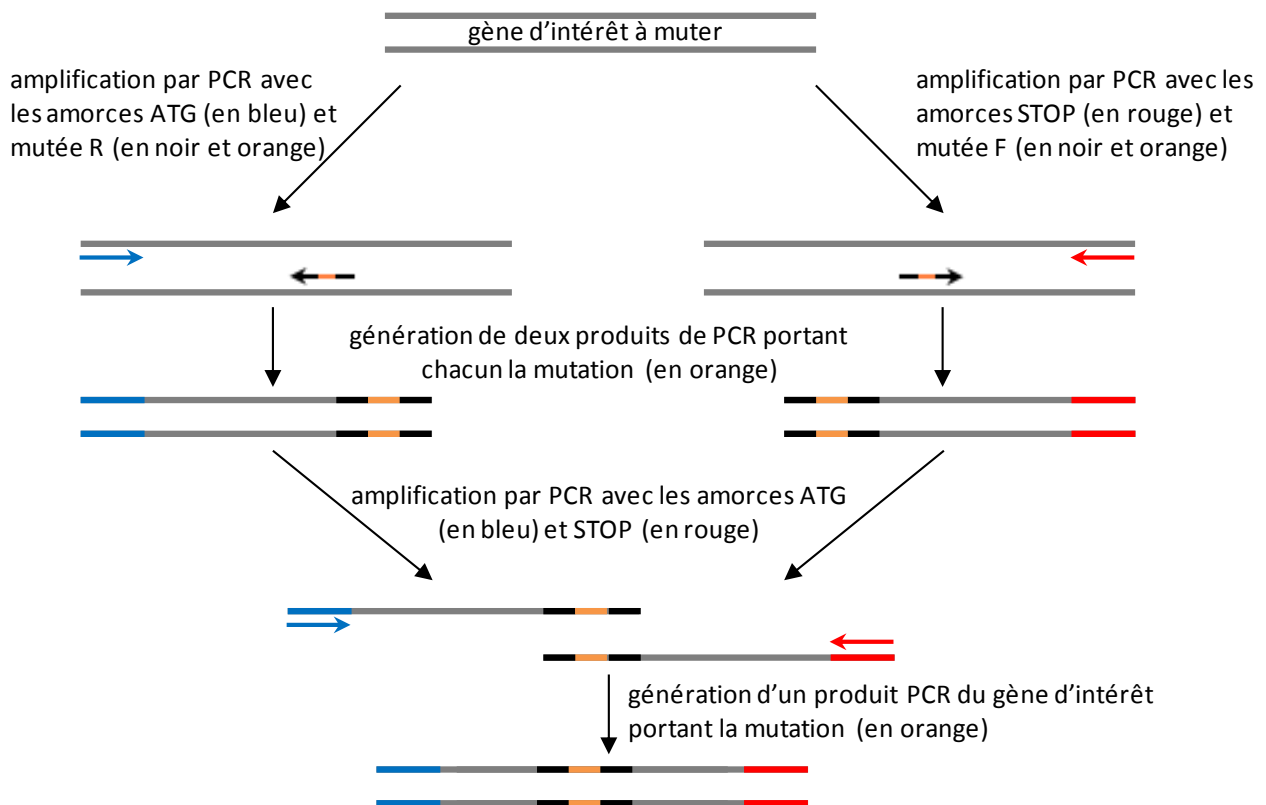


Figure 41 : Principe de la mutagenèse dirigée par la technique dite de « *Splicing by Overlap Extension PCR* » (SOE PCR). Afin d'insérer une mutation dans un gène d'intérêt, deux étapes d'amplifications par PCR sont nécessaires. Lors de la première étape, deux produits PCR portant la mutation, complémentaires par une extrémité, sont générés en utilisant le gène d'intérêt comme matrice. Lors de la deuxième étape, le gène d'intérêt portant la mutation est reconstitué en pleine longueur en utilisant les deux produits PCR précédemment obtenus comme matrice.

3.6.5.3.2. PCR haute-fidélité

- Clonage de gènes d'intérêt

La PCR haute-fidélité est réalisée dans les expériences de clonage de gènes d'intérêt. Elle permet d'amplifier l'ADN avec moins d'erreurs de séquences que lorsqu'une polymérase classique est utilisée. La fidélité des enzymes est permise grâce à une activité correctrice ($3' \rightarrow 5'$ exonucléase). Le brin d'ADN néosynthétisé est ainsi corrigé grâce à l'activité exonucléasique. Ainsi, les polymérases haute-fidélité incorporent 50 fois moins d'erreurs qu'une polymérase standard. Dans le cadre de ce travail, la Taq polymérase Phusion (Finnzymes) a été utilisée dont le taux d'erreur est de $4,4 \cdot 10^{-7}$. Cette enzyme est plus stable à haute température ce qui permet de restreindre l'étape de dénaturation, elle sera de 10 secondes à 98 °C au lieu de 30 secondes habituellement à 95 °C. La Taq polymérase Phusion est une enzyme qui a été modifiée par ajout d'un domaine de liaison à l'ADN, ce qui permet d'augmenter la processivité de l'enzyme. La vitesse d'élongation en est augmentée et est de 15 à 30 s/kb, ce qui rend cette enzyme particulièrement intéressante pour l'amplification d'ADNc pleine longueur.

- Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée permet de muter une séquence d'ADN à un endroit précis et nécessite donc d'utiliser une polymérase haute-fidélité. Cette méthode consiste à modifier une base précise de la séquence d'intérêt afin de modifier un acide aminé dans la séquence protéique lors de la traduction. Elle permet de mettre en évidence l'importance d'un ou de plusieurs acides aminés essentiels pour la fonction ou la régulation d'une protéine donnée. La technique utilisée est basée sur la technique dite de « *Splicing by Overlap Extension PCR* » (SOE PCR) qui permet de fusionner des fragments d'ADN, ces derniers s'hybridant entre eux grâce à des séquences complémentaires (Figure 41).

Pour générer une mutation ponctuelle, deux amorces complémentaires en *forward* et en *reverse* sont créées en prenant soin d'insérer la base mutée au milieu de la séquence de l'amorce. Ensuite, deux amplifications par PCR sont réalisées avec comme matrice le gène d'intérêt à modifier en utilisant d'une part, le couple « amorce *forward* portant le codon ATG du gène et amorce *reverse* mutée » ; et d'autre part, le couple « amorce *forward* mutée et amorce *reverse* portant le codon STOP du gène ». Les deux produits d'amplification obtenus portent alors chacun la mutation désirée et sont complémentaires, leurs séquences étant chevauchantes au niveau de la mutation. Ces deux produits sont ensuite liés entre eux par une étape d'amplification PCR réalisée à l'aide du couple « amorce *forward* portant le codon ATG du gène et amorce *reverse* portant le codon STOP du gène ». Le produit d'amplification généré porte alors la mutation et la séquence complète du gène.

Tableau XXVI : Conditions d'amplification avec l'ADN polymérase PhireII®

Composition du milieu réactionnel		Conditions d'amplification		
Composés	Volume en µl	Etapes	Durée	Température
Eau stérile	17	Dénaturation initiale	30 sec	98 °C
Tampon 10X	5	Dénaturation Hybridation Elongation	5 sec	98 °C
dNTP 10 mM	0,5		5 sec	55 °C
Amorces F+R 10 µM	1		20 sec	72 °C
ADNg dilué au 1/25 ^{ème}	1			
Taq ADN polymérase PhireII®	0,5			
Volume total	25	Elongation finale	1 min	72 °C

Tableau XXVII : Enzymes de restriction utilisées pour la RFLP en fonction des amorces choisies

Couple d'amorces	Enzyme de restriction	Température
AML1-AML2	Hsp92II et HinfI	37 °C
ITS1-ITS4	Mbol et TaqαI	37 °C et 65 °C
ITS1F-ITS4B	Mbol et TaqαI	37 °C et 65 °C

Tableau XXVIII : Conditions de digestion des séquences ITS en RFLP

Composés	Volume (volume final = 15 µL)
Produit PCR à digérer	5 µL
Tampon de l'enzyme 10X	1,5 µL
BSA (sauf pour Mbol) 100X	0,15 µL
Enzyme (1 U/µl)	0,1 µL
H ₂ O	qsp 15 µL
Incubation pendant 1 h à 37 °C (sauf TaqαI à 65 °C), puis 10 min à 65 °C pour arrêter l'activité enzymatique (ajout de 3 µL de tampon de charge 6X pour l'électrophorèse)	

3.6.5.3.3. PCR sur colonies

La PCR sur colonies, réalisée avec une polymérase standard, est une technique qui permet d'amplifier de façon simple de l'ADN (génomique ou plasmidique) directement à partir de microorganismes sans réaliser d'extraction d'ADN au préalable. L'étape de dénaturation initiale est allongée à 5 minutes, afin de lyser les micro-organismes par l'effet de la chaleur et rendre ainsi l'ADN accessible. En général, cette technique est utilisée afin de s'assurer que des transformants contiennent bien la construction plasmidique d'intérêt.

3.6.5.3.4. Identification moléculaire de micro-organismes par amplification des régions ITS

- Amplification des séquences ITS

Afin d'identifier un micro-organisme, la région ITS du génome de cet organisme est amplifiée. Les régions ITS (*Internal Transcribed Spacer*) sont les séquences situées entre les gènes codant les sous-unités des ARN ribosomiaux (ARNr). Ces gènes sont en général très conservés d'un genre à l'autre et au sein d'une même espèce. Ceci permet de générer des amorces dites « universelles ». En revanche, les régions ITS sont peu conservées et varient d'une espèce à l'autre au sein d'un même genre, voire parfois d'une souche à l'autre. Leur amplification et séquençage fournissent des données qui permettent alors de discriminer le genre, l'espèce et parfois la souche du micro-organisme étudié par comparaison avec des bases de données.

Cette méthode a été utilisée pour l'identification de champignons en interaction avec les racines de peupliers ainsi que pour l'identification de champignons en culture pure isolés à partir de racines ou de carpophores. Les ADNg de racines de peupliers ou de mycélium contiennent de nombreux inhibiteurs de PCR, ils ont donc été dilués au 25^{ème} afin de limiter la quantité d'inhibiteurs tout en conservant une quantité d'ADN suffisante pour l'amplification. De même, l'ADN polymérase Phire II® (Finnzymes) a été utilisée pour les amplifications car elle est peu sensible aux inhibiteurs de PCR. Les couples d'amorces utilisés et les conditions de PCR pour amplifier les régions ITS sont résumés dans les tableaux XXIV et XXVI.

- Discrimination des clones par « Polymorphisme de longueur des fragments de restriction » (RFLP)

Lorsque l'amplification des séquences ITS est réalisée à partir de racines, le produit d'amplification est un mélange de séquences provenant de divers micro-organismes. Afin de les séparer, une étape de sous-clonage dans un vecteur (pGEM®-T (Promega)) est nécessaire, une seule séquence étant insérée par plasmide. Ensuite, des bactéries sont transformées avec ces plasmides, chaque bactérie intégrant un seul

plasmide, puis les séquences ITS sont ré-amplifiées par PCR sur colonies. 48 clones par échantillon ont été analysés permettant d'obtenir un maximum de profils RFLP différents.

Enfin, les produits de PCR sur colonies sont digérés par des enzymes de restriction (Tableaux XXVII, XXVIII) capables de reconnaître et de couper des séquences spécifiques d'ADN. Les fragments de restriction sont séparés selon leur taille par électrophorèse (gel d'agarose à 2,6 %). Une photographie des gels est obtenue avec le logiciel Geldoc® afin de comparer les différents profils obtenus. L'ADN plasmidique d'un exemplaire de chaque profil différent obtenu est extrait puis envoyé en séquençage.

3.6.6. Séquençage de l'ADN

Le séquençage de produits d'amplification PCR ou d'ADN plasmidique a été réalisé par la société Beckman Coulter Genomics (Angleterre).

3.6.7. Analyses de séquences à l'aide d'outils de bioinformatique

La plupart des travaux bioinformatiques a porté sur l'analyse des séquences nucléotidiques et protéiques des gènes et protéines étudiés. Différents programmes ont été utilisés, dont les principaux ont permis : la traduction d'une séquence nucléotidique en séquence protéique²⁵, la comparaison de séquences d'intérêt à des bases de données de séquences nucléotidiques et protéiques par BLAST²⁶, l'accès aux génomes de divers organismes²⁷, l'alignement de séquences protéiques ou nucléotidiques²⁸ et l'accès au génome de la levure *S. cerevisiae*²⁹.

L'analyse de la structure des gènes Zips et Cdfs de *L. bicolor* a été réalisée grâce à la comparaison des séquences des ADNg et des ADNc de ces gènes, disponibles sur le site du JGI (*Joint Genome Institute*)³⁰, permettant de discriminer les exons des introns (uniquement présents dans les séquences des ADNg). L'analyse de la topologie des protéines ZIPs et CDFs a été réalisée grâce au logiciel TMHMM³¹ qui permet de prédire la structure secondaire des protéines. En effet, les domaines transmembranaires sont caractérisés par la présence majoritaire d'acides aminés hydrophobes qui vont former dans la membrane des structures appelées hélices.

Les comparaisons de séquences protéiques et nucléotidiques ont été réalisées à l'aide de l'algorithme BLAST (*Basic Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1997). Les programmes BlastP, BlastN et

²⁵ <http://www.expasy.ch/tools/dna>

²⁶ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

²⁷ <http://www.jgi.doe.gov>

²⁸ <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>

²⁹ <http://www.yeastgenome.org/>

³⁰ <http://genome.jgi-psf.org/Lacbi2/Lacbi2.home.html>

³¹ <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

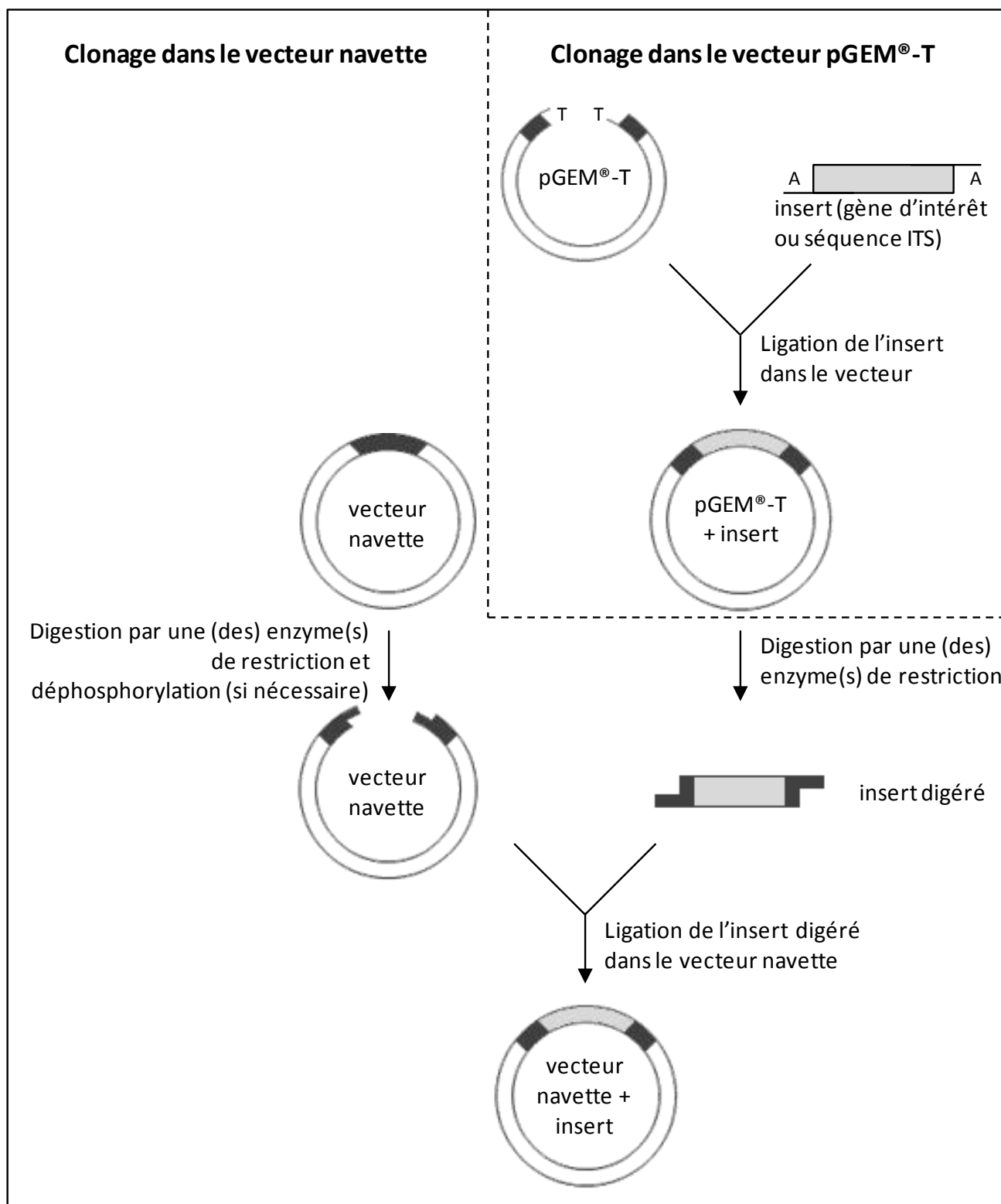


Figure 42 : Principe général du sous-clonage d'un gène ou d'une séquence d'intérêt dans les vecteurs pGEM®-T ou pGEM®-T easy et de son clonage dans les vecteurs navettes pFL61 ou pYES2-GFP. Les multi-sites de clonage des plasmides contenant les séquences reconnues par les enzymes de restriction sont représentés en noir.

BlastX comparent respectivement les séquences protéiques, les séquences nucléotidiques et les produits de la traduction de la séquence étudiée dans les six phases de lecture possible avec les séquences appropriées dans les bases de données. Les banques de données consultées sont des banques non redondantes de séquences nucléotidiques et protéiques du *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Les alignements multiples ont été réalisés en utilisant la méthode *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1994). Les analyses phylogénétiques ont été réalisées à l'aide du logiciel MEGA version 4 (Tamura *et al.*, 2007). Ces dernières utilisent la méthode du *Neighbor-Joining* (NJ) de ce logiciel en incluant les options *Pairwise deletion* et *Poisson correction*. Les tests de bootstrap ont été réalisés à partir de 1000 répétitions.

Afin de discriminer les différentes OTUs (*Operational Taxonomic Units*) à partir des séquences ITS amplifiées des racines de peupliers, les outils blastclust³² et rapidOTU (Legrand *et al.*, 2008) ont été utilisés en plus des alignements de séquences avec MEGA4. Les distances d'évolution ont été calculées à l'aide de la méthode du paramètre Kimura-2 et le seuil d'identité pour lequel deux séquences étaient considérées comme identiques a été fixé à 97 %.

3.7. Techniques de clonage

Le principe général de la technique de clonage est présenté dans la figure 42. Un insert (séquence ou gène d'intérêt) est intégré dans le vecteur par ligation, dans certains cas une étape préliminaire de préparation du vecteur et/ou de l'insert est nécessaire. Ensuite, une transformation de bactéries permet d'intégrer un produit de ligation par bactérie et de multiplier le vecteur. Une PCR sur colonies permet ensuite de vérifier l'insertion du fragment d'intérêt. Enfin, une extraction d'ADN plasmidique permet ensuite de récupérer les vecteurs ayant intégré l'insert et les plasmides sont ensuite séquencés.

3.7.1. Préparation du vecteur

Les plasmides pGEM®-T et pGEM®-T easy (Promega) utilisés pour le clonage des fragments PCR sont fournis dans les kits "pGEM®-T (Easy) Vector Systems" (Promega) et sont prêts à l'emploi.

Concernant les autres vecteurs, ceux-ci sont linéarisés par la (ou les) enzyme(s) de restriction choisie(s) puis éventuellement déphosphorylés (afin d'éviter toute religation du vecteur sur lui-même dans le cas où une seule enzyme de restriction est utilisée). 2 µg d'ADN plasmidique sont digérés pendant 3 heures dans un volume de 50 µl avec l'(les) enzyme(s) de restriction choisie(s) (1U.µg⁻¹ d'ADN) (Promega), puis la (les) enzyme(s) sont inactivées par incubation 10 minutes à 65 °C dans un bain à sec. Ensuite, si nécessaire, le tampon 10X de la phosphatase alcaline d'intestin de veau (Promega) et la phosphatase alcaline (1U.µg⁻¹ d'ADN) sont ajoutés au mélange pour un volume final de 75 µl. La réaction se déroule à 37 °C

³² <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/blastclust>

Tableau XXIX : Composition des milieux SOB et SOC

Composé	Concentration finale	
	Milieu SOB	Milieu SOC
Bactotryptone	20 g/l	20 g/l
NaCl	0,5 g/l	0,5 g/l
Extrait de levures	5 g/l	5 g/l
KCl	0,2 g/l	0,2 g/l
MgSO ₄	-	10 mM
MgCl ₂	-	10 mM
Glucose	-	20 g/l
Autoclaver 20 min à 120 °C		

pendant 1 heure. Le vecteur digéré (et éventuellement déphosphorylé) est purifié sur gel d'agarose à 1 % puis à l'aide du kit GENECLAN® *Turbo* (MP Probiomedicals).

3.7.2. Préparation du fragment à cloner

Les produits d'amplification destinés à être clonés dans les vecteurs pGEM®-T ou pGEM®-T easy, sont purifiés directement ou après séparation sur un gel d'agarose, à l'aide du kit GENECLAN® *Turbo* (MP Probiomedicals). Une étape d'ajout de dATP à l'aide de la Taq polymérase Paq 5000™ est parfois nécessaire car les polymérases Phire II et Phusion (Finnzymes) ayant une activité exonucléasique 3'→ 5' retirent les dATP. Le mix (volume final de 50 µl) contient 44 µl de produits PCR purifiés, 5 µl de tampon pour la Taq polymérase, 0,2 µl de Taq polymérase Paq 5000™, 0,8 µl de dATP ; et est incubé 15 minutes à 70 °C. La purification des échantillons d'ADN est nécessaire avant et après l'ajout des dATP.

Les produits d'amplification destinés à être clonés dans les vecteurs pYES2, PYES2-GFP ou pFL61 sont purifiés comme décrit précédemment et hydrolysés par la (ou les) enzyme(s) de restriction adéquate(s) selon le même protocole que pour la préparation des vecteurs.

3.7.3. Ligation

Les ligations sont généralement effectuées avec un rapport molaire insert/vecteur d'environ 3 pour 1. La quantité d'insert requise est alors calculée à partir de la formule suivante :

quantité d'insert en ng = (quantité de vecteur en ng x taille d'insert en kb)/taille du vecteur en kb x 3/1

Une réaction de ligation classique nécessite 1 µl de tampon de ligation 10X (Promega), 1 µl de plasmide et 1 µl de ligase (Promega) dans le mélange de ligation. Les volumes d'eau stérile et d'insert sont ajustés en fonction du rapport molaire choisi pour un volume final de réaction de 10 µl. L'étape de ligation se fait à 4 °C sur une nuit.

3.7.4. Transformation des bactéries

3.7.4.1. Préparation de bactéries thermocompétentes

La souche bactérienne *Escherichia coli* DH5α est cultivée dans 800 ml de milieu SOB (Tableau XXIX) à 20 °C. Lorsque la culture est en phase exponentielle de croissance ($DO_{600nm} = 0,6$), la croissance est arrêtée en plaçant la culture dans la glace. Après plusieurs étapes de mise en suspension/centrifugation (2500g) d'abord dans du tampon TB (10 mM HEPES, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl) puis dans 16 ml d'un

Tableau XXX : Composition des solutions de transformation des levures

Solution mère	Composés	Concentration stock	Concentration finale
TE (10X)	Tris HCl pH 7,5	100 mM	10 mM
	EDTA	10 mM	1 mM
AcLi (10X)	Acétate de lithium pH 7,5	1 M	100 mM
PEG	Polyéthylène glycol 4000	50 % (w/v)	40 %

Tableau XXXI : Composition du milieu SD-ura

Composé	Concentration finale
YNB (<i>Yeast Nitrogen Base</i>) sans acides aminés et sans NH_4^+ (US Biological)	1,72 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 g/l
<i>Synthetic Drop-out without uracile</i> (Sigma)	1,92 g/l
Glucose ou galactose	20 g/l
Ajuster le pH à 5,8	
Agar	20 g/l
Autoclaver 20 min à 120 °C	

Tableau XXXII : Composition du milieu minimum (MM)

Composés			Quantité pour 1 l
Composés du milieu de base			
MgSO ₄ , 7H ₂ O			0,7 g
KH ₂ PO ₄			1 g
CaCl ₂ , 2H ₂ O			0,4 g
NaCl			0,5 g
K ₂ SO ₄			1 g
Acide citrique			10,5 g
KOH			9 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			5 g
Glucose (ou galactose)			20 g
<i>Synthetic Drop-out without uracile</i> (Sigma)			1,92 g
Ajuster le pH à 5,8			
Agar			20 g
Autoclaver 20 minutes à 120 °C			
Solution de vitamines filtrée (20 µm)			10 ml
Composition pour 100 ml de solution mère	Biotine	25 µg	
	Thiamine	10 mg	
	Myo-inositol	100 mg	
	Panthoténate de calcium	20 mg	
	Pyredoxine	10 mg	
Solution de métaux* filtrée (20 µm)			2 ml
Composition pour 100 ml de solution mère	H ₃ BO ₃	1 mg	
	CuSO ₄ , 7H ₂ O	0,1 mg	
	KI	0,2 mg	
	Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,4 mg	
	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	1,4 mg	
	MnSO ₄	40 mg	
	FeCl ₃	500 mg	

* des solutions de métaux sans ZnSO₄ ou FeCl₃ ont été préparées en fonction de la levure mutante considérée

mélange de tampon TB et DMSO (DiMéthyl SulfOxyde) à 7 %, des aliquotes de 50 µl sont congelées dans de l'azote liquide et conservées à -80 °C.

3.7.4.2. Transformation des bactéries par choc thermique

Pour l'étape de transformation, les bactéries (DH5α) compétentes sont décongelées dans de la glace, 5 µl de mélange de ligation y sont ajoutés, puis les bactéries sont incubées pendant 30 minutes sur de la glace afin de permettre le contact entre l'ADN et les bactéries. Le choc thermique est ensuite réalisé pendant 45 secondes à 42 °C permettant de faire rentrer l'ADN plasmidique dans les cellules, avant ajout en conditions stériles de 400 µl de milieu SOC (Tableau XXIX) pour les régénérer. Après une incubation d'une heure à 37 °C, les bactéries sont étalées sur milieu LB (Tableau XV) supplémenté en ampicilline afin de sélectionner uniquement celles qui ont intégré le plasmide. Puis, les bactéries sont incubées à 37 °C sur une nuit.

Lorsque le plasmide utilisé est le pGEM®-T, 20 µl d'IPTG (Isopropyl β-D-1-ThioGalactoPyranoside) à 0,1 mM et de X-GAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) à 50 mg/ml sont étalés sur les boîtes. Le premier est un inducteur d'opérons lactose. Le second est un analogue du galactose qui devient bleu lors de la réaction enzymatique catalysée par la β-galactosidase. Ces composés permettent ainsi de distinguer les bactéries qui ont intégré le plasmide par discrimination des colonies blanches des colonies bleues. La coloration bleue étant le résultat de l'expression du gène LacZ.

3.8. Expression hétérologue dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*

3.8.1. Transformation de *S. cerevisiae*

La transformation des cellules de levures par des plasmides d'expression est réalisée après traitement des cellules à l'acétate de lithium (AcLi) (Gietz *et al.*, 1992).

Afin de rendre les levures compétentes, elles sont cultivées dans 50 ml de milieu YPD (Tableau XVII) et mises en culture à 30 °C sous agitation à 150 rpm. Lorsque la DO_{600nm} atteint la valeur de 0,6 la culture est centrifugée pendant 10 minutes à 4000 rpm. Les cellules sont ensuite reprises et lavées deux fois dans 1 ml d'eau stérile. Le culot de cellules est ensuite repris dans 1 ml de Tris EDTA/Acétate de lithium pH 7,5 (TE/AcLi) et lavé deux fois. Les cellules sont enfin reprises dans 50 µl de tampon TE/AcLi par transformation envisagée.

Pour la transformation, 50 µl de cellules rendues compétentes sont utilisées et mises en contact avec 5 µl d'ADN « *carrier* » (ADN de sperme de saumon soniqué à 10 mg/ml), 1 µg de plasmide et 300 µl

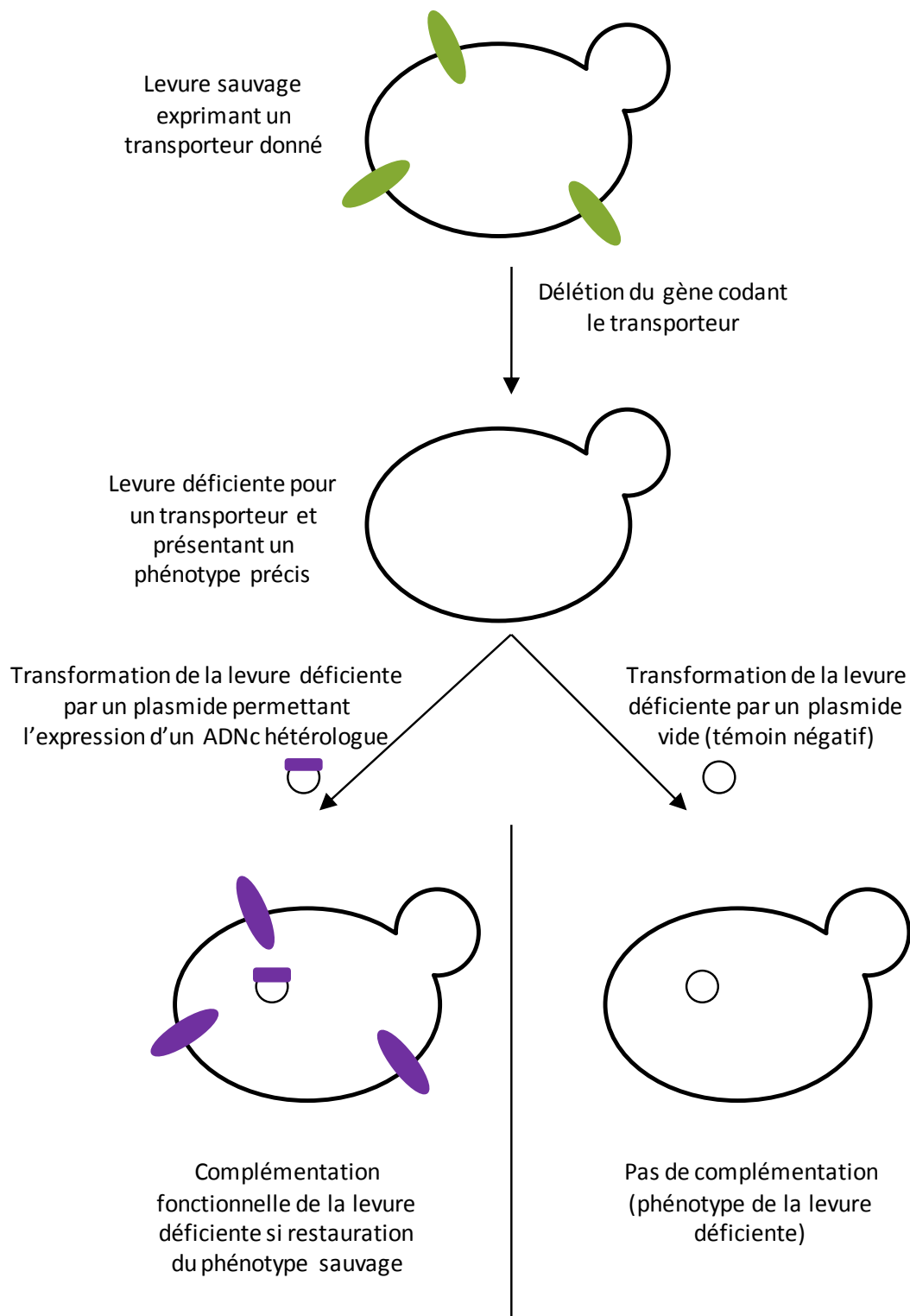


Figure 43 : Principe général de la complémentation fonctionnelle de levures déficientes. Une levure sauvage exprimant un transporteur donné est déléetée du gène correspondant (exemple : gène impliqué dans l'absorption du zinc). La levure déficiente présente alors un phénotype précis (exemple : incapacité à se développer en situation de carence en zinc). Cette levure déficiente est alors transformée avec un plasmide permettant l'expression d'un ADNc hétérologue ou avec le plasmide vide. Si l'ADNc hétérologue exprime une fonction équivalente au gène déléeté chez la levure sauvage (exemple : transporteur impliqué dans l'absorption du zinc), la levure déficiente transformée avec cet ADNc présentera un phénotype sauvage (exemple : croissance en situation de carence en zinc). Dans le cas contraire, la levure déficiente transformée avec l'ADNc présentera un phénotype équivalent à celui de la levure déficiente transformée avec le plasmide vide (exemple : incapacité à se développer en situation de carence en zinc).

d'une solution de TE/AcLi/PEG (Tableau XXX). Le mélange est incubé pendant 30 minutes sous agitation (150 rpm) à 30 °C. Les cellules subissent ensuite un choc thermique de 15 minutes à 42 °C, avant d'être centrifugées 5 minutes à 4000 rpm pour éliminer le PEG et remises en suspension dans 400 µl d'eau stérile. Elles sont ensuite étalées sur milieu SD-ura (Tableau XXXI) solide et mises en cultures à 30 °C pendant 3 à 5 jours. Les levures utilisées sont toutes mutées pour le gène *ura3* impliqué dans la voie de biosynthèse de l'uracile. Ainsi, seules les levures ayant intégré un plasmide pourront se développer sur ce milieu SD-ura.

3.8.2. Complémentation fonctionnelle

Le principe général de la complémentation fonctionnelle en système hétérologue, la levure, est donné dans la figure 43.

3.8.2.1. Test en gouttes

Les levures transformées par les différents gènes d'intérêts sont cultivées sur milieu SD-ura (Tableau XXXI). Lorsqu'elles sont en phase exponentielle de croissance ($DO_{600nm} = 0,6$), elles sont concentrées à $DO_{600nm} = 1,1 \pm 2,5 \%$ soit $2,75 \cdot 10^7$ UFC.ml⁻¹. Des dilutions au 10^e, 100^e et 1000^e de cette solution mère sont ensuite réalisées. Des gouttes de 5 µl de chaque dilution et de la solution mère sont ensuite déposées sur des milieux, SD-ura (Tableau XXXI) ou milieu minimum (Tableau XXXII), permettant de mettre en évidence une complémentation fonctionnelle par le gène porté par le plasmide pendant 3 à 5 jours. Sur chaque boîte, la souche sauvage BY4741 et la souche délétée, toute deux transformées par le vecteur vide, sont utilisées comme témoins respectivement positif et négatif de croissance.

La liste des souches de levures mutantes utilisées et leur phénotype est décrit dans le tableau XVI.

3.8.2.2. Suivi de la croissance en milieu liquide

Il est également possible de réaliser la complémentation fonctionnelle en milieu liquide. Pour cela, des plaques 96 puits de culture cellulaire sontensemencées avec les différentes souches de levures transformées, la souche sauvage et la souche mutante transformée par le vecteur vide à une DO_{600nm} initiale de 0,2. Chaque puits contient du milieu SD-ura (Tableau XXXI), du milieu minimum (Tableau XXXII) ou du milieu YPD (Tableau XVII), préparé avec différentes concentrations d'ETM déterminées en fonction du phénotype recherché. Les plaques sont ensuite incubées à 30 °C dans un lecteur de plaques (Biotek) en agitation pendant 36 à 72 heures. Une lecture de la DO_{600nm} de chaque puits est réalisée toutes les 20 minutes.

3.8.2.3. Quantification du *pool* de métaux intracellulaires par ICP-AES

Une culture de 50 ml des souches de levures à étudier estensemencée à une DO_{600nm} initiale de 0,005 et cultivée en agitation à 30 °C jusqu'à une DO_{600nm} comprise entre 1,8 et 2. Le milieu de culture utilisé est du milieu SD-ura supplémenté de différents métaux en fonction du phénotype recherché.

Les levures sont ensuite récoltées par centrifugation 10 minutes à 4000 rpm. Puis trois lavages avec 25 ml d'une solution de Tris/EDTA/HCl (Tris : 50 mM ; EDTA : 10 mM ; HCl pour ajuster le pH à 6,5) sont réalisés afin d'éliminer les ETM adsorbés aux parois cellulaires. Un dernier lavage des levures est effectué à l'eau ultra-pure. Enfin, les levures récoltées sont séchées une journée à l'étuve à 60 °C et envoyées à Pierre Richaud pour le dosage des métaux intracellulaires par ICP-AES (environ 20 à 60 mg de masse sèche).

3.8.3. Localisation cellulaire de protéines par fusion GFP (*Green Fluorescent Protein*)

Le clonage dans le plasmide pYES2-GFP d'un ADNc nécessite de générer des amorces particulières. En effet, il est nécessaire de rajouter des sites de restriction pour permettre l'insertion de l'ADNc dans le vecteur. Il est aussi important de supprimer le codon stop du gène et de veiller à ce que les cadres de lecture de l'ADNc du gène d'intérêt et de celui de la GFP soient en phase, avec l'ajout si besoin d'une ou deux bases au niveau de l'amorce pour rétablir ce cadre de lecture.

Pour s'assurer d'une bonne interprétation de la localisation subcellulaire observée, deux fluorophores ont également été utilisés. Le composé CMAC-Arg (7-Amino-4-ChloroMethylCoumarine) (Molecular Probes) va pénétrer dans la vacuole et émettre une fluorescence au niveau du lumen. Il est ajouté pendant 5 minutes à la solution de levures à la concentration de 50 μ M, les levures sont ensuite lavées deux fois dans du milieu SD-ura galactose (centrifugation 4000 rpm pendant 4 minutes) avant visualisation au microscope à fluorescence. Le DAPI (4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole) est utilisé en tant que contre-marqueur pour identifier le noyau. Le DAPI est ajouté à la solution de cellules à la concentration de 300 nM (solution stock diluée dans du PBS (*Phosphate Buffered Saline*)) pendant 20 secondes, les cellules sont ensuite lavées deux fois dans du milieu SD-ura galactose (centrifugation 4000 rpm pendant 4 minutes) avant visualisation au microscope à fluorescence.

Après transformation des levures par les constructions plasmidiques, les colonies obtenues sont cultivées dans du milieu SD-ura contenant uniquement du galactose (Tableau XXXI) comme source de carbone afin d'induire le promoteur pGAL1, activant ainsi l'expression du gène d'intérêt cloné. Pour une contre-localisation de certains organites intracellulaires, les marqueurs CMAC et DAPI sont respectivement ajoutés comme expliqué ci-dessus. Afin de s'assurer que la fusion protéique avec la GFP ne gêne pas

l'expression de la protéine d'intérêt, des tests de complémentation ont été réalisés dans les mêmes conditions de caractérisation des protéines d'intérêt non fusionnées à la GFP. Les cellules transformées sont observées avec un microscope à fluorescence Nikon Eclipse 200 (Nikon, Japon) avec un objectif Nikon Plan 100x à immersion. Deux filtres sont utilisés : un filtre FITC (excitation : 465-495 nm ; émission : 515-555 nm) pour visualiser la fluorescence associée à la GFP et un filtre UV (excitation : 340-380 nm ; émission : 435-485 nm) pour visualiser la fluorescence générée par le CMAC et le DAPI. Les images sont acquises et numérisées avec un appareil photo numérique (Nikon D80) relié au microscope.

3.9. Analyses statistiques

Les analyses statistiques de ce travail de thèse ont été réalisées à l'aide du logiciel XLSTAST 2011 (*Addinsoft, Inc.*). Les résultats sont considérés comme significatifs à la probabilité $p < 0,05$. Le test t de Student permet de déterminer si la différence observée entre un échantillon et une condition contrôle est significative. Il a par exemple été utilisé lors des tests de tolérance de champignons aux ETM afin de vérifier si les différences de croissance observées sur les différents ETM étaient significativement différentes de la croissance sur milieu contrôle. Ensuite, la comparaison de données de plusieurs échantillons comme par exemple les taux de mycorhization entre clones de peupliers et parcelles ou les niveaux d'expression des gènes en fonction de la condition testée ont été réalisés à l'aide d'un test d'analyse de variance à plusieurs facteurs (ANOVA). Enfin, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée afin de discriminer les variables déterminant la répartition des échantillons observés. Ceci a par exemple permis d'expliquer la répartition des espèces fongiques colonisant les peupliers en fonction du clone et de la parcelle d'origine.

Résultats et discussions

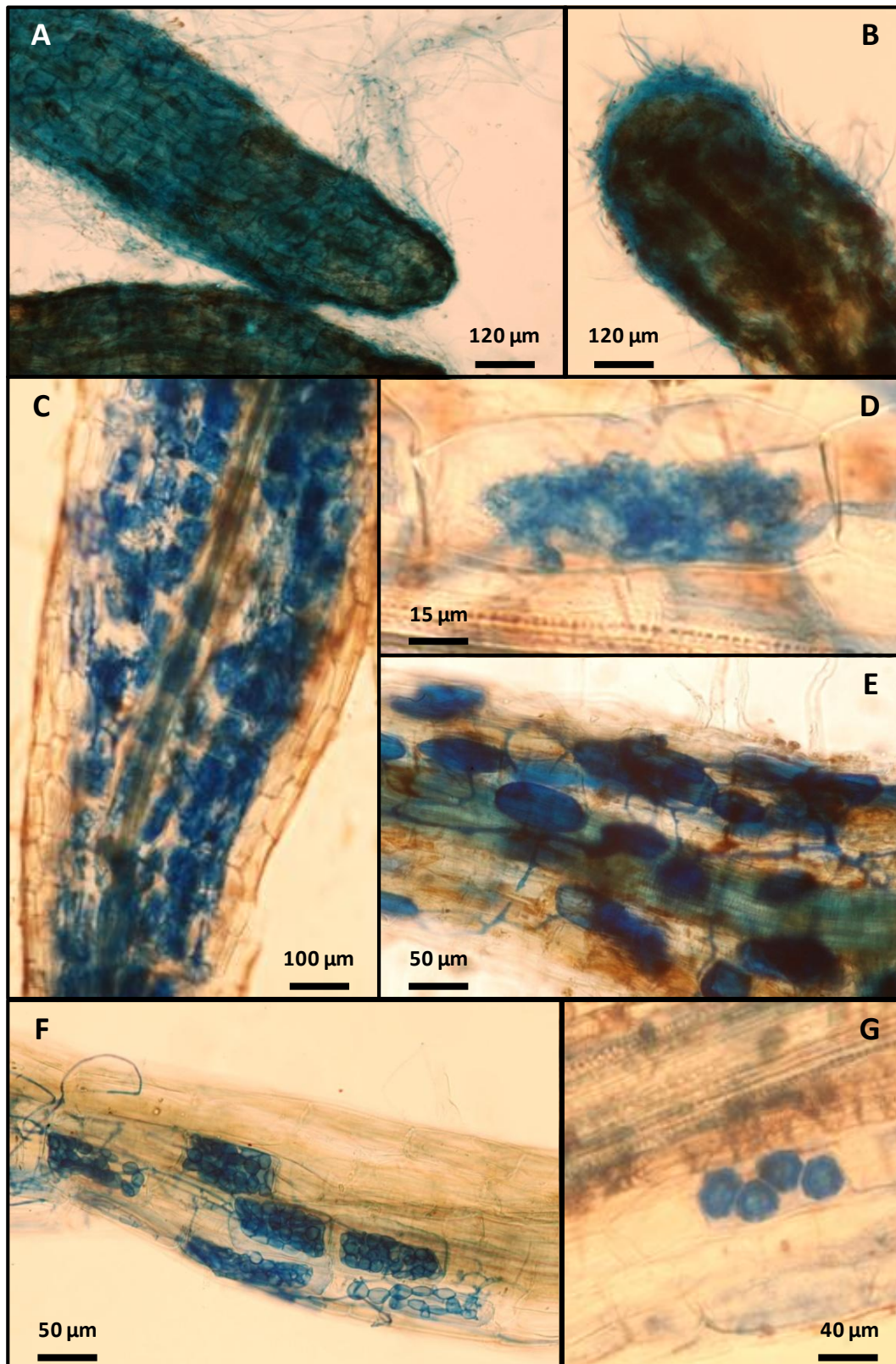


Figure 44 : Colonisation des racines de peupliers prélevées sur le site expérimental de Pierrelaye par des champignons. Les structures fongiques ont été colorées au bleu de méthyle. Les différentes structures de la symbiose ectomycorhizienne, notamment le mycélium extramatriciel (A) et le manteau (B) ; et de la symbiose endomycorhizienne, les arbuscules (C,D) et les vésicules (E) sont clairement visibles en microscopie photonique. Des structures typiques des DSE (*Dark Septate Endophyte*) (F) et des spores d'endophytes (G) sont également visibles.

1. Identification des communautés fongiques mycorhiziennes du peuplier sur un sol pollué par des ETM

Le premier objectif de ce travail de thèse était de s'assurer que les peupliers peuvent être colonisés par des champignons mycorhiziens et/ou endophytes sur un site pollué. Ensuite, l'analyse des communautés fongiques associées aux racines permettrait d'identifier des espèces fongiques d'intérêt qui pourraient s'avérer performante en terme de phytostabilisation.

1.1. Quantification du taux de mycorhization

En septembre 2009, des racines fines de trois clones de peupliers, « Triplo » (*Populus deltoides* x *Populus nigra*), « Bakan » (*P. trichocarpa* x *P. maximowiczii*) et « Skado » (*P. trichocarpa* x *P. maximowiczii*), âgés de trois ans, ont été prélevées sur la parcelle PHYTOPOP du dispositif expérimental de Pierrelaye afin de vérifier le potentiel de mycorhization par des champignons endo- et/ou ectomycorhiziens du peuplier sur sites pollués. Le dispositif expérimental de Pierrelaye est pollué par des ETM, principalement du zinc, du cadmium et du plomb (Tableau IX, Figure 25). Ces trois clones de peupliers ont été choisis car ce sont des cultivars qui accumulent peu les ETM dans leurs parties aériennes (Migeon, 2009). Les racines fines de l'horizon supérieur du sol ainsi que les feuilles associées ont été prélevées sur 10 arbres par placette dans les parcelles 1, 2 et 3 du dispositif expérimental PHYTOPOP de Pierrelaye. Les échantillons de peupliers de la parcelle 4 n'ont pas été récoltés car le taux de survie des arbres y était trop faible. Il en fut de même pour le clone « Skado » de la parcelle 2 et le clone « Bakan » de la parcelle 1. La proportion de racines colonisées par des champignons endo- et ectomycorhiziens, le taux de mycorhization, a ensuite été déterminé pour chaque arbre.

Des structures typiques de champignons endophytes, endo- et ectomycorhiziens ont été observées dans les racines de peupliers (Figure 44). La proportion des racines fines des différents clones de peuplier colonisées par les champignons ecto- et endomycorhiziens a été calculée (Tableau XXXIII). **Tous les échantillons de racines étaient colonisés par des champignons endo- et ectomycorhiziens selon des proportions variables.** Le taux de mycorhization total varie de 10 à 75 % selon les clones de peuplier et les parcelles. Le pourcentage d'ectomycorhization varie de 6 à 60 % et le pourcentage d'endomycorhization de 4 à 35 %. La proportion d'arbuscules, structures d'échanges entre les deux partenaires de l'association endomycorhizienne, est d'environ 20 % par rapport au total des cellules des racines fines colonisées. A partir des données obtenues du taux de colonisation, une ANOVA a été réalisée afin de comparer les taux de mycorhization entre eux (Tableau XXXIV). Ces analyses ne permettent pas de dégager un effet dû au génotype du peuplier ou un effet dû à la localisation de ceux-ci dans le dispositif expérimental. Afin de

Tableau XXXIII : Quantification du taux de mycorhization de divers clones de peupliers du site expérimental PHYTOPOP de Pierrelaye

Clone (numéro de parcelle)	% ECM	% AM	% A
Triplo (T3)	16,7 ± 3,8 bc	9,59 ± 2,0 cd	1,89 ± 0,4 bc
Triplo (T2)	28,9 ± 5,7 b	22,5 ± 3,3 b	4,18 ± 0,6 b
Triplo (T1)	17,5 ± 4,3 bc	35,0 ± 2,4 a	10,8 ± 1,2 a
Bakan (B3)	59,8 ± 4,1 a	16,2 ± 1,7 bc	0,85 ± 0,4 c
Bakan (B2)	8,31 ± 1,9 c	12,1 ± 1,3 bc	1,47 ± 0,4 bc
Skado (S3)	6,49 ± 1,9 c	4,44 ± 0,8 d	1,00 ± 0,3 c
Skado (S1)	21,1 ± 0,6 b	22,4 ± 2,9 b	4,75 ± 1,5 b

% ECM : pourcentage de colonisation par les champignons ectomycorhiziens ; % AM : pourcentage de colonisation par les champignons endomycorhiziens ; % A : abondance des arbuscules. Chaque valeur est une moyenne de 10 répétitions ± ES. Les différentes lettres représentent les différences significatives à $p < 0,05$.

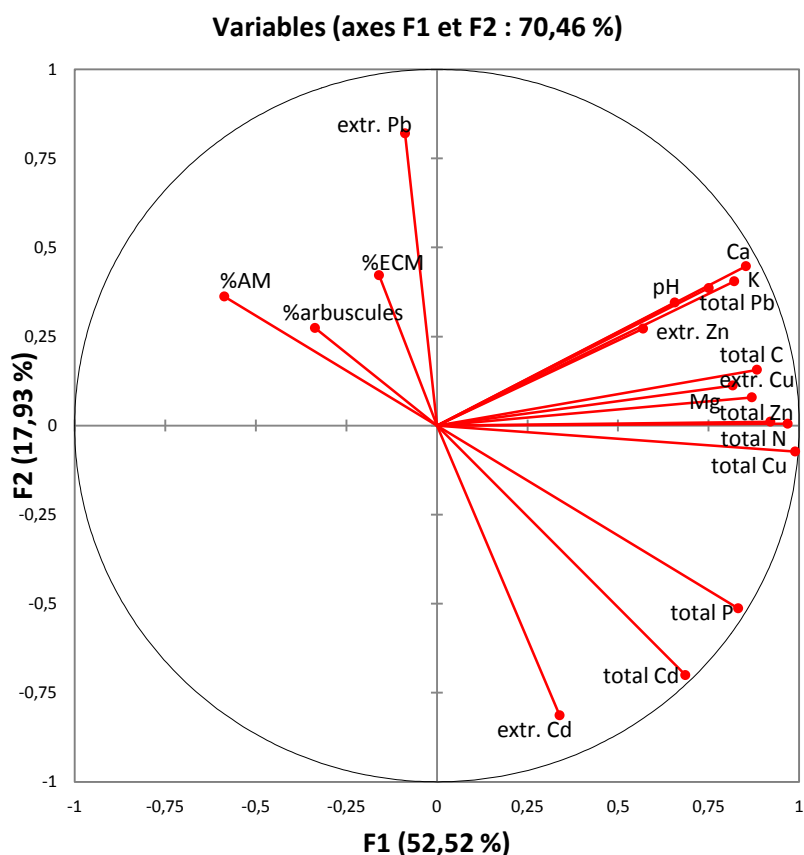


Figure 45 : Cercle de corrélation d'une ACP montrant le lien entre les caractéristiques du sol et les taux de colonisation par les champignons mycorhiziens. Pour le Ca, K, P, N, C et le Mg, les concentrations totales dans le sol ont été utilisées. Pour le Cd, Cu, Pb et Zn, les concentrations totales et extractibles au NH_4NO_3 ont été utilisées.

vérifier si un lien existe entre les taux de colonisation des racines par les champignons mycorhiziens et les caractéristiques du sol, une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée à partir de ces données. La figure 45 présente le cercle des corrélations obtenu. D'après ces résultats, **le taux d'ectomycorhization est corrélé négativement avec la concentration en cadmium biodisponible dans le sol alors que le taux d'endomycorhization semble corrélé négativement avec les concentrations totales en phosphore et cadmium du sol.** D'autres part, les autres paramètres du sol (pH ; concentrations totales en C, N, Cu, Zn, Pb, Ca, K, Mg ; concentrations extractibles en Zn et Cu) ne semblent pas avoir d'influence sur les taux de mycorhization observés.

1.2. Identification moléculaire des champignons associés aux racines des peupliers

Après avoir identifié le potentiel de mycorhization du peuplier sur un sol pollué, une identification moléculaire des communautés fongiques en interaction avec les racines a été réalisée sur ces mêmes échantillons. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Leila Djied (Djied, 2010) et Audrey Errard (Errard, 2010), stagiaires de master M1 que j'ai encadrées au laboratoire. Pour cela, les ADN génomiques des dix arbres prélevés par placette ont été extraits séparément puis rassemblés dans un même tube en vue des analyses moléculaires. Cet échantillon composite nous a permis de limiter le nombre d'échantillons à traiter (7 au lieu de 70) tout en nous permettant d'obtenir une image globale des populations fongiques à l'échelle d'une placette. Dans un premier temps, un couple d'amorces permettant d'amplifier l'ADN d'une majorité de champignons a été utilisé : ITS1-ITS4 (White *et al.*, 1990), nommé « U » dans cette étude (amorces Universelles). Ensuite, afin d'affiner les résultats obtenus, deux autres couples d'amorces, AML1-AML2 (Lee *et al.*, 2008), spécifique des Gloméromycètes, nommé « G » dans cette étude, et ITS1F-ITS4B (Gardes & Bruns, 1993), spécifique des Basidiomycètes, nommé « B » ont été utilisés car la majorité des champignons endomycorhiziens appartiennent à la famille des Gloméromycètes alors que les champignons ectomycorhiziens appartiennent plutôt à la famille des Basidiomycètes. Les séquences amplifiées avec chaque couple d'amorces ont été clonées puis discriminées par une technique de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Ensuite, l'analyse par BLAST, *via* le site du NCBI, des séquences fongiques obtenues a permis de déterminer les genres et/ou les espèces présentes en interaction avec les racines de peuplier. Les tableaux XXXIV et XXXV concernent l'analyse des données obtenues pour les différents clones de peupliers sur les parcelles 1, 2 et 3 du dispositif de Pierrelaye.

Les identifications moléculaires réalisées avec l'amorce universelle (ITS1-ITS4 dite « U ») ont permis de mettre en évidence la présence de champignons ectomycorhiziens sur les racines tels que *Geopora cervina* (U5), *Tuber rufum* (U4) ainsi que d'autres appartenant au genre *Peziza* (U1-U2). La présence de champignons ectomycorhiziens du genre *Hebeloma* (U7-U9) a aussi été mise en évidence mais uniquement

Tableau XXXIV : Principales OTUs détectées par amplification des séquences ITS avec le couple d'amorces « U » (ITS1-ITS4)

OTU	n° d'acc.	Résultat de blast le plus proche			Mode de vie	Fréquence d'apparition des bandes (%)						
		Affiliation	n° d'acc.	Identité (%)		T1	T2	T3	B2	B3	S1	S3
U1	JX135041	<i>Peziza ostracoderma</i>	EU819461.1	97	ECM	49,8	-	-	-	-	-	3,3
U2	JX135042	<i>Peziza</i> sp.	GU990362.1	96	ECM	-	29,9	-	-	8,7	-	-
U3	JX135043	<i>Geopora</i> sp.	FM206420.1	99	ECM	-	-	-	-	4,4	-	-
U4	JX135044	<i>Tuber rufum</i>	GU990358.1	98	ECM	-	-	-	-	8,7	-	-
U5	JX135045	<i>Geopora cervina</i>	JQ724065.1	97	ECM	-	-	-	-	-	6,7	-
U6	JX135046	mycorrhizal Helotiales	JN859271.1	94	ECM	-	-	10,5	-	-	-	-
U7	JX135047	<i>H. mesophaeum</i>	AB211272.1	99	ECM	-	-	-	3,1	-	-	-
U8	JX135048	<i>H. crustuliniforme</i>	FJ378789.1	97	ECM	-	-	-	6,3	56,3	39,9	-
U9	JX135049	<i>H. mesophaeum</i>	JQ724062.1	99	ECM	-	-	-	-	13,1	-	-
U10	JX135050	<i>Pyrenochaeta</i> sp.	HM208713.1	98	P/E	15,1	5,0	2,7	-	4,4	26,5	38,7
U11	JX135051	<i>Pythium</i> sp.	AY445122.1	97	P/E	-	45,0	-	-	-	-	-
U12	JX135052	<i>Thanatephorus</i> sp.	DQ279011.1	98	P/E	-	-	2,7	-	-	13,4	-
U13	JX135053	<i>Ilyonectria</i> sp.	JQ846082.1	99	P/E	-	-	-	-	-	6,7	-
U14	JX135054	<i>Phoma exigua</i>	EU343173	99	P/E	-	-	-	3,1	-	-	-
U15	JX135055	<i>Paraphoma chrysanthemicola</i>	JN123358.1	90	E	-	-	-	18,7	-	-	-
U16	JX135056	Uncultured basal lineage fungus	HM240096.1	99	?	-	-	13,1	-	-	-	22,6
U17	JX135057	<i>Mortierella hyalina</i>	AY842393.1	99	S	-	-	-	3,1	-	-	-
U18	JX135058	<i>Tetracladium</i> sp.	GU055705.1	93	P/E	5,0	10,0	50,0	59,3	-	-	35,4
U19	JX135059	<i>Rhizoctonia</i> sp.	JQ859883.1	99	P/E	10,0	-	10,5	-	4,4	-	-
U20	JX135060	<i>Ceratobasidium</i> sp.	DQ093646.1	99	P/E	10,0	5,0	5,3	6,3	-	-	-
U21	JX135061	<i>Psathyrella</i> sp.	AM712270.1	98	S	5,0	-	-	-	-	-	-
U22	JX135062	<i>Glomus</i> sp.	AJ567764.1	96	AM	5,0	5,0	5,3	-	-	6,7	-

Les champignons sont classés en fonction de leur mode de vie. Les champignons endomycorhiziens (AM) sont en bleu, les ectomycorhiziens (ECM) en rouge, les parasitiques/endophytes (P/E) en vert et les saprophytes (S) en orange. T=Triplo ; B=Bakan ; S=Skado ; le numéro correspond à la parcelle sur lequel les racines ont été prélevées. n° d'acc. = numéro d'accension.

sur les racines des clones de peupliers « Skado » et/ou « Bakan ». Un champignon décrit dans les bases de données comme formant des mycorhizes de type éricoïdes de l'ordre des Helotiales (U6) a également été détecté. La présence d'un champignon endomycorhizien appartenant au genre *Glomus* (U22) a été mise en évidence. La présence de différents champignons pathogènes ou endophytes a aussi été mise en évidence comme *Pyrenochaeta* sp. (U10), *Phoma exigua* (U14), *Ilyonectria* sp. (U13), *Tetracladium* sp. (U18), *Rhizoctonia* sp. (U19), *Ceratobasidium* sp. (U20)... Des champignons saprophytes du sol ont été détectés appartenant à la famille des Mucoromycètes (*Mortierella hyalina* (U17)) ou au groupe des Basidiomycètes (*Psathyrella* sp. (U21)).

L'amplification des régions ITS par l'amorce « B » (spécifique des Basidiomycètes) permet de dissocier les espèces fongiques en trois catégories. Des champignons ectomycorhiziens tels que *Laccaria* (B1), *Entoloma* (B3) et *Hebeloma* (B5-B10 (*H. crustuliniforme* et *H. mesophaeum* principalement)) sont détectés. **Les espèces appartenant au genre *Hebeloma* sont fortement présentes sur les racines des clones Bakan et Skado et absentes des racines du clone Triplo**, confirmant les observations précédentes des analyses réalisées avec le couple d'amorces « U ». Les OTU *H. crustuliniforme* B5 (entre 3,1 et 90,8 % des OTU identifiées avec l'amorce « B ») et B7 (entre 2,3 et 21,9 % des OTU identifiées avec l'amorce « B ») sont les plus représentées parmi celles appartenant au genre *Hebeloma*. Les champignons des genres *Ceratobasidium* (B12) et *Rhizoctonia* (B13) pouvant avoir un mode de vie endophyte ou parasitique sont fortement représentés sur les racines du clone « Triplo » (respectivement entre 11,1 et 60,0 % et entre 2,8 et 36,6 % des OTU identifiées avec l'amorce « B ») mais beaucoup moins sur celles des clones « Bakan » et « Skado » (respectivement entre 6,3 et 28,6 % et entre 2,3 et 3,1 % des OTU identifiées avec l'amorce « B »). Des espèces saprophytes comme *Psathyrella* (B17) ou *Coprinus* (B19) ont également été retrouvées sur les racines de Triplo.

L'amplification des régions ITS par l'amorce spécifique des Gloméromycètes (dite « G ») a mis en évidence **la prépondérance de champignons endomycorhiziens appartenant au genre *Diversispora* (G3), genre très proche du genre *Glomus* appartenant aux Gloméromycètes**, avec une proportion d'OTU identifiées avec l'amorce « G » comprise entre 27,9 et 69,8 %. Deux autres *Glomus* : *Glomus* sp. (G1) (proportion d'OTU comprise entre 6,3 et 58,1 %), qui semble proche des espèces *intraradices* ou *irregulare* et *Glomus lamellosum* (G2) (proportion d'OTU comprise entre 4,2 et 15,0 %) sont aussi retrouvés sur l'ensemble des clones de peupliers. Un *Glomus* sp. (G5) (proportion d'OTU comprise entre 1,9 et 14,0 %) semble lui être uniquement présent sur les racines de peuplier « Triplo » alors qu'un *Glomus irregulare/intraradices* (G6) est présent uniquement sur les racines du clone « Triplo » de la parcelle 1. Un autre *G. irregulare/intraradices* (G4) est présent sur les racines des trois clones de peupliers étudiés mais pas dans toutes les placettes.

Tableau XXXV : Principales OTUs détectées par amplification des séquences ITS avec les couples d'amorces « B » (ITS1F-ITS4B) et « G » (AML1-AML2)

OTU	n° d'acc.	Résultat de blast le plus proche			Mode de vie	Fréquence d'apparition des bandes (%)						
		Affiliation	n° d'acc.	Identité (%)		T1	T2	T3	B2	B3	S1	S3
B1	JX135064	<i>Laccaria</i> sp.	FJ845416.1	98	ECM	5,6	-	-	-	-	-	-
B2	JX135065	<i>Sebacina vermifera</i>	EU910924.1	97	ECM	5,6	22,5	4,9	-	-	-	-
B3	JX135066	<i>Entoloma</i> sp.	FM866366.1	95	ECM	2,8	2,5	-	-	-	-	-
B4	JX135067	<i>Tricholoma</i> sp.	FJ845447.1	99	ECM	-	-	-	9,5	-	-	-
B5	JX135068	<i>H. crustuliniforme</i>	FJ893960.1	96	ECM	-	-	-	40,5	90,8	49,9	3,1
B6	JX135069	<i>Hebeloma</i> sp.	EF644106.1	99	ECM	-	-	-	-	-	-	6,3
B7	JX135070	<i>H. crustuliniforme</i>	EF564168.1	94	ECM	-	-	-	11,9	2,3	15,6	21,9
B8	JX135071	<i>Hebeloma</i> sp.	EF564167.1	98	ECM	-	-	-	-	-	3,1	-
B9	JX135072	<i>H. mesophaeum</i>	AY748854.1	98	ECM	-	-	-	-	-	3,1	3,1
B10	JX135073	<i>H. crustuliniforme</i>	GQ267472.1	96	ECM	-	-	-	-	-	6,3	43,7
B12	JX135075	<i>Ceratobasidium</i> sp.	AF354091.1	98	P/E	11,1	60,0	58,5	28,6	-	12,4	6,3
B13	JX135076	<i>Rhizoctonia</i> sp.	JQ859883.1	96	P/E	2,8	-	36,6	2,4	2,3	3,1	-
B14	JX135077	<i>Tetracladium</i> sp.	GU055705.1	93	P/E	-	-	-	-	-	3,1	15,6
B15	JX135078	<i>Thanatephorus cucumeris</i>	GU055587.1	98	P/E	-	-	-	2,4	2,3	3,1	-
B16	JX135079	<i>Auricularia</i> sp.	JN712676.1	98	S	52,7	10,0	-	4,8	2,3	-	-
B17	JX135080	<i>Psathyrella</i> sp.	DQ389717.1	98	S	13,8	-	-	-	-	-	-
B18	JX135081	<i>Coprinopsis</i> sp.	FJ627023.1	97	S	5,6	-	-	-	-	-	-
B19	JX135082	<i>Coprinus</i> sp.	AF345812.1	99	S	-	2,5	-	-	-	-	-
B20	JX135083	<i>Agrocybe</i> sp.	AF345805.1	99	S	-	2,5	-	-	-	-	-
G1	JX135035	<i>Glomus</i> sp.	GQ140618.1	98	AM	6,3	13,2	41,9	31,6	42,4	16,1	58,1
G2	JX135036	<i>Glomus lamellosum</i>	AJ276087.2	99	AM	4,2	9,4	7,0	10,6	15,0	12,8	14,0
G3	JX135037	<i>Diversispora</i> sp.	FJ831643.1	97	AM	56,2	69,8	37,2	57,8	37,5	48,5	27,9
G4	JX135038	<i>G. irregulare/intraradices</i>	EU232656.1	98	AM	27,0	5,7	-	-	5,0	22,6	-
G5	JX135039	<i>Glomus</i> sp.	FR693527.1	99	AM	2,1	1,9	14,0	-	-	-	-
G6	JX135040	<i>G. irregulare/intraradices</i>	FR693571.1	99	AM	4,2	-	-	-	-	-	-

Les champignons sont classés en fonction de leur mode de vie. Les champignons endomycorhiziens (AM) sont en bleu, les ectomycorhiziens (ECM) en rouge, les parasitiques/endophytes (P/E) en vert et les saprophytes (S) en orange. T=Triplo ; B=Bakan ; S=Skado ; le numéro correspond à la parcelle sur lequel les racines ont été prélevées. n° d'acc. = numéro d'accension.

Une analyse de type ACP a ensuite été réalisée afin d'étudier la répartition des communautés fongiques mycorhiziennes en fonction du clone de peuplier considéré et de la parcelle d'origine des plants (Figure 46). **La parcelle d'origine des arbres ne semble pas influencer la répartition des communautés fongiques, en revanche, cette répartition semble particulièrement liée au clone considéré.** En effet, les communautés de chaque clone considéré se distinguent clairement les unes des autres, et cet effet est d'autant plus marqué si on considère le génotype des peupliers (*P. trichocarpa* x *P. maximowiczii* (« Skado » et « Bakan ») vs *P. deltoides* x *P. nigra* (« Triplo »)), séparés selon l'axe 1. L'axe 2, en revanche, sépare les communautés associées au clone « Bakan » des communautés du clone « Skado ».

1.3. Discussion

La quantification du taux de mycorhization a permis de mettre en évidence la présence de champignons endo- et ectomycorhiziens en interaction avec les racines de peuplier sur le dispositif expérimental PHYTOPOP de Pierrelaye. En revanche, le taux de colonisation par ces champignons varie beaucoup d'un clone de peuplier à l'autre et d'une parcelle à l'autre. Cependant, la variabilité et les taux de colonisation observés, de 10 à 75 %, sont proches de ceux relevés dans d'autres études s'intéressant aux communautés ectomycorhiziennes et endomycorhiziennes du peuplier (Khasa *et al.*, 2002 ; Gehring *et al.*, 2006 ; Karlinski *et al.*, 2010). Plusieurs facteurs permettent d'expliquer ces différences de taux de colonisation.

Tout d'abord, une étude réalisée au Canada sur le taux de mycorhization de peupliers sur différents sites a permis de mettre en évidence des différences importantes liées à l'origine et la nature des clones de peuplier (Khasa *et al.*, 2002). L'auteur suggère qu'il y aurait des susceptibilités d'hôtes différentes des champignons mycorhiziens pour un clone de peuplier donné.

Une étude réalisée dans une forêt tropicale humide au Panama a montré que pour de nombreuses espèces fongiques, l'infection par les champignons dépendrait de la densité de l'hôte végétal (Gilbert *et al.*, 2002). En effet, la diversité fongique observée sur les racines semble corrélée positivement à la densité de l'hôte végétal. Or, sur le dispositif de Pierrelaye, le mode cultural est différent entre les parcelles. Les parcelles 2 et 3 ont une densité d'arbres de 10000 tiges par hectare alors que la parcelle 1 n'en contient que 1000 par hectare. Néanmoins, le mode cultural ne semble pas avoir d'influence sur le taux de mycorhization sur ce site (Tableau XXXIII).

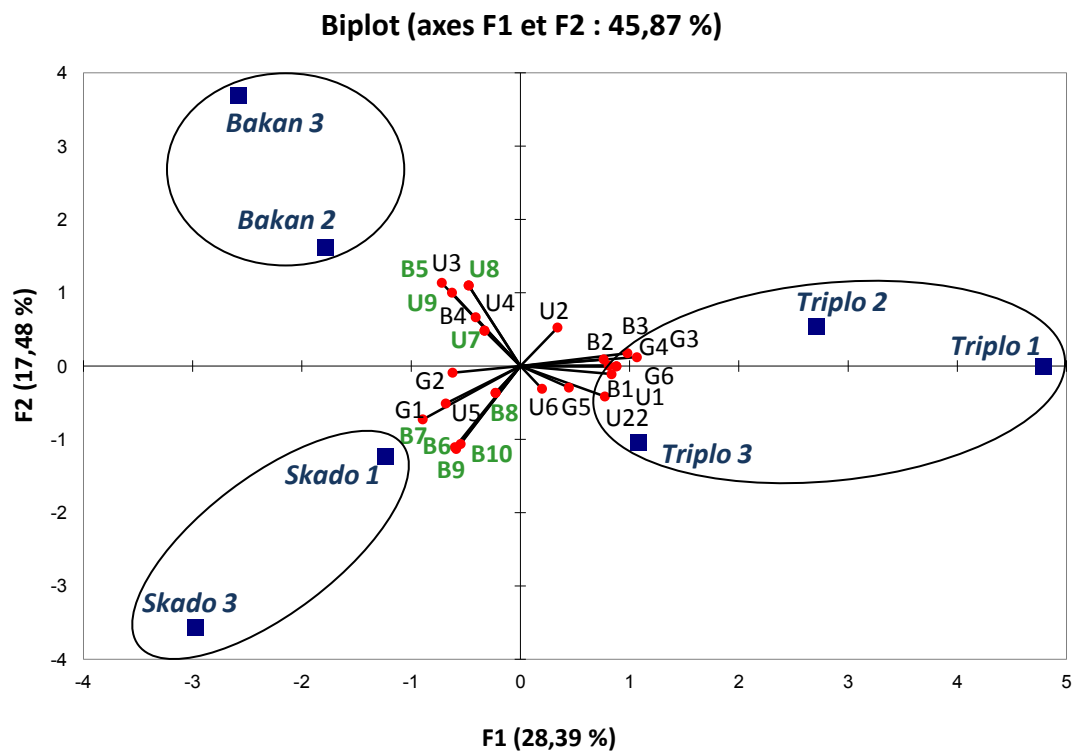


Figure 46 : ACP représentant la répartition des communautés mycorhiziennes du peuplier en fonction du clone considéré et de la parcelle d'origine des plants. Les OTUs en vert appartiennent au genre *Hebeloma*.

Un autre facteur pouvant intervenir sur le taux de colonisation des racines par les champignons mycorhiziens est l'humidité du sol. Les sols très humides ou au contraire très secs sont connus pour inhiber la formation des mycorhizes (Karlinski *et al.*, 2010). Par exemple, l'équipe de Gehring *et al.* (2006) a montré qu'une augmentation de l'humidité du sol due à l'irrigation provoque une augmentation du taux d'ectomycorhization de 33 % et une diminution du taux d'endomycorhization de 45 %. Or, le dispositif expérimental de Pierrelaye est légèrement en pente, les parcelles 1 et surtout 3 situés en contrebas du dispositif expérimental sont souvent plus humides que les parcelles 2 et 4 situées plus en hauteur.

Ensuite, le taux de mycorhization dépend de la fertilité du sol, notamment de la quantité de phosphore ou d'azote du substrat, car les champignons mycorhiziens favorisent la nutrition phosphatée ou azotée de la plante (Christie *et al.*, 2004 ; Santos *et al.*, 2006 ; Smith & Read, 2008). Etant donné les coûts importants en carbone pour la plante en association avec des champignons mycorhiziens, une concentration importante en azote et/ou en phosphore dans le sol est défavorable à l'établissement de la symbiose. De plus, un taux élevé en phosphore dans le sol peut diminuer le taux de germination des spores endomycorhiziennes (Christie *et al.*, 2004). L'analyse des échantillons de sol prélevés sur le dispositif de Pierrelaye ont permis de mettre en évidence une corrélation négative entre le taux de phosphore du sol et le taux de colonisation des racines par les champignons endomycorhiziens (Figure 45). En revanche, les taux d'azote, carbone ou phosphore ne permettent pas d'expliquer les différences observées dans les taux d'ectomycorhization.

Parmi les autres facteurs pouvant expliquer ces différences, plusieurs études ont montré que le taux de pollution d'un sol avait un effet inhibiteur sur l'installation des champignons mycorhiziens (Gadd *et al.*, 2012). De fortes concentrations d'ETM pourraient inhiber la croissance fongique en général en modifiant la chimie du sol et ainsi provoqueraient une diminution des nutriments disponibles (Karlinski *et al.*, 2010). De plus, certains ETM comme le cuivre, le cadmium et le zinc seraient capables d'inhiber l'endomycorhization (Leyval *et al.*, 1997 ; Christie *et al.*, 2004). L'équipe de Zarei *et al.* (2008a) a également observé une diminution de la colonisation par les champignons endomycorhiziens et du nombre de spores quand la teneur en ETM augmente, le nombre de spores était diminué de 90 % entre un sol non pollué (200 ppm de zinc total) et pollué (5000 ppm de zinc total). Cette équipe a en effet mesuré un nombre de spores et un taux de colonisation des racines par les champignons plus faibles aux alentours d'une mine de zinc et de plomb en Iran par rapport aux lieux de prélèvement plus éloignés (Zarei *et al.*, 2008a). Les teneurs en polluants dans le sol seraient donc susceptibles de changer la composition des espèces (Krpata *et al.*, 2008). Une étude réalisée sur des racines de plantain a montré que d'autres ETM comme le baryum, le cobalt et l'étain seraient à l'origine d'une diminution de la colonisation et de la diversité des champignons endomycorhiziens

(Hassan *et al.*, 2011). L'effet des ETM sur l'activité et la viabilité des symbioses ectomycorhiziennes est moins bien documenté (Leyval *et al.*, 1997). Cependant, dans notre étude, le taux d'ectomycorhization semble corrélé négativement à la concentration en cadmium biodisponible, un résultat déjà observé dans une autre étude portant sur le saule (Regvar *et al.*, 2010). D'autres ETM, comme le cuivre, le chrome, le fer, le manganèse, le plomb et le vanadium ont un impact négatif sur l'abondance des champignons ectomycorhiziens (Jean-Philippe *et al.*, 2011).

Ainsi, les différences du taux de colonisation par les champignons mycorhiziens observées sur le dispositif expérimental de Pierrelaye semblent être liées principalement aux taux de cadmium et de phosphore du sol.

D'autre part, l'identification moléculaire des champignons associés aux racines par amplification des régions ITS a permis d'identifier 47 OTUs au total, dont 7 appartenant aux champignons endomycorhiziens, 19 aux champignons ectomycorhiziens et 21 aux champignons saprophytes ou endophytes/parasites. L'amplification des régions ITS des champignons en association avec les racines des peupliers a permis de mettre en évidence une diversité d'espèces retrouvées, de prépondérances et de nombre entre les différents clones de peuplier et les parcelles.

Dans cette étude, seules 7 OTUs appartenant aux champignons endomycorhiziens ont été identifiées sur les racines des peupliers ce qui est fidèle aux résultats d'autres études réalisées en utilisant le même protocole expérimental (Vallino *et al.*, 2006 ; Zarei *et al.*, 2008a ; Bedini *et al.*, 2010 ; Zarei *et al.*, 2010). De plus, il a été montré que les environnements fortement anthropisés (agriculture intensive ou site pollué) présentaient la diversité la plus faible en terme d'espèces de champignons endomycorhiziens recensées avec une moyenne de 5,2 OTU par plante hôte (Öpik *et al.*, 2006). Or le site de Pierrelaye, une ancienne zone maraîchère polluée par les eaux usées de Paris, rentre parfaitement dans cette catégorie. **La majorité des OTU recensées sur les racines des peupliers du dispositif de Pierrelaye appartiennent au genre *Glomus*.**

Ce genre est largement répandu dans les écosystèmes, que ce soit dans les forêts tropicales (Wubet *et al.*, 2009), les zones cultivées (Daniell *et al.*, 2001) ou les environnements perturbés (Zarei *et al.*, 2008a). En effet, ce genre possède une forte capacité de propagation soit par la dispersion de spores, soit par l'infection par le mycélium intact ou des fragments de mycélium (Daniell *et al.*, 2001). Plus particulièrement, les espèces *Glomus mosseae* et *G. intraradices/irregulare* sont fréquemment retrouvées sur des sites pollués par des ETM (Vallino *et al.*, 2006 ; Zarei *et al.*, 2008b ; Hassan *et al.*, 2011), ce qui est probablement dû à une meilleure capacité de tolérance aux ETM de ces espèces. Dans cette étude, un *Glomus* sp. (G1) a été retrouvé sur les racines de tous les peupliers testés, cette souche pourrait alors jouer un rôle important dans la protection des peupliers contre les effets délétères des ETM sur ce site. *Glomus lamellosum* (G2) était également fortement représenté sur le dispositif de Pierrelaye, une espèce pourtant plus rarement décrite sur site pollué par des ETM (Long *et al.*, 2010 ; Hassan *et al.*, 2011). **L'espèce la plus largement représentée dans cette étude appartient au genre *Diversispora*.** Ce genre a déjà été retrouvé sur des sols contaminés en ETM, associé à des plantes herbacées (Santos *et al.*, 2006 ; Hassan *et al.*, 2011). Une étude réalisée au Canada sur le peuplier et leur colonisation par les champignons endomycorhiziens sur un site non pollué a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs espèces de *Glomus* et d'autres espèces fongiques appartenant aux genres *Acaulospora* et *Scutellospora* (Chiffot *et al.*, 2009) mais aucune appartenant au genre *Diversispora*. Il est alors possible que cette espèce soit adaptée à la pollution présente sur le site de Pierrelaye.

En ce qui concerne les champignons ectomycorhiziens plusieurs OTUs ont été recensées par identification moléculaire sur le dispositif de Pierrelaye. Ils appartiennent aux genres *Peziza*, *Laccaria*, *Sebacina*, *Geopora*, *Tuber*, *Entoloma*, *Tricholoma* et *Hebeloma* ; de plus, un champignon appartenant à l'ordre des Helotiales, annoté comme formant des symbioses de type éricoïde ou ectomycorhizienne, a également été détecté. Des espèces comme *Laccaria* sp., *Hebeloma mesophaeum* et *Tricholoma* sp. sont fréquemment retrouvées sur des sites perturbés ou pollués par des ETM (Nara *et al.*, 2003 ; Krpata *et al.*, 2008 ; Regvar *et al.*, 2010). Plusieurs études réalisées sur le statut de colonisation ectomycorhizienne du peuplier, ont reporté les mêmes espèces que celles identifiées dans cette étude (Krpata *et al.*, 2008 ; Stefani *et al.*, 2009 ; Hryniewicz *et al.*, 2010). Notamment, l'équipe de Krpata *et al.* (2008) a mis en évidence la présence d'espèces des genres *Peziza*, *Laccaria*, *Sebacina*, *Tuber* et *Hebeloma* en association avec des peupliers trembles (*Populus tremula*) sur un site contaminé en ETM (Pb, Zn et Cd principalement). De même, les Ascomycètes *Geopora cervina* et *Tuber rufum* ainsi que certains Basidiomycètes comme *Laccaria* sp. faisaient partie des espèces dominantes colonisant un hybride de peuplier *P. nigra* x *maximowiczii* (Hryniewicz *et al.*, 2010). Dans le cadre de cette étude, il est intéressant de noter que **les espèces appartenant au genre *Hebeloma* ne sont pas présentes sur les racines des clones « Triplo » (*Populus***

nigra x *deltoïdes*) mais uniquement sur les racines des clones « Bakan » et « Skado » (*Populus trichocarpa* x *maximowiczii*). Et inversement, les espèces appartenant aux genres *Laccaria*, *Sebacina* et *Entoloma* sont uniquement présentes sur le système racinaire du clone « Triplo ». **Un effet dû aux génotypes de ces peupliers expliquerait de telles différences.** Une hypothèse envisageable serait que le génotype *nigra* ou *deltoïdes* du clone « Triplo » soit peu réceptif à l'association avec *Hebeloma*. L'implantation des autres espèces chez les clones « Bakan » et « Skado » serait limitée de même par leur génotype et/ou *Hebeloma* entrerait en compétition avec celles-ci. Une étude menée par l'équipe de Hryniewicz *et al.* (2010) sur le statut mycorhizien d'un peuplier *Populus nigra* x *maximowiczii* n'a pas mis en évidence la présence d'*Hebeloma*. Le génotype *nigra* est peut-être alors limitant pour l'implantation de ce champignon. Dans une étude, Khasa *et al.* (2002) a montré que le pourcentage de mycorhization de 28 clones de peupliers plantés en TCR était fortement lié au génotype de l'hôte même si les communautés fongiques n'avaient pas été identifiées. Cependant, des expériences de contact entre un champignon ectomycorhizien, *Laccaria bicolor*, et des descendants F1 issus d'un croisement entre *P. trichocarpa* et *P. deltoïdes* ont révélé des spécificités d'hôtes importantes, certains clones ne formant que peu ou pas d'ectomycorhizes (Tagu *et al.*, 2001).

Des espèces de champignons non mycorhiziens (saprophytes, endophytes ou pathogènes) ont également été détectées sur les racines des peupliers par cette méthode. Certains de ces champignons peuvent être parasitiques (*Pyrenochaeta* sp., *Ilyonectria* sp., *Phoma* sp., *Rhizoctonia* sp. etc.), bien qu'aucun symptôme pouvant le confirmer n'ait été observé sur les peupliers. Des espèces appartenant aux genres *Tetracladium* et *Mortierella* avaient déjà été reportées comme hôte du peuplier (Stefani *et al.*, 2009). **Certains champignons non-mycorhiziens endophytes ont été reportés comme pouvant participer et aider les plantes à la phytostabilisation.** Par exemple, *Trichoderma harzianum*, un champignon endophyte permettant d'améliorer la croissance de la plante, permet de doubler la production de biomasse du saule fragile (*Salix fragilis*) sur un substrat contaminé en cadmium, cobalt, nickel, manganèse et zinc, par rapport à un arbre inoculé avec un champignon ectomycorhizien (Adams *et al.*, 2007). Les saules inoculés avec *T. harzianum* pourraient alors être utilisés pour revégétaliser des sites pollués par des ETM et participer ainsi à la phytostabilisation. D'autres espèces comme *Rhizoctonia* sp. (Dhillon, 1994 ; Sen *et al.*, 1999) ou *Phialocephala* sp. (Peterson *et al.*, 2008) sont également répertoriées par certains auteurs comme potentiels endophytes non parasites. De plus, certains champignons DSE, pour « *Dark Septate Endophytes* », permettraient de protéger les plantes contre les effets néfastes des ETM. En effet, des études portant sur les communautés fongiques associées aux racines du saule marsault (*Salix caprea*) ont montré une importante diversité de ces DSE sur sol pollué et ont noté une colonisation des racines plus importante par les DSE sur

les sols les plus pollués (Likar & Regvar, 2009 ; Regvar *et al.*, 2010). Les auteurs ont alors suggéré que ces DSE pourraient améliorer la croissance du saule sur les sites fortement pollués.

- *Il serait alors intéressant d'isoler et d'étudier l'interaction entre ces champignons endophytes identifiés et le peuplier sur un substrat contaminé par des ETM.*

En conclusion, cette étude a permis de mettre en évidence la présence de champignons endo- et ectomycorhiziens en interaction avec le peuplier. Outre l'apport de connaissances au niveau des espèces mycorhiziennes s'associant au peuplier sur site pollué par des ETM, ces données suggèrent qu'utiliser des champignons symbiotiques lors d'essais de phytostabilisation peut être envisagé, vu que ces champignons se développent sur un tel sol contaminé. Cependant, **plusieurs paramètres pourraient influencer le degré de colonisation, notamment la colonisation par les champignons endo- et ectomycorhizien semblent corrélée négativement respectivement aux taux de phosphore et de cadmium (total et biodisponible) du sol.** De même, **les communautés fongiques associées aux racines semblent principalement structurées par le génotype des peupliers.** L'exemple le plus frappant est l'absence de champignons appartenant au genre *Hebeloma* sur les racines du clone « Triplo » de génotype différent des clones « Bakan » et « Skado ».

- *Ces paramètres devraient alors être étudiés de façon plus approfondie et pris en compte avant la mise en place d'essais de phytostabilisation assistée sur un site donné.*

Cette étude a également permis de mettre en évidence un certains nombre d'espèces fongiques d'intérêt, largement présentes sur les racines, appartenant aux genres *Hebeloma*, *Sebacina*, *Peziza*, *Diversispora* et *Glomus*. Or, les souches fongiques natives de sites pollués par des ETM semblent plus tolérantes et plus adaptées à ces conditions particulières que des souches issues de sites non pollués (Colpaert *et al.*, 2004 ; Goncalves *et al.*, 2009 ; Jourand *et al.*, 2010a ; Colpaert *et al.*, 2011). De plus, des souches fongiques tolérantes aux ETM semblent apporter une meilleure protection à leur plante hôte sur un substrat contaminé que des souches non tolérantes (Adriaensen *et al.*, 2004 ; Adriaensen *et al.*, 2005 ; Jourand *et al.*, 2010b).

- *Il serait alors intéressant d'isoler ces différentes souches, de tester leur capacité de résistance et tolérance aux ETM et d'étudier leur contribution en terme de phytostabilisation.*

Tableau XXXVI : Souches mycorhiziennes utilisées au cours de cette thèse et leurs origines

Désignation*	Origine			Date de prélèvement [#]	Mode d'infection
	Type d'échantillon	Essence	Lieu de prélèvement		
<i>P. involutus</i> LS01	carpophores	pin sylvestre	Lommel-Sahara (BE)	Automne 2007	ECM
<i>P. involutus</i> LS02	carpophores	pin sylvestre	Lommel-Sahara (BE)	Automne 2007	ECM
<i>P. involutus</i> LS03	carpophores	pin sylvestre	Lommel-Sahara (BE)	Automne 2007	ECM
<i>P. involutus</i> Ov01	carpophores	pin sylvestre	Overpelt (Belgique)	Automne 2007	ECM
<i>P. involutus</i> Ov02	carpophores	pin sylvestre	Overpelt (Belgique)	Automne 2007	ECM
<i>P. involutus</i> HE01	carpophores	pin sylvestre	Hechtel-Eksel (BE)	Automne 2007	ECM
<i>P. involutus</i> Pi01	carpophores	bouleau	Midlothian (Ecosse)	en collection	ECM
<i>P. involutus</i> Pi07	carpophores	inconnue	La Calamine (BE)	en collection	ECM
<i>P. involutus</i> Pi18	carpophores	inconnue	Chrzanow (Pologne)	en collection	ECM
<i>P. involutus</i> Pi04	carpophores	inconnue	Vedby (Suède)	en collection	ECM
<i>P. involutus</i> S01	carpophores	bouleau	Mirecourt	Nov. 2009	ECM
<i>P. involutus</i> V01	carpophores	bouleau/saule	Micheville boues	Nov. 2009	ECM
<i>P. involutus</i> B01	carpophores	peuplier/saule	Bordeaux	Nov. 2009	ECM
<i>P. involutus</i> B02	carpophores	peuplier/saule	Bordeaux	Nov. 2009	ECM
<i>P. involutus</i> B03	carpophores	peuplier/saule	Bordeaux	Nov. 2009	ECM
<i>P. involutus</i> B04	carpophores	peuplier/saule	Bordeaux	Nov. 2009	ECM
<i>P. involutus</i> B05	carpophores	peuplier/saule	Bordeaux	Nov. 2009	ECM
<i>P. involutus</i> B06	carpophores	peuplier/saule	Bordeaux	Nov. 2009	ECM
<i>Amanita muscaria</i> S02	carpophores	bouleau	Mirecourt	Nov. 2009	ECM
<i>Boletus edulis</i> S03	carpophores	inconnue	Mirecourt	Nov. 2009	ECM
<i>Suillus luteus</i> V03	carpophores	pin	Micheville pins	Nov. 2009	ECM
<i>Suillus luteus</i> V06	carpophores	pin	Micheville pins	Nov. 2011	ECM
Helotiales P01	racines	peuplier "Triplo"	Pierrelaye	Juin 2011	inconnu
Helotiales M01	racines	peuplier "Beaupré"	Metaleurop	Juin 2011	inconnu
Helotiales P02	racines	peuplier "Lena"	Pierrelaye	Juin 2011	inconnu
Agaricales P03	racines	peuplier "Lena"	Pierrelaye	Juin 2011	inconnu
<i>Trichopezizella</i> sp. M02	racines	peuplier "Beaupré"	Metaleurop	Juin 2011	inconnu
Helotiales M03	racines	peuplier "Beaupré"	Metaleurop	Juin 2011	inconnu
Helotiales M04	racines	peuplier "Beaupré"	Metaleurop	Juin 2011	inconnu
<i>Sebacina vermifera</i> P04	racines	peuplier "Skado"	Pierrelaye	Juin 2011	inconnu
Agaricales P05	racines	peuplier "Fritzzy-Pauley"	Pierrelaye	Juin 2011	inconnu
Helotiales P06	racines	peuplier "Skado"	Pierrelaye	Juin 2011	inconnu
<i>Hebeloma</i> sp. M05	racines	peuplier "Fritzzy-Pauley"	Metaleurop	Juin 2011	ECM
<i>H. crustuliniforme</i> P07	carpophores	peuplier "Koster"	Pierrelaye	Nov. 2011	ECM
<i>H. crustuliniforme</i> P30	carpophores	peuplier "Dorskamp"	Pierrelaye	Nov. 2011	ECM
<i>Hebeloma</i> sp. P11	carpophores	peuplier "Fritzzy-Pauley"	Pierrelaye	Nov. 2011	ECM
<i>Hebeloma</i> sp. P14	carpophores	peuplier "Dorskamp"	Pierrelaye	Nov. 2011	ECM
<i>Hebeloma</i> sp. P24	carpophores	peuplier "Skado"	Pierrelaye	Nov. 2011	ECM
<i>Hebeloma</i> sp. P25	carpophores	Peuplier "Koster"	Pierrelaye	Nov. 2011	ECM
<i>Hebeloma</i> sp. P28	carpophores	Peuplier "Skado"	Pierrelaye	Nov. 2011	ECM
<i>Hebeloma</i> sp. P32	carpophores	Peuplier "Dorskamp"	Pierrelaye	Nov. 2011	ECM
<i>H. crustuliniforme</i> P33	carpophores	Peuplier "I214"	Pierrelaye	Nov. 2011	ECM
<i>Hebeloma</i> sp. V07	carpophores	pin	Micheville pins	Nov. 2011	ECM
Helotiales V19	racines	pin	Micheville boues	Nov. 2011	inconnu
Helotiales V14	racines	bouleau	Micheville boues	Nov. 2011	inconnu
<i>Suillus</i> sp. V24	racines	pin	Micheville boues	Nov. 2011	ECM

* Les premières lettres du code d'identification font référence au site de prélèvement ; P : Pierrelaye ; V : Villerupt ; B : Bordeaux ; M : Metaleurop ; LS : Lommel-Sahara ; Ov : Overpelt ; HE : Hechtel-Ecksel ; S : lettre définie arbitrairement.

Les souches isolées à partir de novembre 2009 ont été isolées au cours de ce travail de thèse.

2. Sélection de souches fongiques performantes dans la séquestration des éléments traces métalliques

Le deuxième objectif de la thèse était alors la sélection de souches fongiques performantes dans la séquestration des ETM permettant une amélioration du potentiel de phytostabilisation de leur plante hôte. Plusieurs étapes sont alors nécessaires pour la sélection de ces souches fongiques : i) isolement à partir de racines ou de carpophores ; ii) identification et caractérisation des souches isolées ; iii) étude de leurs capacités de tolérance aux ETM ; iv) étude des capacités de mycorhization des souches ; v) étude du potentiel de phytostabilisation des souches en conditions contrôlées et sur le terrain.

2.1. Isolement de souches fongiques ectomycorhiziennes

Deux méthodes sont communément utilisées afin d'isoler des souches fongiques ectomycorhiziennes : i) les souches sont isolées directement à partir de carpophores, ii) les souches sont isolées à partir de racines ectomycorhizées.

i) En général, l'isolement de souches ectomycorhiziennes à partir de carpophores (fructifications du champignon) **est privilégié car la méthode est plus facile et plus rapide à mettre en oeuvre.** Elle consiste à sectionner le carpophore en deux et découper un explant de 0,25 à 1 cm² environ dans une zone considérée comme « stérile », c'est-à-dire contenant du mycélium pur. En général, la zone de prélèvement privilégiée se situe dans la partie interne du chapeau, car elle est moins exposée à l'environnement (particules du sol) et souvent exempte de contaminants (bactériens ou fongiques). Cependant, **les souches fongiques issues de petits carpophores (< à 5 cm de haut) sont souvent très difficiles à isoler** car ils contiennent peu de zones « stériles ». Un mycélium « pur » n'arrive alors pas à se développer sur le milieu de culture. Si le fragment prélevé est trop petit, le mycélium ne se développe pas, certainement en raison d'un manque de nutriments. De plus, les conditions climatiques et la période de l'année influencent grandement le développement des carpophores, il n'est donc pas toujours aisé d'en trouver (Egli, 2011). Par exemple, à l'automne de l'année 2010, il n'a pas été possible de récolter de carpophores car le temps était très sec. Enfin, de nombreuses espèces de champignons ectomycorhiziens appartenant aux ascomycètes ne produisent pas de fructifications.

En pratique, **lorsque les fructifications sont de grande taille (10 à 20 cm), le mycélium isolé à partir d'explants se développe dans 95 % des cas.** Ceci est particulièrement vrai pour des espèces ectomycorhiziennes comme *Paxillus involutus*, *Amanita muscaria* ou *Boletus edulis*. Dans ce cas, **la réussite de l'isolement dépend surtout de l'état du carpophore.** En effet, les souches issues de carpophores véreux

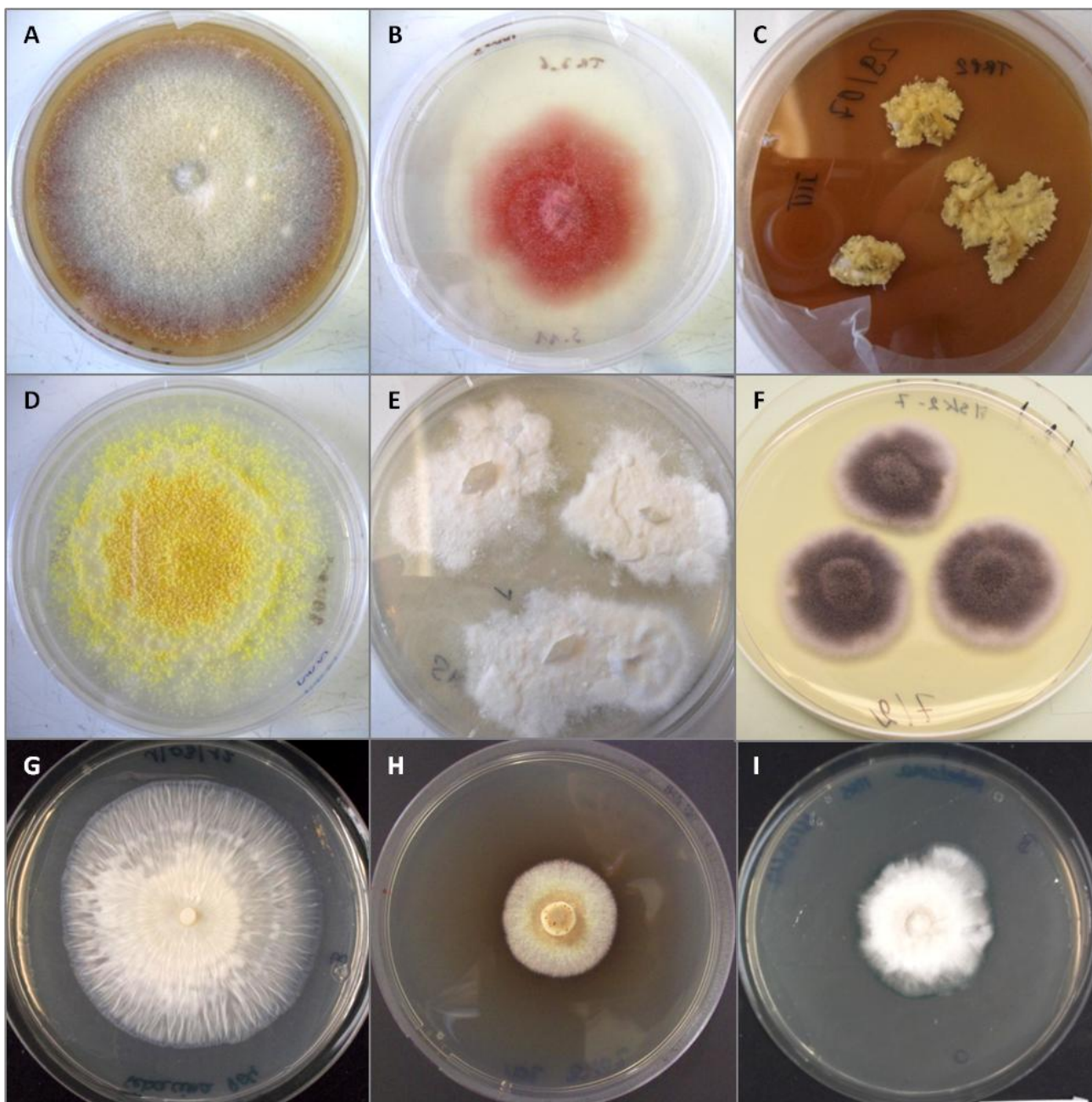


Figure 47 : Différentes souches fongiques isolées à partir de racines de peupliers et leurs modes de vie supposés. A : *Calonectria pteridis*, endophyte ou parasite ; B : *Fusarium oxysporum*, endophyte ou parasite ; C : *Auxarthron* sp., saprophyte ; D : *Penicillium* sp., saprophyte ; E : *Ganoderma* sp., saprophyte ; F : *Leptodontium* sp., endophyte DSE ; G : *Sebacina vermifera* P04, mycorhizien (ERM, ORM ou ECM en fonction de l'hôte végétal) ; H : *Trichopezizella* sp. M02, mycorhizien (ERM ou ECM en fonction de l'hôte végétal) ; I : *Hebeloma* sp. M05, ectomycorhizien.

ou présentant un début de vieillissement sont plus difficiles à isoler. **Dans le cas des fructifications de taille moyenne (5 à 10 cm), seul 50 % environ des explants forment un mycélium pur.** Et enfin, pour les carpophores de petite taille (< à 5 cm), il est très difficile d'en isoler les souches. En effet, lors de cette thèse, plusieurs campagnes de prélèvements nous ont permis de récolter plusieurs dizaines de carpophores d'*Hebeloma mesophaeum*, un champignon ectomycorhizien fréquemment retrouvé sur des sites pollués par des ETM, sans toutefois en permettre l'isolement. **Deux campagnes de prélèvements** réalisées en novembre 2009 et 2011 nous ont permis **d'isoler plusieurs espèces ectomycorhiziennes à partir de carpophores appartenant majoritairement aux genres *Hebeloma*, *Paxillus* et *Suillus*** (Tableau XXXVI).

ii) Quoi qu'il en soit, la population des fructifications ne reflète généralement pas la population totale des espèces des champignons mycorhiziens associés aux racines des arbres (Guidot *et al.*, 2001 ; Yamada & Katsuya, 2001). Ainsi, une approche d'isolement de souches fongiques ectomycorhiziennes directement à partir de racines mycorhizées a été réalisée afin d'accéder aux souches qui ne produiraient pas de carpophores dans les conditions de terrain données, et à terme d'enrichir notre collection.

Lors de l'isolement de champignons mycorhiziens à partir de racines mycorhizées, l'étape cruciale est la désinfection des racines. En effet, le sol présent sur les racines mycorhizées contient de nombreux contaminants, bactériens ou fongiques. De plus, le mycélium extramatriciel des ectomycorhizes, en se liant aux particules du sol, a tendance à en retenir beaucoup plus qu'une racine non mycorhizée. Il est alors nécessaire de détruire les bactéries et les champignons saprophytes associés aux ectomycorhizes sans pour autant détruire la souche d'intérêt. Deux modes de désinfection sont couramment utilisés : soit par immersion 30 secondes dans de l' H_2O_2 à 30 % (Menkis *et al.*, 2005 ; Menkis & Vasaitis, 2011), soit par immersion dans de l'eau de javel à 2,3 % pendant 3 minutes (Chen *et al.*, 2012 ; Tan *et al.*, 2012) éventuellement additionnée du détergent tween 80 à 2,5 % (Duckett & Read, 1995 ; Silvani *et al.*, 2008). Les ectomycorhizes sont ensuite rincées trois fois à l'eau distillée stérile afin d'éliminer le désinfectant. Puis chaque ectomycorhize sélectionnée est déposée sur une boîte de Pétri contenant un milieu de culture gélosé. **Plusieurs milieux de cultures différents** (malt, MMN, N2P2 et Pachlewski) ont été sélectionnés car les souches ectomycorhiziennes n'ont pas forcément les mêmes optima de croissance en fonction des sources nutritives disponibles dans le milieu. **Deux antibiotiques à spectre large** ont également été ajoutés aux milieux de culture afin d'éliminer un maximum de contaminants bactériens : l'ampicilline, un inhibiteur de synthèse de la paroi bactérienne (plutôt spécifique des bactéries dites « gram - ») ; et le chloramphénicol, un inhibiteur de synthèse protéique (plutôt spécifique des bactéries « gram + »). Le tableau XXXVI résume les différentes souches fongiques mycorhiziennes isolées au cours de différentes campagnes de prélèvements.

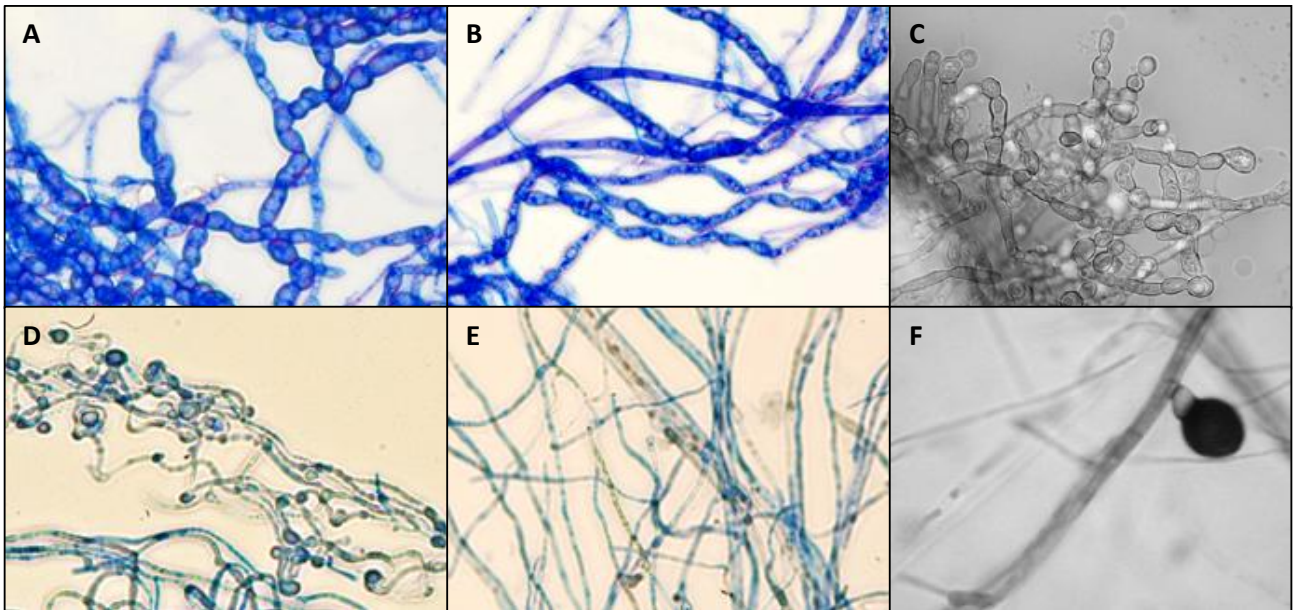


Figure 48 : Caractéristiques morphologiques des hyphes de diverses souches fongiques observées au microscope optique (x 400). A : appareil conidien macronémé de la souche Helotiales P02 de type *Exophiala* sp. ; B : appareil conidien macronémé de la souche Helotiales P06 (le même a été observé chez P01 et M03) de type *Exophiala* sp. ; C : appareil conidien macronémé de la souche H93 de *Exophiala pisciphila* (Zhang *et al.*, 2008) ; D : appareil conidien semi-micronémé de la souche Helotiales M01 (le même a été observé chez M04) de type *Humicola* sp. ; E : mycélium de *Sebacina vermifera* P04 ; F : appareil conidien semi-micronémé d'*Humicola* sp.³³.

³³ <http://microfungi.truman.edu>

Lors d'une première campagne de prélèvements sur les sites de Pierrelaye et Metaleurop en juin 2011, environ 4400 ectomycorhizes ont été prélevées sur 7 clones de peupliers de génotypes différents (Beaupré, Lena, Triplo, Skado, I214, Frtizi-Pauley, *P. nigra*) provenant de 13 placettes différentes et ont été mises en culture. Des échantillons racinaires de cinq arbres ont été prélevés par placette et les ectomycorhizes ont été regroupées par placette. Le développement des champignons à partir des racines a ensuite été observé régulièrement. Dans les deux premières semaines de croissance, les boîtes contaminées par des bactéries et celles colonisées par des champignons à croissance rapide (la plupart des champignons saprophytes ont une croissance rapide) ont été éliminées. Lorsque la présence de spores était observée, les boîtes étaient également éliminées car la plupart des champignons ectomycorhiziens ont une croissance lente et ne sporulent pas (Menkis *et al.*, 2005). Dans le cas d'une désinfection à l' H_2O_2 , seul 23 % des boîtes étaient contaminées alors que dans le cas de la désinfection à la javel, 40 % d'entre elles étaient contaminées. Si aucun mycélium ne s'était développé au bout de 3 mois, les boîtes étaient jetées. Dans cette expérience, une absence de développement microbien a été observée sur environ 40 % des boîtes quel que soit le mode de désinfection utilisé.

Environ 30 % des boîtes présentaient un développement mycélien avec un profil morphologique pouvant correspondre à une espèce ectomycorhizienne (croissance lente, absence de spores...). Seulement, la même souche peut être isolée en de nombreux exemplaires. Au final, 38 souches fongiques différentes ont été sélectionnées comme champignons ectomycorhiziens potentiels, soit 0,9 % des boîtes préparées initialement. L'ADN génomique de ces champignons a été extrait afin de les identifier par amplification des régions ITS. Quelques exemples des souches isolées sont présentés dans la figure 47. **Sur les 38 souches récoltées, seules 11 seraient ectomycorhiziennes, soit 0,25 % des boîtes préparées initialement**, dont une seule isolée à partir de racines désinfectées à l'eau de javel. Huit d'entre elles correspondent à des champignons de l'ordre des Helotiales et pourraient former des mycorhizes éricoïdes (en association avec les plantes de la famille des éricacées) ou des ectomycorhizes en fonction de l'hôte. Pour les autres souches, nous avons réussi à isoler et identifier deux agaricales proches des genres *Laccaria* sp. ou *Tricholoma* sp., un *Hebeloma* sp. et un *Sebacina vermifera*, espèces qui correspondent aux espèces fongiques identifiées sur les racines de peuplier du site de Pierrelaye (Tableau XXXV). La désinfection à l'eau de javel semblant moins performante que la désinfection à l' H_2O_2 , elle a finalement été abandonnée lors des campagnes de prélèvement suivantes.

La méthode d'isolement de souches fongiques mycorhiziennes à partir de racines est lourde à mettre en place et longue mais permet d'isoler des souches fongiques ne produisant pas de fructifications comme certains membres des Helotiales ou d'autres difficiles à isoler à partir de carpophores comme les hébélomes. En général, avec cette méthode, seuls 30 à 40 % des isolements réalisés permettent d'obtenir un

Tableau XXXVII : Résultats de la comparaison des séquences ITS amplifiées avec le couple d'amorces ITS1-ITS4 de quelques souches fongiques isolées à la base de données NCBI par blast³⁴

n° de souche	Affiliation*	n° d'accèsion	Score max. [#]	e-value [†]	Identité max. [‡]
P01	Helotiales sp.	JN859275	994	0,0	99 %
	Ericoid mycorrhizal sp.	AF269067	874	0,0	96 %
M01	Ascomyta sp.	FJ896405	708	0,0	92 %
	<i>Cudoniella flavus</i>	JQ256415	527	4.10 ⁻¹⁴⁶	91%
M04	Ascomyta sp.	FJ896405	723	0,0	92 %
	<i>Cudoniella flavus</i>	JQ256415	538	2.10 ⁻¹⁴⁸	92 %
P02	Helotiales sp.	JN859281	159	2.10 ⁻³⁵	92 %
	Ericoid mycorrhizal sp.	AY046400	148	3.10 ⁻³²	90 %
M03	Helotiales sp.	JN859279	926	0,0	99 %
	Ericoid mycorrhizal sp.	AY046400	845	0,0	97 %
M05	<i>H. leucosarx</i>	AY948191	887	0,0	99 %
	<i>H. amnophilum</i>	AY948190	887	0,0	99 %
P05	Agaricales sp.	AM076659	1042	0,0	94 %
	<i>Lepista nebularis</i>	DQ149727	555	2.10 ⁻¹⁵⁴	94 %
P03	Agaricales sp.	AM076659	1048	0,0	94 %
	<i>Lepista nebularis</i>	DQ149727	577	4.10 ⁻¹⁶¹	82 %
M02	Helotiales sp.	DQ350130	913	0,0	99 %
	<i>Trichopezizella nidulus</i>	U57813	776	0,0	94 %
P06	Helotiales sp.	JN859265	1007	0,0	99 %
	Ericoid mycorrhizal sp.	AF269067	887	0,0	96 %
P04	<i>Sebacina</i> sp.	EU910924	1086	0,0	99 %
	<i>Sebacina vermifera</i>	JQ711843	852	0,0	92 %

* Pour chaque souche, la première ligne correspond au premier résultat de blast obtenu dans la base de données « *nucleotide collection nr/nt* » et la deuxième ligne correspond au premier résultat obtenu en excluant les échantillons non cultivables ou environnementaux de cette base de données.

Plus le score maximum est élevé, plus il y a d'identité entre les séquences.

† Plus la e-value est proche de 0, plus il y a d'homologie entre les séquences.

‡ L'identité maximum représente l'identité observée dans la zone commune entre les deux séquences.

³⁴ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

mycélium pur ; le reste correspondant aux isoléments contaminés par des bactéries, ou présentant un développement de plusieurs mycelia à la fois, ou une absence de croissance (Kwasna *et al.*, 2008 ; Menkis & Vasaitis, 2011 ; Chen *et al.*, 2012). Cependant, le taux d'isolement de souches mycorhiziennes est généralement très faible, de l'ordre de 0,1 à 1 % (Menkis *et al.*, 2005 ; Kwasna *et al.*, 2008 ; Chen *et al.*, 2012). Certains champignons mycorhiziens ne sont peut-être pas cultivables, ce qui pourrait expliquer le faible taux de rendement de la méthode (Chen *et al.*, 2012).

- *Une solution pour augmenter ce rendement serait alors d'utiliser des milieux de cultures très différents, en faisant par exemple varier les sources de carbone ou d'azote, afin d'augmenter les chances d'isoler les souches dans des conditions optimum de croissance.*

Après caractérisation, les différentes souches isolées sont ensuite testées pour déterminer leur milieu de culture optimum de croissance et leur tolérance aux ETM. Les plus tolérantes pourront ensuite être utilisées en confrontation avec le peuplier sur sol pollué.

2.2. Caractérisation morphologique et moléculaire des souches fongiques isolées

2.2.1. Caractérisation morphologique

Les différentes souches fongiques d'intérêt étant isolées, une étape de caractérisation des souches est nécessaire. Une **observation microscopique** de ces souches a tout d'abord été réalisée après coloration des structures fongiques au bleu d'aniline. En effet, dans un premier temps, la présence de *septa* (cloisons) dans les hyphes permet de confirmer l'appartenance des souches aux groupes des Ascomycètes ou des Basidiomycètes. Ensuite, la présence de structures de reproduction asexuée peut aider à la caractérisation des souches. Notamment, la reproduction asexuée est rare chez les Basidiomycètes et fréquemment observée chez les Ascomycètes. Les différentes structures de reproduction asexuée des souches Helotiales P01, P02, P06, M01, M03 et M04 ont alors été observées afin de compléter leur caractérisation et sont présentées dans la figure 48. Les appareils conidiens varient d'une espèce à l'autre et peuvent être de trois types différents : i) micronémé : la conidie (ou spore) est directement en contact avec l'hyphe ; ii) semi-micronémé : la conidie est portée par un hyphe court appelé conidiophore ; iii) macronémé : la (les) conidie(s) est (sont) portée(s) par un conidiophore plus complexe (Kiffer & Morelet, 1997). Ainsi **les appareils conidiens des souches M01 et M04 sont de type semi-micronémé alors que les appareils conidiens des souches P01, P02, P06 et M03 sont de type macronémé** avec plusieurs conidies enchainées les unes derrière les autres. La souche *Sebacina* P04, appartenant au groupe des Basidiomycètes, ne

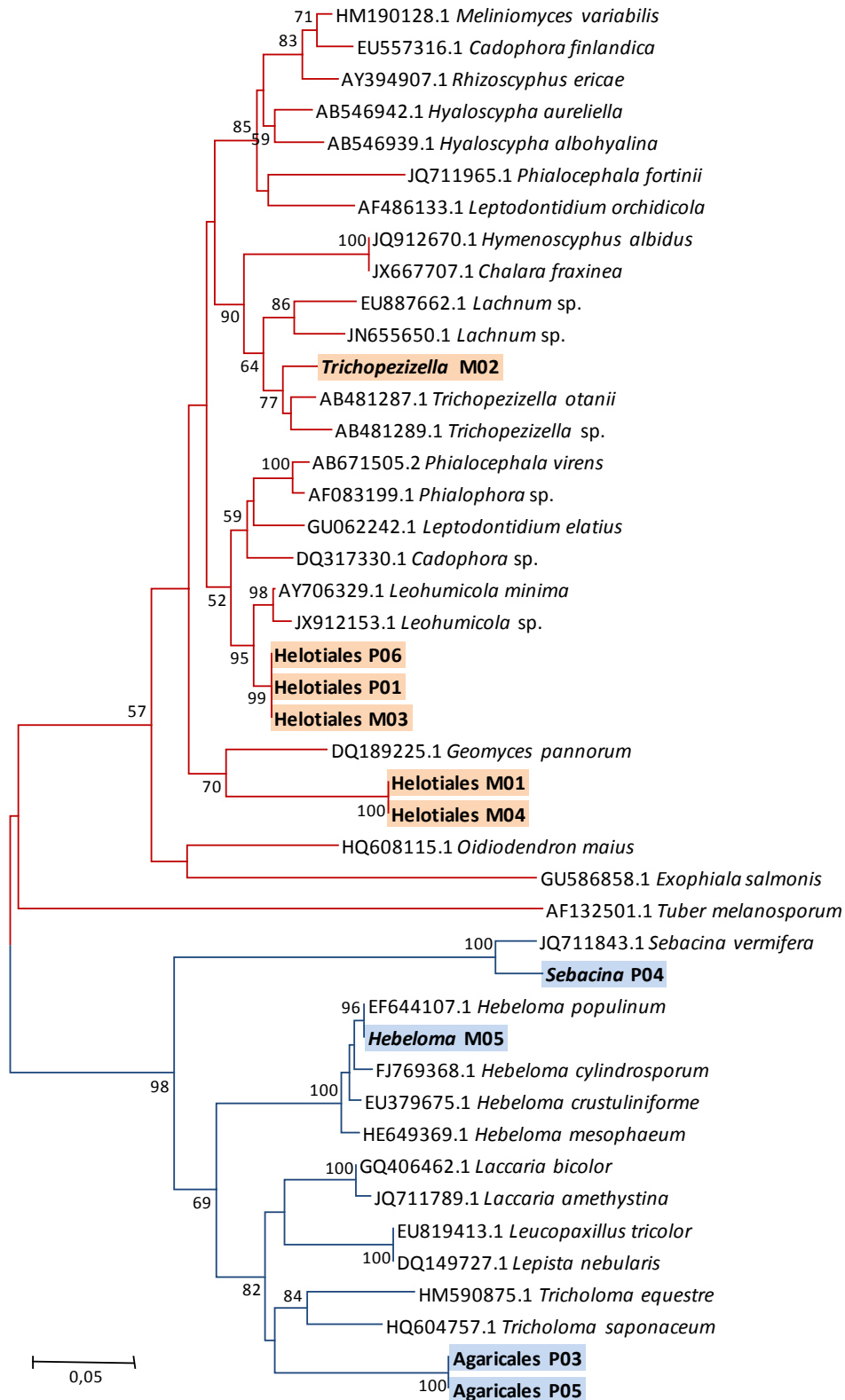


Figure 49 : Arbre phylogénétique constitué à partir des séquences ITS des souches fongiques isolées à Pierrelaye et Metaleurop. L'arbre a été constitué à l'aide du logiciel Mega 4 après alignement des séquences par ClustalW d'après la méthode de « *Neighbor-Joining* ». Les distances d'évolution ont été calculées à l'aide de la méthode du paramètre Kimura-2. Les valeurs de *bootstrap* ont été obtenues à partir de 1000 répétitions. Les séquences ITS d'espèces connues ont été ajoutées afin d'améliorer la compréhension de l'arbre. Les espèces appartenant aux Ascomycètes apparaissent en rouge et celles appartenant aux Basidiomycètes en bleu.

présente aucune structure de reproduction asexuée. De plus, l'observation des appareils conidiens nous a permis d'observer que les souches M01 et M04, et P01 et P06 sont respectivement identiques morphologiquement.

Dans le cas où les souches ont été isolées à partir de carpophores, il est souvent possible de les caractériser directement car le mycélium qui se développe est souvent caractéristique de l'espèce isolée. Par exemple, dans le cadre de ce travail, les souches de *P. involutus*, *S. luteus* et *Hebeloma* sp. ont été directement identifiées comme telles grâce à **l'aspect et/ou à l'odeur du mycélium**. Ainsi, le mycélium de *P. involutus* est de couleur brun-orangé, avec une odeur aromatique parfois très prononcée. Le mycélium de *S. luteus* est de couleur brune à beige avec une forte odeur de bolet. Enfin, le mycélium d'*Hebeloma* est blanc à crème avec une odeur de radis.

2.2.2. Caractérisation moléculaire

Afin de préciser le genre et/ou l'espèce des différentes souches fongiques isolées, **leurs ADN génomiques ont été extraits afin de réaliser une amplification de leurs régions ITS**. Les séquences des différents produits PCR obtenus ont ensuite été comparées par BLAST à la base de données du NCBI. En général, le résultat présentant le plus d'homologie avec la séquence d'intérêt a été retenu. Le tableau XXXVII présente les résultats de BLAST obtenus pour les quelques souches isolées des racines de peupliers prélevées à Pierrelaye et Metaleurop en juin 2011. Cependant, **l'identification moléculaire des souches fongiques présente plusieurs limitations**.

Premièrement, dans certains cas, l'ADNg extrait contenait **une forte proportion d'inhibiteurs de PCR** empêchant ainsi l'amplification des régions ITS ou la réaction de séquençage. La présence de composés aromatiques contenus dans le mycélium de champignons présentant une forte odeur peut notamment inhiber la PCR. De même, les pigments contenus dans certains mycélia très colorés peuvent également empêcher l'amplification. Il a ainsi été très difficile d'amplifier les régions ITS de la souche *Helotiales* P02 et le rendement de séquençage était de mauvaise qualité (moins de 150 pb amplifiées au lieu des 750 à 1000 habituelles). De même, l'amplification des régions ITS des souches *Hebeloma* P11, P14, P24, P25, P28 et P32 a posé problème et n'a pas permis d'obtenir une séquence complète.

Deuxièmement, pour certaines souches, cette méthode ne nous a **pas permis de déterminer le genre ou l'espèce**. C'est le cas par exemple pour les souches P01, P02, P06, M01, M03 et M04 qui appartiennent à l'ordre des *Helotiales* et qui pourraient former des mycorhizes de type éricoïde ou des ectomycorhizes en fonction de l'hôte végétal. De même, il n'a pas été possible de déterminer le genre des souches P03 et P05 qui appartiendraient à l'ordre des *Agaricales*. Un **arbre phylogénétique** a alors été

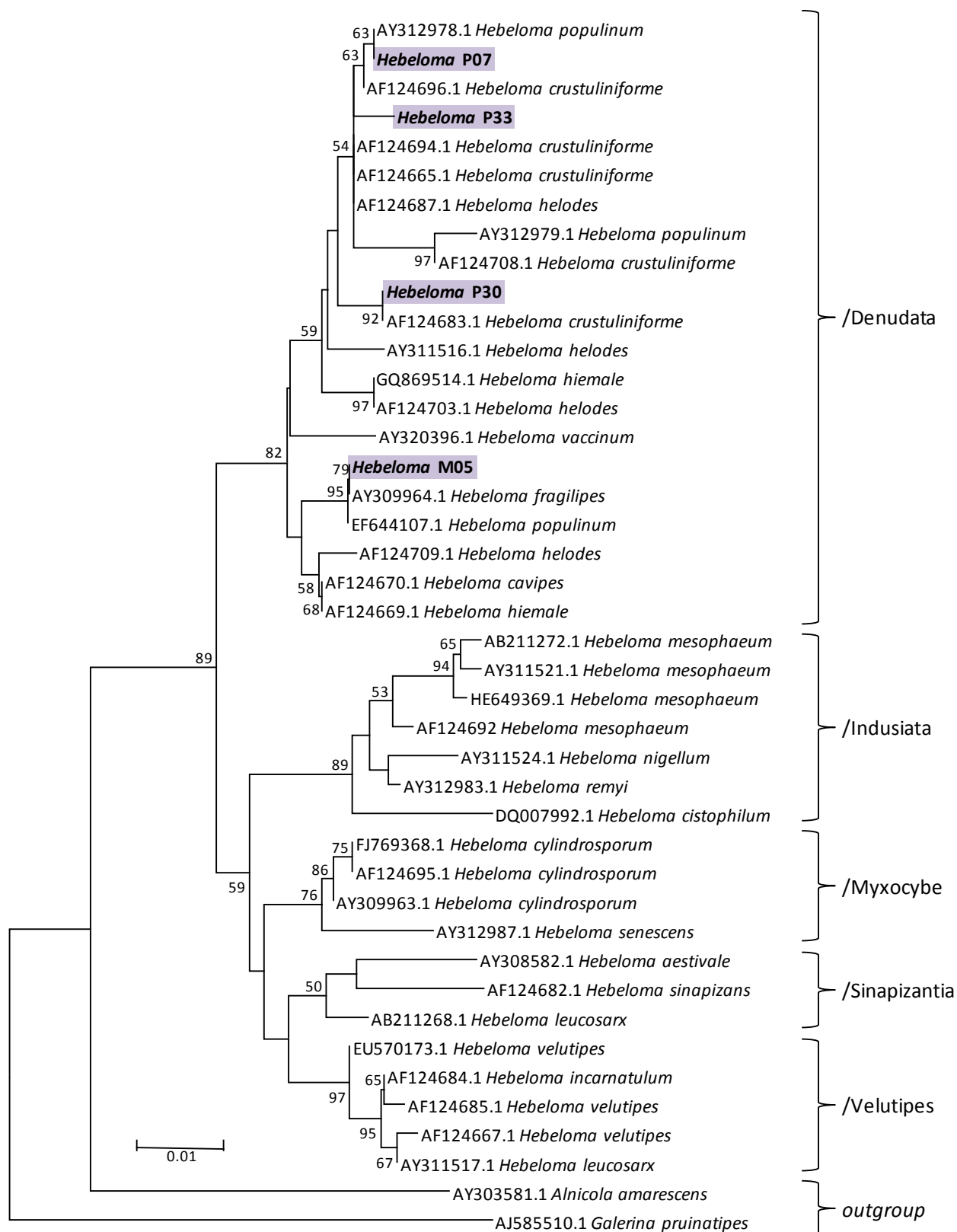


Figure 50 : Arbre phylogénétique constitué à partir des séquences ITS des souches fongiques isolées à Pierrelaye et Metaleurop appartenant au genre *Hebeloma*. L'arbre a été constitué à l'aide du logiciel Mega 4 après alignement des séquences par ClustalW d'après la méthode de « Neighbor-Joining ». Les distances d'évolution ont été calculées à l'aide de la méthode du paramètre Kimura-2. Les valeurs de *bootstrap* ont été obtenues à partir de 1000 répétitions. Les séquences ITS d'espèces connues ont été ajoutées afin d'améliorer la compréhension de l'arbre. Les différents clades décrits par Boyle *et al.* (2006) sont également représentés.

réalisé à partir de ces séquences ITS afin de préciser l'affiliation de ces souches. L'arbre obtenu est présenté dans la figure 49. Cet arbre nous a permis de vérifier l'appartenance de ces souches à l'ordre des Helotiales ou des Agaricales sans toutefois nous permettre d'identifier avec précision le genre ou l'espèce de ces souches. Néanmoins, les Helotiales P01, P06 et M03 semblent proches du genre *Leohumicola*, alors que les Helotiales M01 et M04 seraient plus proches du genre *Geomyces*, deux genres connus pour posséder des espèces mycorhiziennes de type éricoïde. Les Agaricales P03 et P05 semblent plus proches du genre *Tricholoma*. Cet arbre a également permis de confirmer l'appartenance des souches M02, P04 et M05 respectivement aux genres *Trichopezizella*, *Sebacina* et *Hebeloma*. L'étude de l'arbre a également permis de mettre en évidence que **les souches P03 et P05 ; M01 et M04 ; et P01, P06 et M03 sont respectivement très proches**. Un alignement de séquences nous a permis d'observer 100 % d'identité entre les séquences. Ce sont donc probablement **plusieurs isolats de la même souche** à l'exception de M03 (issue de Metaleurop) dont l'origine est trop éloignée géographiquement des souches P01 et P06 (issues de Pierrelaye).

Enfin, dans certains cas, il est très **difficile de discriminer l'espèce. C'est notamment le cas au sein du genre *Hebeloma* car les différents espèces appartenant à ce genre sont très difficiles à caractériser morphologiquement et phylogénétiquement** (Boyle *et al.*, 2006). Afin de préciser l'affiliation des souches M05, P07, P30 et P33, un arbre phylogénétique a été construit (Figure 50). D'après l'arbre, les souches *Hebeloma* M05, P07, P30/P33 pourraient alors appartenir respectivement aux espèces *fragilipes*, *populinum* et *crustuliniforme*. Cependant, les espèces appartenant au *clade* Denudata regroupant ces trois espèces sont très proches phylogénétiquement et présentent parfois des identités de séquences entre deux espèces différentes (Boyle *et al.*, 2006). Les souches P07, P30 et P33 ont alors été classées comme *H. crustuliniforme* en raison de leur appartenance à ce clade et de l'aspect de leurs carpophores (chair épaisse, blanc crème, chapeau plat).

2.3. Détermination du milieu optimum de croissance

Chaque souche fongique possède un optimum de croissance en fonction des sources nutritives particulières disponibles dans le milieu (C, N...). Il est alors important de déterminer le milieu optimal de chaque souche permettant d'améliorer ainsi leur vitesse de croissance afin de faciliter les expérimentations au laboratoire et également d'un point de vue plus appliqué, afin d'augmenter le rendement de production d'inoculum en vue d'une expérimentation sur le terrain. Pour cela, des explants sont déposés sur différents milieux de culture (malt, MMN, N2P2 et Pachlewski) dont la composition est résumée dans le tableau comparatif XXXVIII. La figure 51 présente les principaux profils de croissance obtenus lors de ces tests. Certaines souches comme *Hebeloma* sp. M05 et P32 ou Helotiales P01 sont capables de se développer de la même façon quel que soit le milieu choisi. D'autres souches en revanche, comme *Hebeloma* sp. P07, P14 et

Tableau XXXVIII : Récapitulatif de la composition des différents milieux de culture utilisés pour l'isolement et la conservation de souches fongiques mycorhiziennes

Composés	Milieux de culture			
	Malt	MMN	N2P2	Pachlewski
Macro-éléments (mg/l)				
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	250	-
(NH ₄) ₂ HPO ₄	-	250	-	-
(NH ₄) ₂ C ₄ H ₄ O ₆	-	-	-	2300
KH ₂ PO ₄	-	500	250	1000
Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	-	-	160	-
NaH ₂ PO ₄	-	-	4,5	-
CaCl ₂ , 2H ₂ O	-	50	50	-
MgSO ₄ , 7H ₂ O	-	150	150	500
NaCl	-	25	-	-
Micro-éléments (mg/l)				
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	-	-	0,63	0,63
MnSO ₄ , H ₂ O	-	-	1,54	1,54
CuSO ₄ , 5H ₂ O	-	-	0,25	0,25
Mo ₇ O ₂ NH ₄ , 4H ₂ O	-	-	0,05	0,05
H ₃ BO ₃	-	-	1,28	1,28
Fe-EDTA	-	-	3,44	3,44
FeCl ₃ , 6H ₂ O	-	1	-	-
C ₆ H ₅ FeO ₇	-	-	12	-
Vitamines (µg/l)				
thiamine	-	100	40	10
Source de carbone (sucres) (g/l)				
glucose	-	10	2,5	20
maltose	-	-	-	5
extrait de malt	12	-	-	-

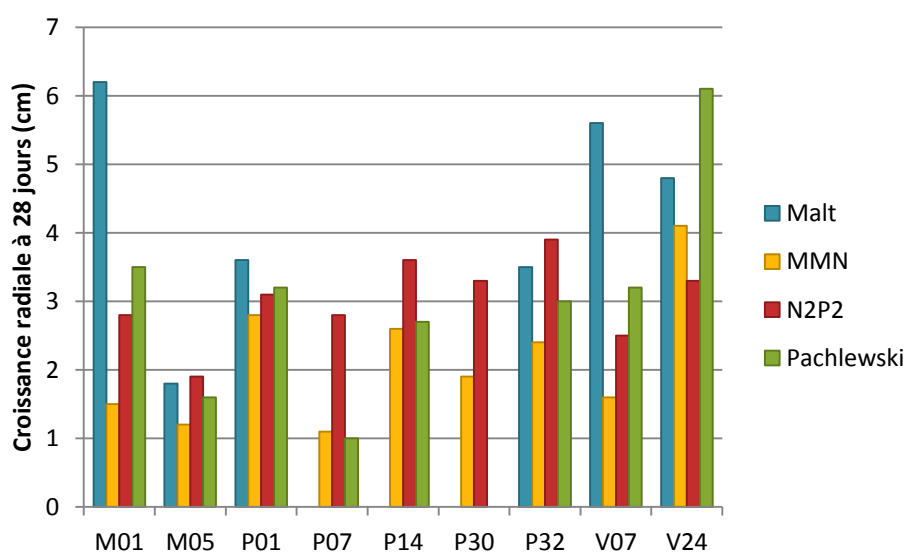


Figure 51 : Croissance des souches fongiques mycorhiziennes en fonction du milieu de culture. La croissance radiale a été mesurée au bout de 28 jours de croissance (n = 1).

P30 sont incapables de se développer sur le milieu malt. Dans la plupart des cas, les souches ont un développement important sur un milieu de culture donné et présentent un développement 1,5 à 3 fois moindre sur d'autres milieux de culture. D'une manière générale, nous avons constaté que les souches appartenant au genre *Hebeloma* se développent mieux sur le milieu N2P2 alors que les *Suillus* se développent mieux sur les milieux Pachlewski et malt. Les souches de *Paxillus involutus* présentent une meilleure croissance sur le milieu MMN et les souches de l'ordre des Helotiales préfèrent les milieux malt ou N2P2. Le mycélium de plusieurs espèces appartenant au genre *Laccaria* (*bicolor*, *tortilis* et *proxima*) se développe plus rapidement et avec une production de biomasse plus importante sur le milieu Pachlewski que sur le milieu MMN (résultats non présentés).

Il a été montré que les champignons mycorhiziens n'ont pas les mêmes optima de croissance en fonction des sources nutritives disponibles dans le milieu. Par exemple, la source de carbone utilisée peut influencer la croissance du mycélium. Certains champignons éricoïdes comme *Hymenoscyphus ericae* sont ainsi capables d'utiliser le saccharose comme source de carbone alors que des champignons ectomycorhiziens comme *L. bicolor* ou *P. involutus* ne semblent pas capables de l'utiliser, le taux de saccharose ne variant pas ou peu dans le milieu après 45 jours de croissance (Hughes & Mitchell, 1995). De même, le rapport carbone/azote (C/N) dans le milieu de culture semble fortement influencer la croissance du mycélium. En effet, le champignon ectomycorhizien *Suillus bovinus* a besoin d'une grande quantité de carbone alors que *L. bicolor* présente une meilleure croissance sur des milieux riches en azote (Fransson *et al.*, 2007). Il existe donc **une variabilité inter-spécifique dans la capacité des champignons à utiliser une source d'azote ou de carbone**. Il a également été montré qu'il existe **une variabilité intra-spécifique dans l'utilisation du carbone ou de l'azote**. Ainsi, la croissance de 22 souches haploïdes d'*Hebeloma cylindrosporum* a été testée en présence de plusieurs sources d'azote (sérine, phénylalanine, glycine, alanine, albumine de sérum bovin, gélatine...). Onze de ces souches étaient incapables d'utiliser au moins un de ces composés comme source d'azote. Ces différences de métabolisme sont probablement dues à un caractère récessif (Guidot *et al.*, 2005). Des résultats similaires ont été observés chez trois souches de *Tuber borchii* cultivées en présence de différentes sources de carbone (mannose, mannitol ou glucose) (Ceccaroli *et al.*, 2001). La quantité des composés présents dans le milieu de culture peuvent également avoir une forte influence sur la croissance fongique. Il a par exemple été montré qu'une forte concentration en glucose dans le milieu pouvait inhiber la croissance de *T. borchii* (Saltarelli *et al.*, 2003). Enfin, la présence de micro-éléments ou de vitamines dans le milieu peuvent avoir un rôle très important dans le développement du mycélium (Langer *et al.*, 2008).

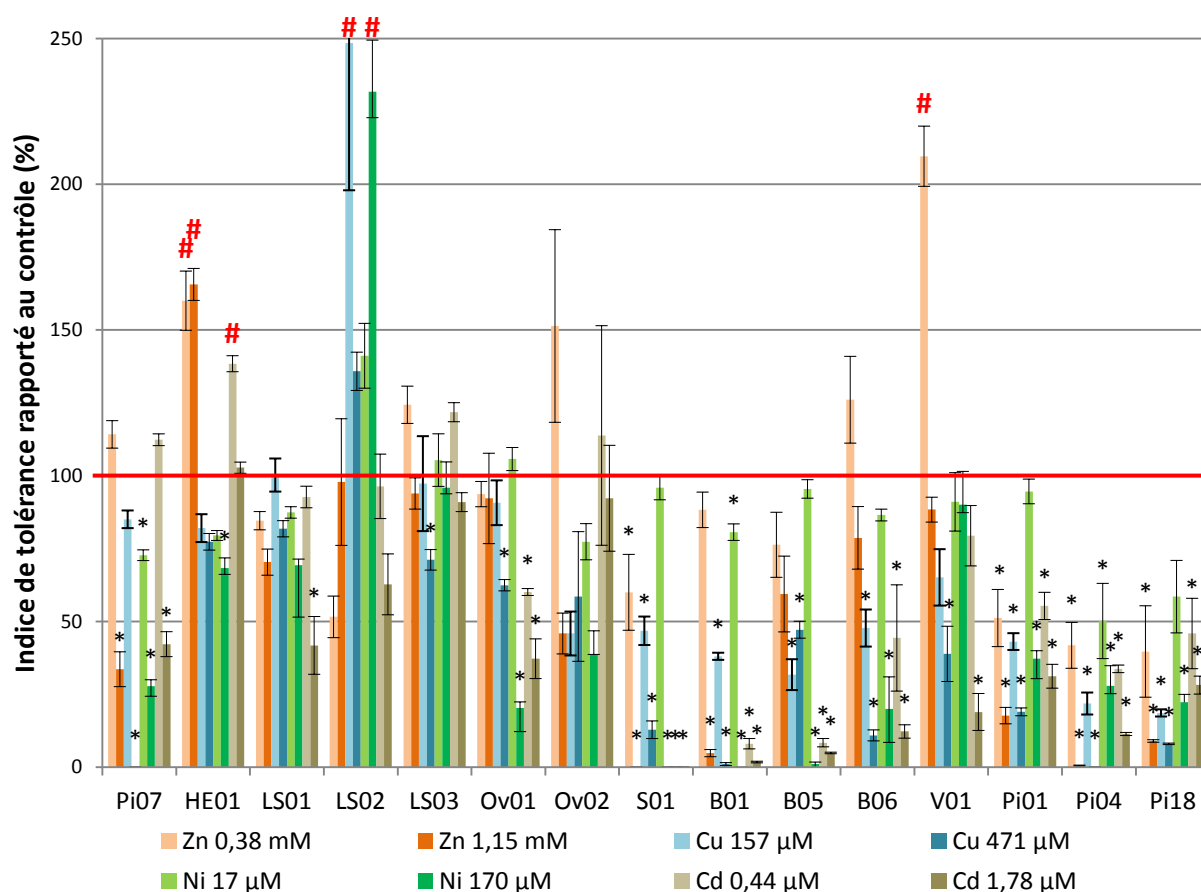


Figure 52 : Indice de tolérance de 15 souches de *Paxillus involutus* sur différents milieux. L'indice de tolérance correspond au rapport entre la production de masse sèche journalière produite sur le milieu MMN supplémenté en ETM et la production de masse sèche journalière du contrôle. La souche Pi01 a été récoltée après 14 jours ; B01 après 15 jours ; S01 et Pi04 après 21 jours ; Pi07 après 24 jours ; B05, B06, V01, Pi18, HE01, LS01, LS02, LS03, Ov01 et Ov02 après 28 jours de croissance. Les valeurs correspondent à la moyenne de 6 réplicas. Les barres représentent l'erreur standard. Des tests ANOVA à un facteur ont été réalisés sur les données ($P \leq 0,05$). * valeurs significativement inférieures au contrôle ; # valeurs significativement supérieures au contrôle.

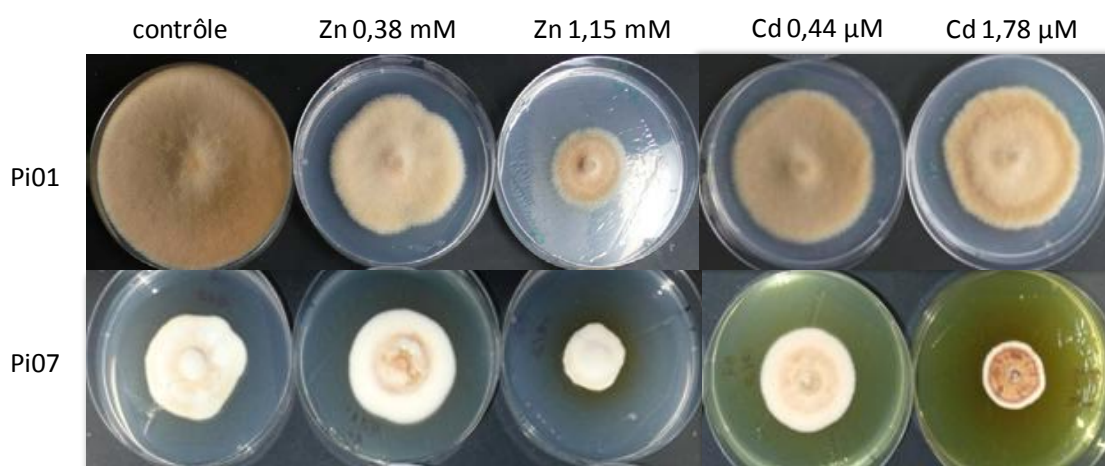


Figure 53 : Croissance de deux souches de *Paxillus involutus*, Pi01 et Pi07, modérément tolérantes au zinc et au cadmium. Un halo jaune-orangé est clairement visible dans le cas de Pi07 en présence de zinc ou de cadmium et absent avec Pi01.

Une fois le milieu de prédilection déterminé pour les différentes souches fongiques isolées, leurs capacités de tolérance en présence de divers ETM sont déterminées. Ainsi, au sein d'un même genre, un seul milieu de culture commun a été retenu rendant les tests de tolérance aux ETM des souches directement comparables.

2.4. Test de tolérance aux ETM des différentes souches fongiques isolées

2.4.1. Test de tolérance de plusieurs souches de *Paxillus involutus* aux éléments traces métalliques

Une première campagne de prélèvements de carpophores de champignons ectomycorhiziens a été réalisée à l'automne 2009 sur sites pollués par des ETM (Tableau XXXVI). Les conditions climatiques défavorables n'ont permis de récolter que peu d'espèces différentes. Parmi celles-ci, quelques souches de *Paxillus involutus*, un champignon fréquemment retrouvé en association avec le peuplier et sur sites pollués, ont été récoltées et entretenues en culture pure par repiquages successifs sur milieu MMN, le milieu le plus adapté à la croissance de ce champignon.

Afin de sélectionner des candidats intéressants dans une perspective de phytostabilisation, des tests de tolérance aux ETM ont été réalisés avec des milieux contenant du cadmium, du cuivre, du nickel ou du zinc, ces tests reflétant les principaux polluants des sites d'origine des souches étudiées. La croissance de quinze souches différentes a été testée en présence d'ETM à différentes concentrations : zinc (ZnCl_2), 25 et 75 ppm (382,5 et 1147,5 μM) ; cuivre (CuCl_2), 10 et 30 ppm (157 et 471 μM) ; cadmium (CdCl_2), 0,05 et 0,2 ppm (0,44 et 1,78 μM) ; nickel (NiCl_2), 1 et 10 ppm (17 et 170 μM). Le milieu sans ajout d'ETM constitue le milieu contrôle. Ainsi, 9 types de milieux ont été réalisés avec 15 souches testées et 6 réplicas par souche. Les données de croissance sont données dans la figure 52. De plus, pour certaines des souches testées, **une coloration du milieu de culture en jaune-orangé a été observée en présence de zinc ou de cadmium** ainsi que parfois une pigmentation brun foncé du mycélium sur les plus fortes concentrations en zinc et cadmium testées. La figure 53 présente un exemple de différence de coloration du milieu entre deux souches, Pi07 et Pi01, dont les niveaux de tolérance aux ETM sont équivalents. Un halo jaune-orangé est clairement visible dans le cas de Pi07 en présence de zinc ou de cadmium alors qu'aucune coloration du milieu n'est visible avec Pi01. En présence de cadmium à 1,78 μM , une pigmentation plus brune du mycélium de Pi07 est également visible par rapport aux autres milieux testés.

L'analyse statistique a permis de mettre en évidence une interaction positive et significative entre milieux et souches ce qui indique que les souches répondent différemment aux ETM testés. En effet, les souches n'ont pas toutes poussé sur tous les milieux. La **souche S01**, originaire d'un site non pollué, semble tolérer peu d'ETM en termes de concentration et diversité. En effet, elle tend à pousser uniquement sur les

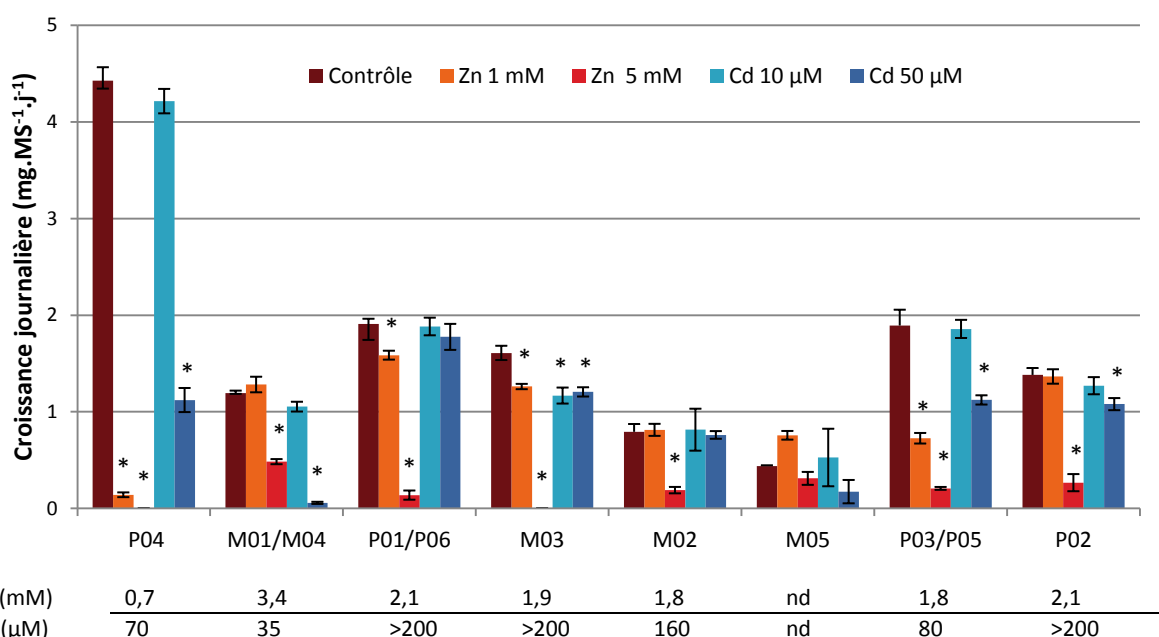
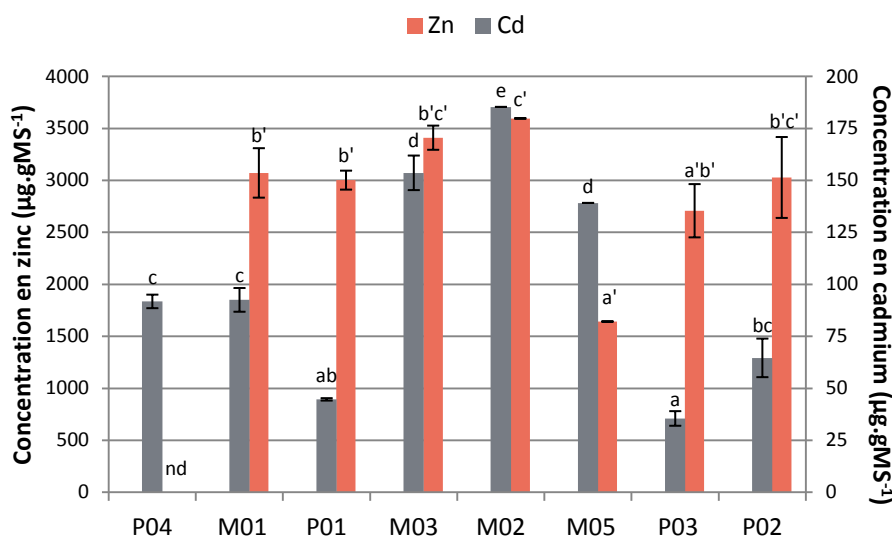


Figure 54 : Croissance journalière de 11 souches fongiques isolées sur les sites de Pierrelaye et Metaleurop et détermination de l'IC50 en présence de cadmium et de zinc. La souche P04 a été récoltée après 21 jours ; M01 et M04 après 35 jours ; P01 et P06 après 42 jours et M02, M03, M05, P02, P03 et P05 après 49 jours de croissance sur un milieu malt solide supplémenté ou non avec des ETM. Les valeurs correspondent à la moyenne de 6 répliques. Les barres représentent l'erreur standard. Pour la détermination de l'IC50, une gamme de concentrations plus large a été testée pour chaque élément (Cd : 0, 25, 50, 75, 100, 150 et 200 µM ; Zn : 0, 0,5, 1, 2, 3, 4 et 5 mM). Des tests ANOVA à un facteur ont été réalisés sur les données ($P \leq 0,05$). nd : non déterminé. * valeurs significativement inférieures au contrôle.



% total de Cd consommé	28,90	12,61	14,08	31,29	26,34	12,79	9,87	14,31
% total de Zn consommé	-	7,69	12,87	12,89	8,77	3,73	6,88	12,39
% de Cd consommé/j	1,38	0,36	0,34	0,64	0,54	0,26	0,20	0,29
% de Zn consommé/j	-	0,22	0,31	0,26	0,18	0,08	0,14	0,25

Figure 55 : Contenu en zinc et cadmium des souches isolées des sites de Pierrelaye et Metaleurop et proportion totale ou journalière consommée par rapport au zinc et au cadmium présent dans le milieu. Le contenu en zinc a été mesuré à partir du mycélium ayant poussé sur le milieu supplémenté en zinc à 1 mM et le contenu en cadmium à partir du milieu supplémenté en cadmium à 10 µM. Les résultats ont été obtenus à partir de 3 répliques par souche et par milieu. Les barres représentent l'erreur standard. Les différentes lettres représentent les différences significatives à $p < 0,05$. nd : non déterminé.

milieux supplémentés avec une faible concentration d'ETM et ne tolère pas du tout le cadmium. Bien que les souches **B01, B05 et B06** soient issues d'un milieu pollué en cuivre, seule la souche B05 montre une tolérance modérée pour cet élément lorsqu'il est présent à 471 μM (30 ppm). Il semblerait que la tolérance à la pollution soit spécifique d'une souche donnée pour un ou des ETM donnés, surtout à forte concentration. On peut en effet remarquer que si la souche B05 tolère le cuivre et le zinc, elle présente une croissance beaucoup plus faible sur les milieux supplémentés en nickel et en cadmium. À l'inverse, les souches **Pi04 et Pi18** semblent mieux tolérer le nickel et le cadmium à faible et forte teneurs que le zinc et le cuivre lorsqu'ils sont présents en fortes concentrations. Mais toutes ces souches **ont une tolérance très limitée aux ETM puisque leur croissance est fortement inhibée par les fortes concentrations en ETM.**

Cinq souches parmi les 15 semblent cependant **tolérer modérément l'ensemble des ETM.** Les souches **Pi01, Pi07, V01, Ov01 et Ov02 ont en effet poussé sur tous les milieux testés même lorsque les concentrations en ETM sont les plus élevées.** Cependant, leurs croissances respectives sont inférieures à celles du milieu contrôle. La croissance de certaines de ces souches semble être stimulée par la présence d'ETM en faibles concentrations. Par exemple, la souche V01 a une croissance deux fois plus importante sur un milieu contenant 25 ppm de zinc (382,5 μM) que sur le milieu contrôle.

Deux autres souches, **LS01 et LS03 semblent très tolérantes aux ETM car leur croissance n'est pas ou peu inhibée par les ETM testés quelle que soit la concentration.**

Enfin, **les souches LS02 et HE01 présentent une forte tolérance aux ETM testés.** En effet, leur croissance n'est pas ou peu inhibée par les différents ETM testés. De plus, la souche HE01 a une croissance 1,5 fois plus importante sur milieu supplémenté en zinc que sur le milieu contrôle et elle n'est pas affectée par le cadmium, l'élément le plus limitant en général. La souche LS02 a une croissance plus importante sur les milieux contenant du cuivre et du nickel que sur le milieu contrôle. Elle est notamment plus de deux fois supérieure sur le milieu contenant une concentration de 10 ppm (170 μM) de nickel, soit la concentration la plus élevée testée.

2.4.2. Test de tolérance aux ETM de diverses souches isolées des sites expérimentaux de Pierrelaye et Metaleurop

Une deuxième campagne de prélèvement en juin 2011, nous a permis d'isoler 11 souches potentiellement mycorhiziennes des sites de Pierrelaye et Metaleurop à partir de racines de peupliers. La tolérance au zinc et au cadmium des souches Helotiales M01, M03, M04, P01, P02 et P06, *Hebeloma* M05, Agaricales P03 et P05, *Trichopezizella* M02 et *Sebacina vermifera* P04 a alors été testée sur un milieu malt à pH 4,3 supplémenté en zinc (1 et 5 mM) et en cadmium (10 et 50 μM). Des concentrations plus élevées en zinc et cadmium ont été choisies pour cette expérience afin de sélectionner des souches particulièrement tolérantes aux ETM. Les souches ont été récoltées entre 3 et 7 semaines de croissance. De plus, afin de

Tableau XXXIX : Croissance moyenne de 9 souches appartenant au genre *Hebeloma* en présence de différentes concentrations de cadmium ou de zinc

Souches	Contrôle	Zinc			Cadmium	
		1 mM	3mM	5mM	10µM	50µM
<i>H. crustuliniforme</i> P07	123,9 ± 12,0	113,8 ± 6,8	63,3 ± 5,9*	29,7 ± 10,4*	122,2 ± 13,1	135,2 ± 9,3
<i>H. crustuliniforme</i> P33	157,2 ± 15,4	106,1 ± 7,1*	82,6 ± 4,0*	86,6 ± 24,9*	168,0 ± 17,2	158,2 ± 19,1
<i>Hebeloma</i> sp. P32	93,1 ± 7,2	68,0 ± 12,1	69,4 ± 4,9	67,5 ± 5,6	73,2 ± 3,7	76,0 ± 3,9
<i>Hebeloma</i> sp. P14	137,9 ± 54,0	90,2 ± 3,8	88,5 ± 14,5	76,2 ± 4,3	88,6 ± 4,6	79,2 ± 3,5
<i>H. crustuliniforme</i> P30	270,2 ± 13,1	101,1 ± 7,5*	72,3 ± 3,6*	64,0 ± 0,5*	215,9 ± 10,1	293,3 ± 12,3
<i>Hebeloma</i> sp. P24	101,5 ± 7,1	110,5 ± 13,7	101,6 ± 21,5	75,0 ± 5,6	110,8 ± 25,8	68,3 ± 22,4
<i>Hebeloma</i> sp. P25	86,1 ± 14,4	95,3 ± 9,0	71,4 ± 10,3	60,2 ± 10,5	106,5 ± 8,7	87,6 ± 15,1
<i>Hebeloma</i> sp. P11	86,9 ± 9,6	96,5 ± 3,1	65,9 ± 0,0	19,4 ± 16,8*	117,7 ± 7,8	108,9 ± 6,5
<i>Hebeloma</i> sp. P28	50,5 ± 31,9	109,0 ± 0,0[#]	62,3 ± 9,9	55,9 ± 0,0	91,5 ± 23,9[#]	126,9 ± 11,1[#]

Le mycélium a été récolté pour la mesure de la masse sèche après 10 semaines de croissance sur un milieu N2P2 solide supplémenté de 5 g de malt et de divers ETM.

Les valeurs correspondent à la moyenne de 5 répliques ± erreur standard et sont exprimées en mg MS.

(en gris)* valeurs significativement inférieures au contrôle à $p < 0,05$

(en gras)[#] valeurs significativement supérieures au contrôle à $p < 0,05$

déterminer la concentration inhibitrice à 50 % (IC50) en zinc et en cadmium de ces souches, des gammes de concentrations plus larges ont été testées (Cd : 0 ; 25 ; 50 ; 75 ; 100 ; 150 et 200 μM ; Zn : 0 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 et 5 mM). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 54. Les souches P03/P05, M01/M04, et P01/P06 étant considérées comme identiques, les résultats obtenus pour les deux souches au cours de cette expérience ont été associés.

Les différentes souches testées présentent **toutes une résistance modérée à forte aux ETM testés**. En effet, **la croissance de ces souches n'est pas ou peu affectée par le cadmium à la concentration de 10 μM** . De plus, certaines souches comme P01/P06, M02 et M05 ne sont pas affectées par le cadmium à une concentration plus forte (50 μM) et ont une IC50 supérieure à 200 μM . Cependant, certaines souches semblent particulièrement sensibles au zinc comme P04 ou P03/P05 pour lesquelles un ralentissement de croissance est observé à partir de la concentration à 1 mM de zinc. Les souches M01/M04, M02, M05 et P02 ne sont pas affectées par une concentration de 1 mM en zinc. Cependant, l'IC50 de ces souches est relativement faible puisqu'elle est comprise entre 1,8 et 3,4 mM. La souche ***Hebeloma* M05 semble particulièrement résistante au zinc puisqu'elle est capable de tolérer une concentration de 5 mM**.

Afin de compléter ce résultat, le contenu total (adsorbé à la paroi + absorbé) en zinc et cadmium a été mesuré pour chaque souche par dosage ICP pour les milieux contenant 1mM de zinc et 10 μM de cadmium respectivement (Figure 55). Les données sont très hétérogènes, les souches possèdent en effet des capacités différentes d'accumulation des ETM. L'accumulation de zinc dans le mycélium des différentes souches varie de 1500 à 3500 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de masse sèche. L'accumulation varie de 30 à 180 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de masse sèche pour le cadmium. Ainsi, **M02 et M03 accumulent fortement le zinc et le cadmium** alors que d'autres souches accumulent surtout le cadmium (P02, P01, M01 et P03) ou le zinc (P04, M05). La proportion de cadmium ou de zinc accumulée dans le mycélium à la fin de l'expérience a été calculée par rapport à la quantité maximum disponible dans le milieu (28,1 μg de cadmium et 1635 μg de zinc). Il apparaît que des souches comme M03 ou P04 sont capables d'assimiler jusqu'à 30 % du cadmium disponible. Les souches P01, P02 et M03 sont capables d'accumuler jusqu'à 12 % du zinc disponible. En revanche, si l'on tient compte de la vitesse de développement du mycélium, **les souches P04 et P01/P06 seraient les meilleurs extracteurs respectivement de cadmium et de zinc**.

2.4.3. Test de tolérance aux ETM de diverses souches appartenant au genre *Hebeloma*

Une campagne de prélèvements sur le site de Pierrelaye en novembre 2011 a permis de récolter plusieurs souches appartenant au genre *Hebeloma* à partir de carpophores. La tolérance au zinc (1, 3 et 5 mM) et au cadmium (10 et 50 μM) des souches P07, 11, 14, 24, 25, 28, 30, 32 et 33 a été testée dans un milieu N2P2 supplémenté avec 5 g de malt afin d'obtenir une croissance optimale de toutes les souches. Le

mycélium a été récolté pour la mesure de la masse sèche après 10 semaines de croissance. Les résultats sont donnés dans le tableau XXXIX.

Les différentes **souches d'*Hebeloma* testées présentent toutes une tolérance modérée à forte aux ETM**. En effet, les deux concentrations en **cadmium** testées, 10 et 50 μM **n'affectent pas la croissance de ces souches**. De plus, **le zinc n'a que peu ou pas d'effet sur la croissance**. Seules les souches P07, P11, P30 et P33 semblent sensibles au zinc, la souche P33 étant la plus affectée alors que la croissance de la souche P11 n'est inhibée qu'à partir de 5 mM de zinc. En revanche, la **souche P28 semble particulièrement résistante aux ETM** puisque une faible concentration de zinc (1mM) et le cadmium semblent stimuler sa croissance d'environ 200 %.

2.4.4. Discussion

D'une manière générale, l'ajout d'ETM dans les milieux de culture a pour effet une inhibition de la croissance fongique. Cependant, une stimulation de la croissance fongique a été observée en cas d'exposition à des concentrations modérées en ETM. Dans le cas de métaux essentiels (zinc, cuivre ou nickel), une faible concentration en ces éléments pourrait engendrer un effet bénéfique au niveau de la croissance fongique. Une stimulation de la croissance par de faibles concentrations en nickel (50 μM) a notamment été rapportée chez le champignon saprophyte *Macrolepiota procera* (Baptista *et al.*, 2009). Néanmoins, une telle stimulation de la croissance a également été observée en présence de cadmium, un métal non essentiel, par exemple chez *P. involutus* HE01 ou *Hebeloma* sp. P28. Ce phénomène est appelé **hormèse** et désigne une réponse de stimulation des défenses biologiques, généralement favorable, à des expositions de faibles doses d'agents générateurs de stress. Il a surtout été étudié en toxicologie et pharmacologie pour ces applications en homéopathie (Calabrese & Blain, 2005).

D'après les résultats obtenus des tests de tolérance des différentes souches fongiques aux ETM, il apparaît que l'indice de tolérance observé entre les différentes souches testées est très variable. Notamment, **une forte variabilité interspécifique** a été observée. En effet, dans le cas du zinc, très peu de souches de *Paxillus involutus* sont capables de supporter des concentrations supérieures à 1 mM. De même, la croissance des souches Agaricales P03/P05, Helotiales M03 ou *Trichopezizella* M02 est inhibée à 50 % par des concentrations inférieures à 2 mM de zinc. *Sebacina vermifera* P04 semble également particulièrement sensible au zinc puisqu'une concentration de 1 mM est responsable d'une inhibition de croissance de plus de 90 %. En revanche, les souches appartenant à l'ordre des Helotiales M01/M04, P01/P06 et P02 ont une concentration inhibitrice à 50 % supérieure à 2 mM de zinc. Les souches les plus résistantes au zinc appartiennent au genre *Hebeloma* et ne sont pas ou peu affectées par une concentration de 5 mM. Une telle

variabilité interspécifique a déjà été rapportée dans d'autres études portant sur la tolérance aux ETM de plusieurs espèces différentes de champignons mycorhiziens (Blaudez *et al.*, 2000b ; Fomina *et al.*, 2005 ; Ray *et al.*, 2005 ; Ban *et al.*, 2012). Néanmoins, la variabilité interspécifique observée lors de notre étude pourrait en partie s'expliquer par le fait que les exigences nutritionnelles de chaque souche nous ont contraintes à utiliser des milieux de culture différents. En effet, **la composition du milieu de culture peut influencer la disponibilité des ETM et ainsi modifier le niveau de tolérance des champignons**. Par exemple, l'absence de glucose ou la présence de phosphate dans le milieu de culture défavoriserait la solubilisation du phosphate de zinc par différentes souches d'*Hymenoscyphus ericae*, un champignon éricoïde (Gibson & Mitchell, 2004). De même, une augmentation du pH ferait baisser l'indice de tolérance et augmenter l'accumulation de zinc chez ce même champignon. A pH élevé, le zinc serait sous forme hydroxylée et pourrait se lier plus facilement aux constituants de la paroi alors qu'en condition acide, les cations métalliques entreraient en compétition avec les protons pour les sites d'absorption et de transport de la paroi fongique (Gibson & Mitchell, 2005).

Au vu des résultats obtenus, **une forte variabilité intraspécifique** de la tolérance a également été mise en évidence. Par exemple, certaines souches de *Paxillus involutus* comme S01 ou B01 ont été reportées comme sensibles aux ETM alors que les souches LS02 et HE01 semblent particulièrement tolérantes aux ETM. Une telle variabilité intraspécifique a également été observée dans une moindre mesure chez *Hebeloma*, les souches P07, P30 et P33 étant modérément tolérantes au zinc alors que P28 semble très résistante au zinc et au cadmium. D'autres études portant sur plusieurs souches de *Suillus luteus* (Colpaert *et al.*, 2004 ; Krznaric *et al.*, 2009), ou de *Cenococcum geophilum* (Goncalves *et al.*, 2009) ou de *Pisolithus albus* (Jourand *et al.*, 2010a) montrent qu'une telle variabilité existe et que celle-ci semble corrélée au niveau de pollution du sol d'origine des champignons. Les souches les plus tolérantes aux ETM proviendraient des sites les plus pollués. Cependant, dans notre cas, les souches les plus tolérantes ne proviennent pas forcément de sites pollués comme *P. involutus* HE01, très tolérante au cadmium et au zinc, qui provient d'un site témoin non pollué. De plus, la souche *P. involutus* B01, provenant d'un site pollué par du cuivre, ne présente pas de tolérance particulière pour cet élément. Les travaux de Blaudez *et al.* (2000b) n'avaient pas non plus montré de corrélation entre le niveau de pollution du site d'origine des souches et la tolérance de *P. involutus* ou *S. luteus*. En fait, certaines souches de champignons isolés d'un sol non contaminé seraient tout de même capables de coloniser les plantes poussant sur des milieux modérément pollués (Christie *et al.*, 2004).

La tolérance à la pollution serait alors espèce-spécifique, souche-spécifique et métal-spécifique, comme reporté par Leyval et al. (1997) avec les champignons mycorhiziens à arbuscules. Dans notre étude, certaines tendances ont pu effectivement être observées. Notamment, chez *P. involutus*, les souches tolérantes au zinc sont généralement également tolérantes au cadmium comme Pi07, HE01, LS03 et Ov02. La même tendance a été observée chez les souches appartenant au genre *Hebeloma*. De même, les souches tolérantes au cuivre sont également tolérantes au nickel comme *P. involutus* LS01 et LS02. Nos observations pourraient **s'expliquer par la spécificité des mécanismes de défense et de tolérance aux ETM chez les espèces fongiques**. Par exemple, il a été montré que chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Aspergillus fumigatus*, les transporteurs responsables de l'import du zinc dans la cellule étaient aussi responsables de l'import de cadmium (Zhao & Eide, 1996a ; Zhao & Eide, 1996b ; Vicentefranqueira et al., 2005). De plus, l'existence de mécanismes de « co-résistance » par exemple entre certains cations divalents comme le manganèse, le nickel et le zinc a été montré également chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Cakar et al., 2009). En effet, les ETM non-essentiels comme le cadmium peuvent entrer en compétition avec des ETM essentiels comme le zinc pour les transporteurs d'ions métalliques essentiels existants (Leyval et al., 1997). La mise en place de systèmes de résistance à ces éléments est donc nécessaire. Or, les ions Cu^{2+} et Cd^{2+} engendreraient l'expression d'un gène codant une thiorédoxine chez *P. involutus*. Cette thiorédoxine, produit du gène PiTrx1, contribuerait au maintien de l'homéostasie redox généralement perturbée lors d'un stress métallique (Bellion et al., 2006).

En revanche, certaines souches, comme *Sebacina vermifera* P04, sont particulièrement sensibles au zinc bien qu'elles présentent une tolérance importante au cadmium. Or, il a été montré que les métallothionéines peuvent être induites de façon différentielle selon le type de métal (Bellion et al., 2007). Le gène Pimt1 codant une métallothionéine est induit en présence de cadmium mais pas en présence de zinc chez *Paxillus involutus*.

Il existe cependant des mécanismes non-spécifiques qui induisent une tolérance comme l'excrétion de composés organiques chélatants, la complexation non-spécifique des ETM aux parois cellulaires ou encore la chélation grâce au glutathion (GSH) qui permet indirectement de transférer le cadmium sous forme complexée dans la vacuole des cellules (Bellion et al., 2006). Par exemple, une coloration du milieu de culture en jaune-orangé a été constatée chez plusieurs des souches de *P. involutus* en présence de zinc et de cadmium. Cette coloration pourrait être due à l'excrétion d'acides organiques ou de composés phénoliques dans le milieu de culture afin de complexer les ETM. Une précédente étude réalisée au laboratoire avait montré que *P. involutus* excrète des polyphénols sous forme de gouttelettes sombres à la surface du mycélium en présence de cadmium dans le milieu (Jacob et al., 2004). Il est alors probable que la coloration

observée soit due à une excrétion de polyphénols dans le milieu. Un halo autour des colonies fongiques a déjà été observé chez un champignon de type éricoïde, *Oidiodendron maius*, chez des souches tolérantes au zinc (Martino *et al.*, 2000). Une pigmentation noire des colonies tolérantes avait également été observée en situation de stress métallique chez ce champignon ainsi que chez *Gaeumannomyces cylindrosporus*, un champignon endophyte DSE, en présence de plomb (Ban *et al.*, 2012). Les pigments de la paroi cellulaire permettraient alors de complexer les ETM. Une pigmentation de certaines souches de *P. involutus* comme Pi07 a également été observée.

Enfin, en cas de stress métallique, **certains champignons mettent en place des systèmes de séquestration et d'accumulation des ETM dans leurs hyphes**. Cependant cette accumulation semble également être **ETM-dépendante, inter- et intraspécifique**. En effet, plusieurs études montrent des différences d'accumulation des ETM entre différentes espèces de champignons ectomycorhiziens ou de type éricoïde (Fomina *et al.*, 2005 ; Ray *et al.*, 2005). Par exemple, *Pisolithus tinctorius* accumule six fois plus de cadmium que *Laccaria fraterna* mais deux fois moins d'arsenic (Ray *et al.*, 2005). De même, des études réalisées sur des champignons formant des mycorhizes de type éricoïde, *H. ericae* et *O. maius*, ont montré une accumulation de zinc de l'ordre de 2 à 7 mg.g MS⁻¹ dépendante de la souche fongique (Fomina *et al.*, 2005). De plus, il a été montré que des souches de *S. luteus* sensibles au cadmium accumulent jusqu'à six fois plus de cet élément ($\approx 12000 \mu\text{g.g MS}^{-1}$) que des souches tolérantes ($\approx 2250 \mu\text{g.g MS}^{-1}$) (Krznaric *et al.*, 2009). Dans le cadre de notre étude, nous avons observé une accumulation de zinc comprise entre 1,5 et 3,5 mg.g MS⁻¹ et de cadmium de 30 à 180 $\mu\text{g.g MS}^{-1}$ dans le mycélium des souches Helotiales P01/P06, P02, M01/M04, M03, *Trichopezizella* M02, *Sebacina* P04, Agaricales P03/P05 et *Hebeloma* M05. Chez le champignon ectomycorhizien, *S. luteus*, le mycélium peut accumuler jusqu'à 15 mg.g MS⁻¹ de zinc, soit jusqu'à 10 fois plus que ce que nous avons observé (Colpaert *et al.*, 2005). Cependant, cette accumulation est fortement **dépendante de la concentration en ETM présente dans le milieu**. En effet, dans l'étude de Colpaert *et al.*, (2005), il existe une relation linéaire entre la concentration du zinc dans le milieu et la concentration dans le mycélium de *S. luteus*. Ainsi, en présence d'1 mM de zinc dans le milieu (concentration utilisée dans notre étude), l'accumulation dans le mycélium est de l'ordre de 2 mg.g MS⁻¹. De même, en présence de cadmium, la quantité mesurée dans les hyphes est dépendante de la concentration dans le milieu. A une concentration de 9 μM de cadmium (une concentration de 10 μM avait été utilisée dans notre étude), le mycélium de *S. luteus* accumule entre 40 et 103 $\mu\text{g.g MS}^{-1}$ (Krznaric *et al.*, 2009) ce qui est plus proche de ce que nous avons observé.

Chez les plantes, des seuils minimum d'accumulation du zinc et du cadmium respectivement de 1 % (10 mg.g⁻¹ MS) et 0,01 % (100 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MS) de la masse sèche des parties aériennes sont couramment admis pour qualifier les plantes hyperaccumulatrices (Sheoran *et al.*, 2011). Par exemple, les plantes

hyperaccumulatrices *Thlaspi caerulescens* et *Arabidopsis halleri* sont capables d'accumuler respectivement jusqu'à 25 et 15 mg.g⁻¹ (2,5 et 1,5 % de la biomasse) de zinc et 1000 et 250 µg.g⁻¹ (0,1 et 0,025 % de la biomasse) de cadmium sans symptôme de toxicité (Brown *et al.*, 1995 ; Bert *et al.*, 2002). Certaines des souches fongiques étudiées comme *Hebeloma* M05, *Trichopezizella* M02 ou *Helotiales* M03 pourraient alors être considérées comme hyperaccumulatrices de cadmium (> 100 µg.g⁻¹ MS). De même, sur le terrain, plusieurs études ont montré que les carpophores peuvent accumuler de fortes quantités d'ETM. Par exemple, une revue portant sur les teneurs en divers ETM de carpophores de champignons comestibles recense une dizaine d'espèces capables d'accumuler de 1 à 2 mg.g⁻¹ MS (0,1 à 0,2 %) de cadmium dont trois, *Agaricus bisporus* (champignon de Paris), *Pleurotus ostreatus* (pleurote) et *Leccinum scabrum* (bolet rude), pouvant accumuler jusqu'à 5 mg.g⁻¹ MS (0,5 %) de cet élément (Kalac, 2010). Une trentaine d'espèces seraient également capables d'accumuler plus de 25 mg.g⁻¹ MS (2,5 %) de zinc, des espèces comme *Boletus edulis* (cèpe) ou *Lactarius deliciosus* (lactaire délicieux), très appréciés pour leur qualité gustative, peuvent accumuler de 150 à 200 mg.g⁻¹ MS (15 à 20 %) de cet élément (Kalac, 2010). Les carpophores pourraient alors être considérés comme des indicateurs du niveau de contamination des sols forestiers ou agricoles. La production de carpophores n'étant possible qu'en milieu naturel pour la plupart des espèces, il serait cependant difficile d'établir des relations [concentration des ETM du sol] / [concentration des ETM dans les carpophores], de nature à conforter l'intérêt des carpophores dans le domaine de la bioindication.

Parmi les champignons testés lors de cette étude, certaines souches particulièrement tolérantes aux ETM ont pu être identifiées. **Les souches de *P. involutus* HE01 et LS02, étaient très tolérantes aux couples zinc/cadmium et nickel/cuivre respectivement.** Cette étude a également permis de sélectionner des souches **d'*Hebeloma* (P24, P28 et M05) particulièrement tolérantes au zinc et au cadmium.** Plusieurs études montrent que les champignons tolérants aux ETM apportent une meilleure protection à la plante que des champignons non tolérants (Adriaensen *et al.*, 2005 ; Adriaensen *et al.*, 2006 ; Jourand *et al.*, 2010b).

Cependant, nous ne sommes pas en mesure de dire si la tolérance observée est due à des mécanismes d'accumulation, par exemple dans la paroi fongique ou dans les organites intracellulaires, ou si cette tolérance est liée à des mécanismes de rejet des ETM hors de la cellule fongique. Dans une optique de phytostabilisation assistée par les champignons en interaction avec les racines, il serait alors intéressant de sélectionner les souches capables d'accumuler une forte quantité d'ETM dans ses hyphes comme la souche *Helotiales* M03 ou des souches capables d'immobiliser les ETM dans le sol par l'excrétion de composés chélatants.

- Afin de compléter ces résultats, il serait intéressant de déterminer plus spécifiquement les mécanismes de tolérance mis en place par ces champignons.
- D'un point de vue plus fondamental, une étude des gènes impliqués dans l'absorption et la séquestration des ETM chez un champignon ectomycorhizien, *Laccaria bicolor*, permettrait d'élargir les connaissances déjà acquises dans le domaine. Ce point sera abordé dans le chapitre portant sur l'homéostasie métallique du champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor*.
- De plus, des expériences en conditions contrôlées devraient être menées afin de s'assurer de l'effet bénéfique (amélioration de la croissance, diminution du transfert des ETM vers les parties aériennes...) de ces souches sur leur hôte végétal dans une optique de phytostabilisation.

2.5. Test des souches fongiques d'intérêt en conditions contrôlées

2.5.1. Test en pots

Les souches de *Paxillus involutus* ont été les premières à être isolées et testées pour leur tolérance aux ETM au cours de cette thèse. Plusieurs tests en conditions contrôlées ont alors été réalisés avec le peuplier, un des hôtes possible de *P. involutus*. Les deux souches les plus tolérantes aux ETM, HE01 et LS02, ainsi que la plus sensible, S01, ont été utilisées. L'inoculum fongique est préparé dans un mélange tourbe/vermiculite/milieu de culture et incorporé en proportion d' $1/10^{\text{ème}}$ à de la terre polluée non stérilisée (issue du site expérimental de Pierrelaye) ou à un substrat contrôle non pollué (2/3 terreau, 1/3 sable) ; puis des boutures de peupliers sont plantés dans ce mélange. Les peupliers sont cultivés deux mois en chambre phytotronique.

Un premier test a été réalisé en octobre 2011 en interaction avec du peuplier « Skado » en conditions hydriques non limitantes (environ 50 ml d'eau/jour/plant). A la récolte, aucune ectomycorhize n'a été observée. Un autre test a alors été réalisé en janvier 2012 en conditions hydriques plus limitantes (environ 35 ml d'eau/jour/plant), mais aucune ectomycorhize n'a non plus été observée. Un dernier test a alors été réalisé en juin 2011 en conditions hydriques très limitantes (environ 20 ml d'eau/jour/plant) avec la souche de *P. involutus*, HE01, et une souche de *Laccaria bicolor*, S238N, couramment utilisée au laboratoire pour des tests de mycorhization contrôlés comme contrôle positif. Cette fois encore, aucune ectomycorhize n'a été observée.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer l'absence d'ectomycorhization :

i) Tout d'abord, **le milieu de culture utilisé pour le développement de l'inoculum fongique peut directement influencer la capacité de mycorhization du champignon**. En effet, la composition du milieu doit permettre un développement optimum du mycélium et apporter tous les nutriments nécessaires à sa croissance (Langer *et al.*, 2008). De plus, il est recommandé que le rapport C/N du milieu soit compris entre 50 et 60. Le carbone fourni au milieu doit également être complètement consommé par le champignon avant l'inoculation de la plante sinon le développement de champignons saprophytes serait favorisé (Smith & Read, 2008). Dans notre étude, le rapport C/N était de 62 et le mycélium était particulièrement bien développé et envahissait tout le pot, le milieu de culture était donc probablement complètement consommé.

ii) **Le taux d'humidité du sol semble également avoir une influence importante sur le développement des ectomycorhizes**. Par exemple, le taux de colonisation d'une espèce de peuplier (*P. angustifolia*) par des champignons ectomycorhiziens est 33 % plus important entre une parcelle qui a été irriguée et une autre non irriguée alors que le taux de colonisation par des champignons endomycorhiziens est lui réduit de 47 % lorsque l'humidité du sol augmente (Gehring *et al.*, 2006). En fait, un taux d'humidité du sol inférieur à 7 % ou supérieur à 30 % pourrait inhiber la formation d'ectomycorhizes (Koide *et al.*, 2011). Cependant, dans notre étude, la variation des conditions hydriques n'a pas permis d'améliorer la colonisation des plants.

iii) Un autre paramètre qui peut influencer la capacité de colonisation des champignons ectomycorhiziens est **le taux de fertilité du sol**. En effet, un apport en phosphore ou azote, facilement mobilisable par la plante, peut inhiber la mycorhization (Smith & Read, 2008 ; Koide *et al.*, 2011). Or, la terre polluée provenant du site de Pierrelaye est très riche en matière organique et éléments minéraux puisqu'elle provient d'épandage d'eaux usées. Il est alors probable que cette terre ne soit pas la plus adaptée pour un essai de mycorhization en conditions contrôlées. Cependant, les peupliers du dispositif expérimental PHYTOPOP de Pierrelaye sont assurément colonisés par des champignons mycorhiziens. De plus, dans le cadre de cet essai, aucune ectomycorhize n'a été observée sur le substrat non pollué, moins riche que la terre de Pierrelaye. La fertilité du sol n'est alors probablement pas le seul facteur permettant d'expliquer l'absence d'ectomycorhizes observées lors de cet essai.

iv) Enfin, il semble que **la capacité de mycorhization des champignons mycorhiziens soit très dépendante de l'espèce et même de la souche**. Les capacités de mycorhization des souches peuvent varier



Figure 56 : Différentes étapes du test du potentiel de mycorhization des souches fongiques d'intérêt.

A : inoculum fongique avant implantation des peupliers ou des pins ; B : plant de peuplier inoculé après 3 mois de contact ; C : détail d'une racine de peuplier colonisée par le mycélium ; D : récolte du système racinaire ; E : détail du système racinaire après récolte observée à la loupe binoculaire (X 10), aucune ectomycorhize n'est visible ; F : détail d'une racine observée en microscopie photonique colonisée par des hyphes (h) de la souche *Helotiales* M01 ; G : spores (s) de la souche M01 présentes à l'intérieur des cellules d'une racine de pin observée en microscopie photonique ; H : colonisation d'une racine de pin par du mycélium de la souche M01, des hyphes extramatriciels (he) sont visibles.

en fonction du substrat utilisé, des conditions climatiques ou des autres espèces fongiques présentes dans le substrat avec lesquelles des phénomènes de compétition sont possibles (Smith & Read, 2008). De plus, **une forte variabilité intraspécifique existe dans les capacités des différentes souches à coloniser une plante**. Par exemple, le nombre d'ectomycorhizes formées en 60 jours de contact chez *Pinus pinaster* inoculé avec différentes souches du champignon ectomycorhizien *Lactarius deliciosus* peut varier de moins de 10 ectomycorhizes à plus de 450 recensées par système racinaire (Parlade *et al.*, 2011). De plus, les repiquages successifs des souches sur des milieux de culture riches peuvent leur faire perdre leur capacité de mycorhization car des mutations génétiques peuvent apparaître (Smith & Read, 2008).

- *Il serait alors important de vérifier que les différentes souches d'intérêt sont bien capables de former des mycorhizes dans un système simplifié, par exemple en boîte de Pétri dans un substrat mieux maîtrisé.*
- *De même, il serait important d'optimiser le protocole de contact entre les souches d'intérêts et les boutures de peupliers en conditions contrôlées (en pots) avant de le tester sur de la terre polluée qui apporte plus de contraintes (inoculum endogène, pollution...).*

2.5.2. Test des capacités de mycorhization des souches en boîte de Pétri

Un protocole de test des capacités de mycorhization des souches d'intérêt en boîte de Pétri sur un mélange tourbe/vermiculite a été mis au point au laboratoire pendant l'été 2012 (Berthelot, 2012) sur les souches isolées à partir de racines des sites de Pierrelaye et Metaleurop (P01 à P06, M01 à M05). L'étude de la capacité de mycorhization des souches est une expérience longue à mettre en place. En effet, la préparation de l'inoculum nécessite un à trois mois de culture et trois à six mois de contact entre le champignon et les plantules de pins ou de peupliers. Dans ce test, seuls les inocula des souches Helotiales P01, P02, P06, M01, M03, M04, *Trichopezizella* M02 et *Sebacina vermifera* P04, dont le mode d'infection n'est pas connu, se sont développés suffisamment pour permettre le contact avec la plante. La figure 56 résume les différentes étapes nécessaires à la mise en place du test jusqu'à la récolte et l'observation macroscopique et microscopique des racines.

En premier lieu, une observation macroscopique à la loupe binoculaire des systèmes racinaires de peupliers ou de pins a été réalisée. Cependant, cette observation n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'ectomycorhizes (Figure 56 (E)). Trois hypothèses étaient alors envisageables, i) les souches testées ne sont pas capables de former des ectomycorhizes ; ii) les souches sont capables de former des ectomycorhizes mais le temps de contact entre la plante et le champignon était insuffisant pour former des ectomycorhizes matures, avec un manteau fongique suffisamment développé pour qu'elles soient visibles à la loupe binoculaire ; iii) ces souches forment d'autres types de structures symbiotiques ou endophytes.

Afin de le vérifier et de mettre en évidence les structures fongiques, les racines ont été colorées au bleu de méthyle puis ont été observées par microscopie photonique. Dans certains cas, **des hyphes inter- et intracellulaires ont été observés** (Figure 56 (F)) sur des plantules de pins ou de peupliers inoculées avec les souches Helotiales M01, M03 et P02. La **présence de spores fongiques** (Figure 56 (G)) à l'intérieur des cellules a également été détectée notamment sur des plantules de pins inoculées avec les souches *Trichopezizella* M02 et Helotiales M01 et M03. Enfin, **des structures ressemblant à des ectomycorhizes** (présence d'un manteau et de mycélium extramatriciel) ont été observées sur des racines de pins colonisées par les souches M01 et M02 (Figure 56 (H)). Il est cependant difficile de dire si ce sont bien des ectomycorhizes car le manteau est très sombre et ne permet de distinguer le réseau de Hartig. Il serait nécessaire de réaliser une coupe transversale de la racine afin de le discerner. Cependant, certains champignons DSE comme *Phialocephala fortinii* seraient capables de former des structures de type ectomycorhizienne sur des racines de bouleau (Kaldorf *et al.*, 2004). La présence de structures intracellulaires lors de la confrontation des **souches *Trichopezizella* M02 et Helotiales M01, M03 et P02 avec des peupliers et/ou des pins révèlent que ces champignons pourraient être des champignons endophytes. Leur caractère mycorhizien reste à démontrer.**

Les champignons endophytes pourraient également protéger les plantes des effets néfastes des ETM et participer à la phytostabilisation. Des champignons endophytes appartenant aux genres *Neotyphodium* et *Exophiala* permettraient notamment d'augmenter la tolérance de la plante aux ETM et modifieraient la translocation des ETM vers les parties aériennes (Monnet *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2011 ; Ren *et al.*, 2011).

- *Il serait également intéressant de tester le potentiel de phytostabilisation de ces souches endophytes en conditions contrôlées dans un premier temps, puis sur le terrain.*

Cependant, des améliorations sont certainement encore à apporter dans le protocole de test du potentiel de mycorhization des souches par exemple dans le choix du milieu de culture (MMN optimisé). En effet, comme montré précédemment, la composition du milieu de culture est déterminante pour une croissance optimale du mycélium (Langer *et al.*, 2008). Or, le développement des souches Agaricales P03 et P05 et *Hebeloma* M05 n'était pas suffisant pour permettre l'inoculation des plantules de pins ou de peupliers.

- *Il serait alors nécessaire de tester d'autres milieux de culture et/ou d'autres substrats de contact entre l'inoculum fongique et les plantules de peupliers ou de pins afin d'optimiser les conditions de ce test.*

2.6. Etude du potentiel de phytostabilisation de souches fongiques mycorhiziennes sur le terrain

2.6.1. Mise en place de parcelles expérimentales

Dans le cadre du projet ANR blanc international BIOFILTREE, trois dispositifs expérimentaux ont été mis en place en mars et avril 2011 afin de tester le potentiel de phytostabilisation du peuplier en co-culture avec l'aulne sur sol pollué aux ETM à l'aide de « biofiltres » fongiques sur les sites pollués de Pierrelaye (Figure 26), Fresnes-sur-Escaut (Figure 27) et Tavaux (Figure 28). Les différentes espèces fongiques isolées et caractérisées au cours de ma thèse n'étant pas encore prêtes pour une inoculation au champ, la moitié des arbres a été inoculée avec un mélange commercial Symbivit® de champignons endo- et ectomycorhiziens :

- Inoculum de champignons ectomycorhiziens : *Hebeloma mesophaeum*, *Amanita rubescens*, *Laccaria proxima* et *Paxillus involutus*

- Inoculum de champignons endomycorhiziens : *Glomus intraradices* BEG140, *G. mosseae* BEG95, *G. claroideum* BEG96, *G. microaggregatum* BEG56, *G. etunicatum* BEG92, *G. geosporum* BEG199, *G. irregulare/intraradices* DAOM197198 (souche fournie par Agronutrition).

Plusieurs campagnes de prélèvement de racines ont été réalisées au cours des années 2011 et 2012 sur les différents dispositifs expérimentaux afin de vérifier le statut mycorhizien des peupliers inoculés. Une première campagne de prélèvements a été réalisée **en novembre 2011** sur le dispositif expérimental de **Pierrelaye**. Les racines des clones « **I214** » ont été prélevées sur cinq arbres par placette unitaire, sur les quatre placettes inoculées et les quatre non inoculées. Les racines des clones « Skado » étaient peu nombreuses en surface du sol et n'ont ainsi pas été prélevées. **Peu d'ectomycorhizes ont été observées**, seuls 2 à 6 % des apex racinaires étaient ectomycorhizés sur les placettes non inoculées et 4 à 8 % sur les placettes inoculées. **Le taux d'endomycorhization sur les placettes non inoculées était compris entre 5 et 14 % et entre 7 et 13 % sur les placettes inoculées**. Les endomycorhizes observées étaient fonctionnelles puisque le taux d'arbuscules variait de 3 à 10 %. Le taux de mycorhization semblait légèrement plus important sur les placettes inoculées mais la différence observée n'était pas significative à $p < 0,05$ (Grignat, 2012).

En avril 2012, une campagne de prélèvement des racines des peupliers « **Skado** » a été réalisée sur le dispositif expérimental de **Tavaux** selon les mêmes modalités. Les clones « I214 » n'ont pas été prélevés car les plants ont subi une forte mortalité due à un printemps sec et à une attaque de chenilles. Seuls les peupliers issus de trois placettes non inoculées étaient **faiblement ectomycorhizés** (de 2 à 7 %). **Tous les peupliers étaient colonisés par des champignons endomycorhiziens avec des taux variant entre 37 et 48 %**.



condition	P-Ø	P-I	C-Ø	C-I	P-Ø	P-I	C-Ø	C-I
% d'endomycorhization	30,2 ^c	22,5 ^c	0,0 ^a	12,8 ^{ab}	34,9 ^c	29,5 ^{bc}	0,0 ^a	10,1 ^{ab}
% d'arbuscules	17,8 ^{bc}	12,6 ^{abc}	0,0 ^a	11,8 ^{abc}	20,7 ^c	17,8 ^{bc}	0,0 ^a	7,2 ^{ab}

Figure 57 : Peupliers du test en pots après deux mois de croissance et leur colonisation par les champignons endomycorhiziens. C : substrat contrôle, P : terre polluée, Ø : non inoculé, I : inoculé, les lignes rouges représentent 20 cm. Les différentes lettres représentent les différences significatives à $p < 0,05$ ($n = 6$).

Les endomycorhizes observées étaient fonctionnelles puisque le taux d'arbuscules variait de 25 à 30 %. Aucune différence significative n'a été observée entre les parcelles inoculées ou non inoculées (Lefebvre, 2012). Une autre campagne de prélèvement plus récente sur ce site (**octobre 2012**) a révélé **un taux d'ectomycorhization compris entre 48 et 66 % sur les racines des clones « Skado »**.

Une dernière campagne de prélèvements a été réalisée en **octobre 2012** sur le dispositif expérimental de **Fresnes-sur-Escaut** sur les peupliers « **Skado** ». Les taux d'endomycorhization n'ont pas encore été déterminés. Les **taux d'ectomycorhization sur les placettes non inoculées varient de 67 à 70 % et de 56 à 75 %** sur les placettes inoculées. Aucune différence significative n'a été observée entre les taux de mycorhization des différentes placettes.

2.6.2. Test des souches implantées en conditions contrôlées

En parallèle, des cultures en pots avec les mêmes clones de peuplier et le même inoculum fongique ont été réalisées avec un substrat contrôle (mélange de terreau organique et de sable) et avec de la terre contaminée prélevée à Pierrelaye, afin de s'assurer respectivement que l'inoculum pouvait s'implanter et observer un éventuel effet de cette inoculation sur le transfert des ETM. Les différents substrats n'ont pas été stérilisés afin de se rapprocher des conditions de compétition présentes au champ entre espèces endogènes et exogènes. Chaque clone de peuplier (« I214 » et « Skado ») a été planté dans un substrat contrôle et dans de la terre polluée. Chaque condition a été testée avec ou sans inoculation, soit un total de huit modalités.

Dans un premier temps, la **production de biomasse** des peupliers a été mesurée après dix semaines de croissance. **Aucune différence de croissance n'a été observée pour le clone « I214 »** entre les différentes modalités testées (Figure 57). En revanche, pour le **clone « Skado »**, **sa croissance est plus faible sur le substrat contrôle non inoculé** par rapport aux autres traitements, mais **l'inoculation permet de rétablir une production de biomasse** équivalente à celle obtenue sur terre polluée.

Le taux de mycorhization des racines a été mesuré dans les différentes conditions. Le taux d'ectomycorhization n'a pas été calculé car la **présence d'ectomycorhizes n'a pu être observée sur les racines**. Il est possible que l'arrosage ait été trop abondant et ait empêché le développement des ectomycorhizes. Les résultats obtenus pour le taux d'endomycorhization sont donnés dans la figure 57. **Aucune endomycorhize** n'a été observée sur les racines des peupliers se développant sur le **substrat contrôle**. En revanche, sur le **substrat contrôle inoculé**, environ **10 à 12 % des racines sont mycorhizées**. L'inoculum endomycorhizien a donc pu s'implanter. Pour ce qui est des tests **sur terre polluée**, le **taux d'endomycorhization varie de 25 à 35 %** environ. La proportion de colonisation sur la terre non inoculée est

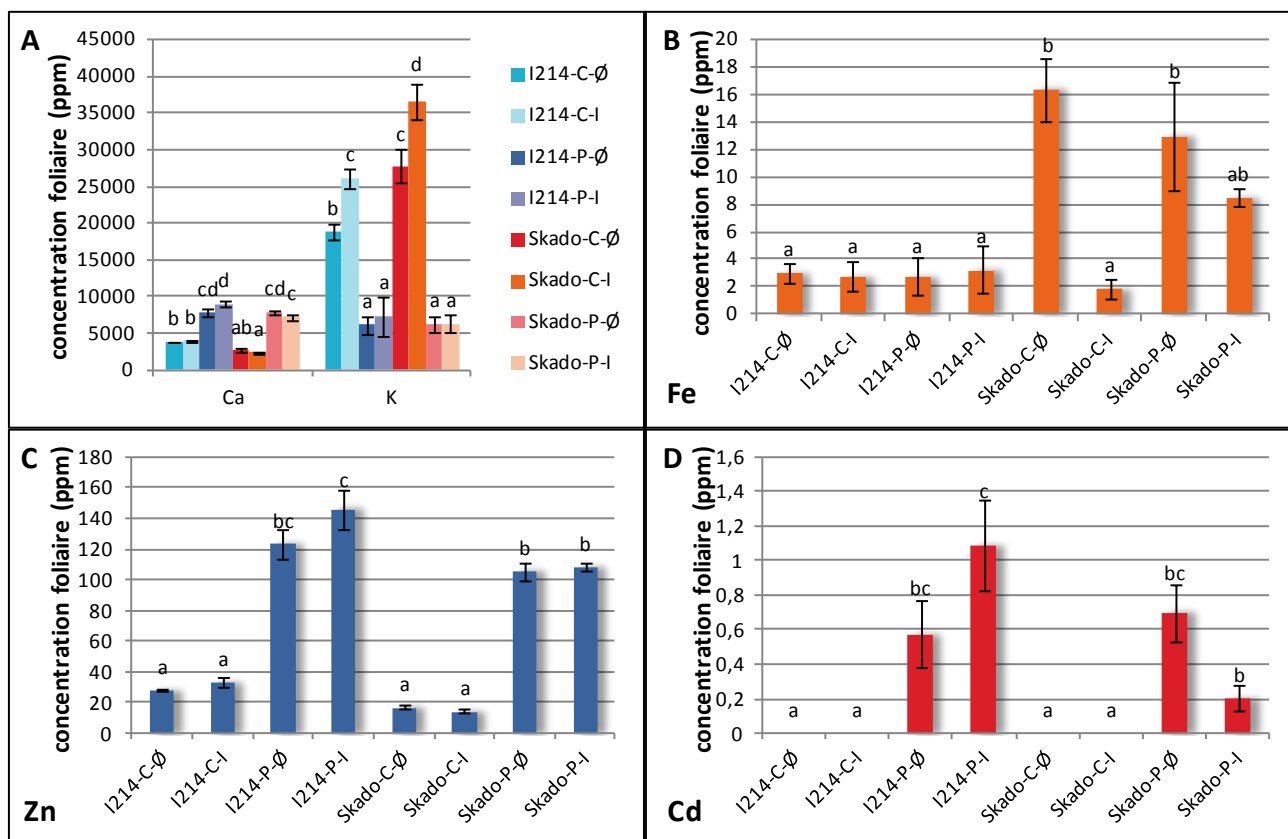


Figure 58 : Teneurs en calcium (A), potassium (A), fer (B), zinc (C) et cadmium (D) exprimées en mg.kgMS^{-1} dans les feuilles de peupliers « I214 » et « Skado » du test en pots. C : substrat contrôle, P : terre polluée, Ø : non inoculé, I : inoculé. Les barres représentent l'erreur standard (n=6). Les différentes lettres représentent les différences significatives à $p < 0,05$.

légèrement plus élevée que sur la terre inoculée mais statistiquement les différences observées ne sont pas significatives à $p < 0,05$.

Enfin, les teneurs en divers éléments minéraux ont été mesurées dans les feuilles par ICP-AES. Les résultats les plus significatifs sont présentés dans la figure 58. Pour les éléments minéraux comme le calcium et le potassium, des différences d'accumulation dans les feuilles sont observées en fonction du substrat employé. En fait, la teneur en calcium est plus élevée dans les peupliers sur terre polluée que dans les peupliers sur substrat contrôle alors que l'inverse est observé pour le potassium. Seuls les éléments toxiques comme le zinc, le cadmium, le fer, le manganèse et le nickel ont été détectés dans les feuilles. Les teneurs en manganèse et en nickel dans les feuilles étaient équivalentes quel que soit le substrat ou le clone de peuplier testé (résultats non présentés). Le clone « I214 » **accumule peu le fer** ($\approx 2,5 \mu\text{g.gMS}^{-1}$) et aucune différence n'est observée entre les deux substrats. En revanche, le clone « Skado » **accumule six à huit fois plus de fer que le clone « I214 »**. Mais **en présence de l'inoculum fongique exogène, la teneur en fer est réduite dans les feuilles de huit fois sur substrat contrôle et d'un tiers sur terre polluée**. La teneur en zinc dans les feuilles du clone « Skado » est environ 20 % plus faible que dans le clone « I214 » sur terre polluée. En revanche, chez le clone « I214 », **la teneur en zinc semble légèrement plus importante en présence de l'inoculum fongique**. Pour le cadmium, aucune trace de cet élément n'a été relevée sur substrat contrôle. Sur terre polluée, **la teneur en cadmium est doublée en présence de l'inoculum chez le clone « I214 » et divisée par trois environ pour le clone « Skado »**. Cependant, dues à une forte hétérogénéité des teneurs en zinc et cadmium dans les différents plants, les **différences d'accumulation** observées entre les plants inoculés et non-inoculés sont **peu significatives** à $p < 0,05$.

2.6.3. Discussion

Lors d'essais de phytostabilisation assistée par des champignons mycorhiziens sur le terrain, plusieurs questions se posent afin de valider le système mis en place.

Premièrement, **le succès de la méthode dépend de la capacité des champignons à s'associer aux racines**. Il est donc important de s'assurer que la méthode d'inoculation utilisée permet l'implantation des souches fongiques sur les racines. La mesure du taux de mycorhization des racines permet de renseigner le statut mycorhizien des peupliers. Les différentes campagnes de prélèvements réalisées sur les dispositifs expérimentaux du projet BIOFILTREE ont permis de mettre en évidence la présence de champignons endo-et ectomycorhiziens sur les racines. Cependant, les placettes non inoculées présentaient des taux de

colonisation équivalents à ceux des placettes inoculées. Plusieurs options sont alors envisageables : i) la méthode d'ensemencement des peupliers avec l'inoculum est inappropriée ; ii) l'inoculum fongique n'a pas pu s'associer aux racines en raison de conditions climatiques défavorables et/ou d'une trop forte compétitivité de l'inoculum endogène ; iii) tout ou une partie de l'inoculum exogène a remplacé l'inoculum naturellement présent.

i) Un test en conditions contrôlées en pots réalisé avec les mêmes conditions d'inoculation que celles utilisées sur le terrain a permis de mettre en évidence l'efficacité de la méthode surtout pour les champignons endomycorhiziens. Le fait que le clone « Skado » ait une meilleure croissance après inoculation sur le substrat contrôle suggère que les champignons se sont implantés sur les racines. En effet, il est connu que l'inoculation de plantes par des champignons endo- ou ectomycorhiziens permet d'améliorer la croissance (Smith & Read, 2008). De plus, la quantification des endomycorhizes nous a permis de confirmer la présence de champignons endomycorhiziens sur les racines des peupliers implantés sur le substrat contrôle. **La méthode d'inoculation utilisée permettrait donc l'implantation au moins des souches endomycorhiziennes.**

ii) L'inoculation des peupliers avec les souches ectomycorhizienne semble toutefois moins aisée. Sur le terrain, des conditions défavorables au printemps 2011 ont pu freiner l'implantation de l'inoculum ectomycorhizien. En effet, les mois de mars et avril (au moment de la plantation) ont été très secs, entraînant un retard de développement des racines. **Il est alors possible que l'inoculum ectomycorhizien, apporté sous forme de mycélium, ait persisté plus difficilement dans le sol que l'inoculum endomycorhizien, principalement apporté sous forme de spores.**

- *La méthode d'inoculation des peupliers par les champignons ectomycorhiziens sur le terrain pourrait alors être modifiée. Une première solution serait d'apporter l'inoculum ectomycorhizien plus tardivement lorsque le système racinaire des peupliers est bien développé. Une autre solution envisageable serait d'utiliser des plants-« piège », pré-inoculés au laboratoire et plantés sur le terrain dans les placettes à inoculer. Le mycélium extramatriciel pourrait alors se développer et coloniser les plants voisins.*

Dans le cadre de l'étude réalisée en conditions contrôlées, la colonisation par les champignons endomycorhiziens était légèrement plus faible en présence de l'inoculum sur terre polluée. Il est alors probable qu'il existe un **phénomène de compétition entre l'inoculum endogène et exogène**. En effet, les champignons saprophytes naturellement présents dans le sol peuvent entrer en compétition avec un inoculum mycorhizien. Par exemple, la formation d'ectomycorhizes par *Pisolithus tinctorius* est inhibée chez des châtaigniers en présence d'un champignon saprophyte, *Hypholoma fasciculare* (Pereira et al., 2012).

Cependant, dans le cadre de notre étude, les différences de colonisation observées entre les plants inoculés et non inoculés n'étaient pas significatives à $p < 0,05$. De même, sur les dispositifs expérimentaux de Tavaux, Pierrelaye et Fresnes-sur-Escaut, aucune différence significative entre les taux d'endo- ou d'ectomycorhization des peupliers n'a été observée entre les placettes inoculées ou non-inoculées.

- *Afin de s'assurer que l'inoculum endogène du sol a été remplacé par notre inoculum, les espèces fongiques présentes sur les racines devraient être identifiées.*
- *L'utilisation de souches fongiques natives des sites d'étude permettrait de s'affranchir des problèmes de compétition entre espèces car ces souches seraient déjà adaptées aux conditions particulières du milieu.*

iii) A l'heure actuelle, il est difficile de s'assurer que l'inoculum exogène ait remplacé en tout ou partie l'inoculum naturellement présent dans le sol. Cependant, lors du test en pots, de légères différences d'accumulation ont été observées sur terre polluée entre les peupliers inoculés et non inoculés, ce qui suggère un remplacement complet ou partiel des espèces fongiques en interaction avec les racines.

Deuxièmement, **un inoculum fongique performant en terme de phytostabilisation devrait avoir un impact sur l'accumulation des ETM dans les parties aériennes et notamment permettre de la réduire.** Pour les essais réalisés sur le terrain, il est encore trop tôt pour réaliser des prélèvements afin de le vérifier. Cependant, le test en pots a déjà permis de répondre partiellement à cette question. Dans un objectif de phytostabilisation, l'effet recherché de l'apport de l'inoculum est une diminution de l'accumulation des ETM dans les parties aériennes. **Cet effet a été observé pour le fer et plus légèrement pour le cadmium chez le clone « Skado ».** En revanche, une tendance à une accumulation de zinc et de cadmium plus importante des plants inoculés a été observée chez le clone « I214 ». De plus, **les deux clones de peuplier testés ne se comportent pas de la même façon en terme d'accumulation d'ETM**, par exemple pour le fer.

Plusieurs études ont déjà montré une variabilité d'accumulation des ETM dans les parties aériennes entre clones de peupliers et types de sol (Migeon *et al.*, 2009 ; Migeon *et al.*, 2012), et aussi en fonction des espèces fongiques en interaction avec les racines (Gaur & Adholeya, 2004). Peu de données sont disponibles sur l'impact d'un inoculum endomycorhizien sur l'accumulation des ETM dans les parties aériennes du peuplier. La capacité d'accumulation du cuivre et du zinc dans les parties aériennes et les racines de clones de peupliers « Villafranca » (*P. alba*) et « Jean Pourtet » (*P. nigra*) a été testée en présence de deux souches endomycorhiziennes, *G. mosseae* BEG 12 et *G. intraradices* BB-E. L'inoculation par les champignons endomycorhiziens améliore la croissance et la tolérance de la plante sur sol pollué dans tous les cas. Aucun effet de l'inoculation sur l'accumulation en cuivre n'a été observé, en revanche, le contenu en zinc des

parties aériennes était réduit chez les plants inoculés par rapport aux plants non inoculés (Todeschini *et al.*, 2007 ; Lingua *et al.*, 2008 ; Cicatelli *et al.*, 2010). Cependant, l'effet de l'inoculum sur l'accumulation des ETM dans les parties aériennes semble être souche fongique-dépendant, clone-dépendant et environnement-dépendant (Lingua *et al.*, 2008).

- *Il sera donc important de vérifier sur le terrain l'impact de l'inoculum fongique sur le transfert des ETM dans les parties aériennes sur les différents dispositifs expérimentaux implantés.*

Cette spécificité de l'effet d'une souche fongique sur l'accumulation des ETM dans les parties aériennes pourrait être un frein au développement de cette technique à plus grande échelle. Il serait en effet difficile de produire des inocula spécifiques de chaque condition particulière du sol ou du clone de peuplier utilisé.

- *Une solution envisageable serait alors d'utiliser des consortiums de souches fongiques ayant le même effet, par exemple, ciblé sur la réduction de l'accumulation d'un ETM particulier dans les parties aériennes.*

Enfin, **la persistance de l'inoculum exogène dans son nouvel environnement est également importante**. En effet, la phytostabilisation est une solution de réhabilitation de site contaminé à long terme, les souches fongiques apportées devraient donc persister dans le temps en plus d'améliorer la croissance et la tolérance des plantes.

- *Il serait alors intéressant de développer des outils moléculaires performants permettant de retrouver rapidement et facilement les souches fongiques inoculées.*

Chez le peuplier, il a été montré que **l'âge de l'arbre détermine la structure des communautés fongiques qui lui sont associées**. En général, le peuplier est colonisé majoritairement par des champignons endomycorhiziens les premières années puis la tendance s'inverse et les champignons ectomycorhiziens deviennent majoritaires (Khasa *et al.*, 2002). Dans notre étude, cette succession des communautés fongiques au cours du temps semble s'être confirmée. En effet, les racines prélevées pendant la première année de croissance étaient majoritairement endomycorhizées mais ceci tend à s'inverser puisque les derniers prélèvements effectués montrent une forte colonisation des racines par les champignons ectomycorhiziens.

- *Afin de le vérifier, il serait intéressant de comparer les taux de colonisation par les champignons mycorhiziens du même clone de peuplier, sur le même site, mais ayant des âges différents. Des prélèvements de racines du clone « Skado » ont été effectués en novembre 2012 sur les dispositifs expérimentaux PHYTOPOP et BIOFILTREE de Pierrelaye afin de réaliser cette comparaison.*

Cependant, dans notre étude, très peu d'ectomycorhizes ont été retrouvées sur les racines des peupliers la première année. Ceci suggère que l'inoculum ectomycorhizien exogène n'a peut-être pas survécu, peut-être en raison des conditions climatiques défavorables des premiers mois. Cependant, il est important de noter que la majorité des champignons ectomycorhiziens vit dans le sol sous forme de

mycélium et que la présence d'ectomycorhizes et de carpophores est très dépendant de la saison (Smith & Read, 2008).

- *Il serait donc intéressant de vérifier la présence des souches de l'inoculum ectomycorhizien sur les racines.*
- *De même, cette succession d'espèces fongiques au cours du temps devrait être prise en compte dans le cadre d'essais sur le terrain. L'inoculum pourrait alors être constitué principalement de champignons endomycorhiziens au moment de la plantation afin de favoriser le développement des jeunes plants. Puis, lorsque les peupliers seraient bien développés, un inoculum constitué principalement de champignons ectomycorhiziens pourrait être apporté afin de jouer le rôle de « biofiltres ».*

En conclusion, les facteurs qui semblent les plus limitants pour le succès d'un essai de phytostabilisation assistée par des champignons mycorhiziens sur le terrain sont les capacités de l'inoculum fongique à s'implanter sur les racines et à persister dans l'environnement. Or, un aspect du projet BIOFILTREE vise à isoler des souches mycorhiziennes directement de sites pollués par des ETM. Cette stratégie permettrait alors d'obtenir des souches plus adaptées, plus compétitives et plus tolérantes aux polluants présents dans le sol car natives des sites d'études. Cet atout leur permettrait d'améliorer leur capacité de colonisation des racines et leur persistance dans l'environnement.

Tableau XL : Nombre de publications recensées en mai 2013 sur les bases de données Web of Knowledge³⁵ ou Pubmed³⁶ lors de recherches par mots clés « phytoremediation + (élément) » ou « tolerance + fungi + (élément) »

Élément (%)*	Web of Knowledge		Pubmed	
	Phytoremediation « élément »	+ Tolerance + fungi + « élément »	Phytoremediation « élément »	+ Tolerance + fungi + « élément »
As (12,79)	394	432	57	79
Cd (6,30)	1252	927	194	390
Cr (14,31)	381	620	53	103
Cu (14,18)	812	780	168	180
Ni (10,02)	448	436	73	109
Pb (17,67)	1006	736	117	98
Zn (9,79)	1130	829	223	188

* Le pourcentage de sites BASOL pollués par un élément donné en 2012 est précisé entre parenthèses.
Les deux nombres de publications recensées les plus importants sont en gras.

³⁵ apps.webofknowledge.com

³⁶ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

3. Homéostasie métallique chez le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor*

Dans une optique de phytostabilisation assistée par des champignons, il est important que ceux-ci soient capables d'immobiliser les ETM dans le sol ou dans leurs hyphes. Parmi les mécanismes de tolérance et résistance aux ETM connus chez les champignons, les plus intéressants pour cet objectif sont alors l'excrétion de composés chélatants dans le milieu, l'adsorption aspécifique des ETM aux parois fongiques ou l'absorption et la séquestration des ETM dans les hyphes (Bellion *et al.*, 2006). Les mécanismes d'absorption et de stockage des ETM chez les champignons mycorhiziens sont cependant encore mal connus. *Laccaria bicolor*, le premier champignon ectomycorhizien dont le génome a été séquencé (Martin *et al.*, 2008) sera utilisé comme modèle dans cette étude afin de mieux appréhender ces mécanismes. Deux familles de gènes sont principalement responsables de l'homéostasie et/ou de la tolérance aux ETM chez les champignons. Les membres de la famille ZIP (*Zrt Irt-like Proteins*) sont responsables de l'influx des ETM vers le cytoplasme. Les membres de la famille CDF (*Cation Diffusion Facilitator*) sont responsables de l'efflux des ETM en dehors du cytoplasme. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'homéostasie au zinc car cet élément est essentiel, fait partie des principaux polluants des sols en France et est majoritairement étudié dans la littérature scientifique avec le cadmium (Tableau XL).

Cette partie portera donc sur la caractérisation fonctionnelle des gènes Zips et Cdfs de *Laccaria bicolor*. Ce travail de caractérisation a été amorcé par Hélène Molins lors de son stage de master (Molins, 2007) et par Didier Doillon lors de sa thèse (Doillon, 2010). Dans un premier temps, une analyse phylogénétique de ces gènes a été réalisée, puis leur niveau d'expression en fonction de la concentration en ETM extracellulaire a été mesuré par RT-PCR semi-quantitative. Ensuite, le potentiel de ces protéines à compléter des souches mutantes de levures a été étudié en vue de leur caractérisation fonctionnelle. Cette dernière a été complétée par la localisation de ces transporteurs par fusion GFP dans un organisme hétérologue, la levure. Cependant, en amont de la caractérisation des gènes LbZips et LbCdfs, la capacité du champignon à absorber et accumuler le zinc a été vérifiée. De même, une étape préliminaire de détermination des concentrations inhibitrices à 50 % de divers ETM a été menée.

3.1. Détermination de la concentration inhibitrice à 50 % (IC50) de divers ETM chez *Laccaria bicolor*

Afin de déterminer la concentration inhibitrice à 50 % de divers ETM, représentant une concentration toxique pour la cellule, la souche S238N-H82 de *L. bicolor* a été cultivée en présence de cadmium, cuivre, cobalt, fer, manganèse, nickel et zinc, à des concentrations adaptées pour chaque élément

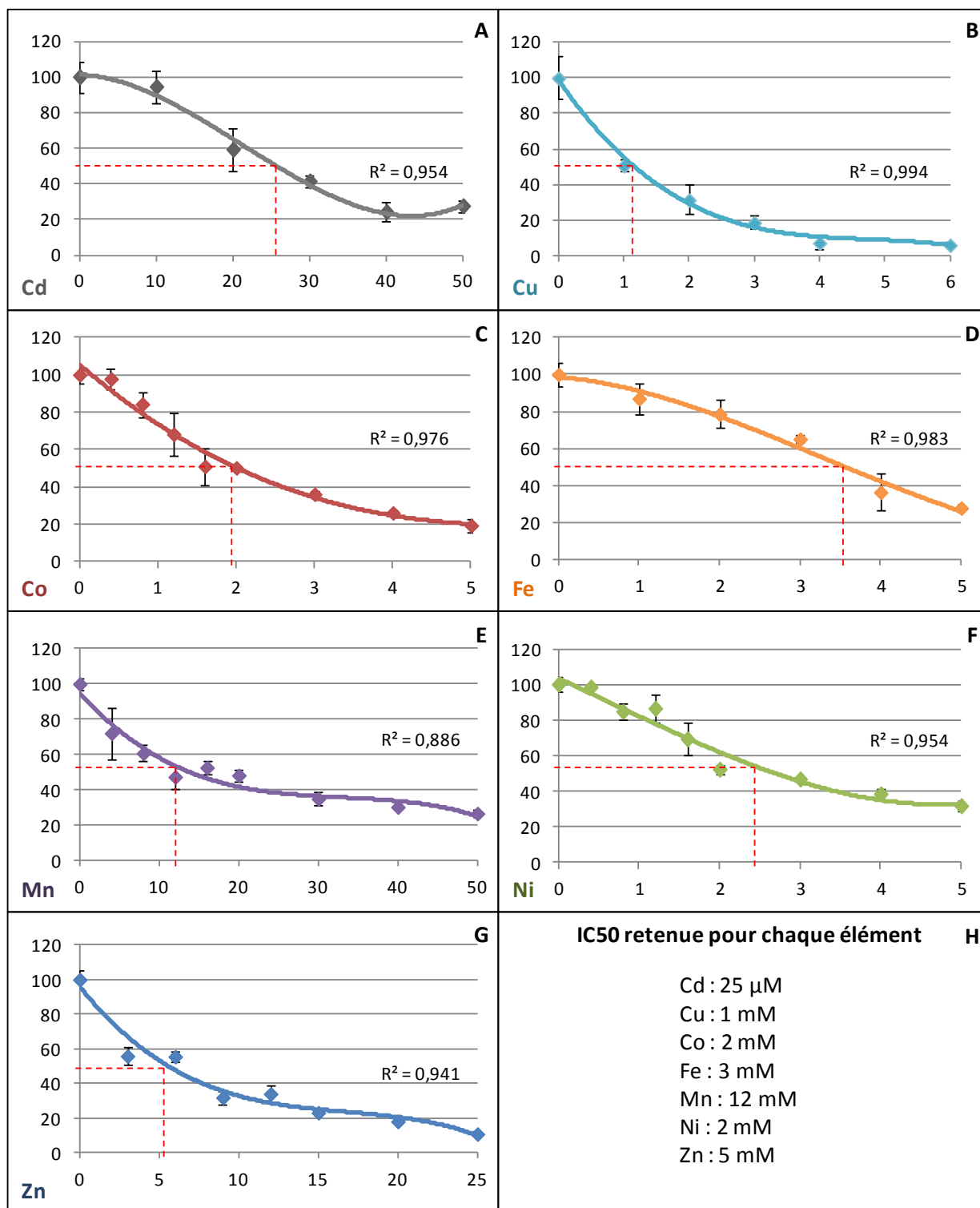


Figure 59 : Indice de tolérance de la souche S238N-H82 de *L. bicolor* en présence de cadmium (A), cuivre (B), cobalt (C), fer (D), manganèse (E), nickel (F) et zinc (G) et détermination de la concentration inhibitrice à 50 % (IC₅₀) pour chaque élément testé (H). L'indice de tolérance correspond au rapport entre la production de masse sèche dans le milieu Pachlewski supplémenté en ETM et la production de masse sèche du contrôle. Les droites rouges en pointillés indiquent l'IC₅₀ sur chaque graphique. La souche S238N-H82 a été cultivée 8 jours dans un milieu pachlewski liquide supplémenté de divers ETM (concentrations exprimées en mM à l'exception de celle du cadmium exprimée en μ M). Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 répliques. Les barres représentent l'écart-type. Une courbe de régression non linéaire de type sigmoïde a été déterminée pour chaque condition dont le coefficient de détermination R^2 est précisé sur chaque graphique.

testé. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Denis Petitpierre, stagiaire de Licence 3^{ème} année que j'ai encadré au laboratoire. La figure 59 présente les différentes courbes de tolérance obtenues et les IC50 déduites de ces graphiques. Pour chaque élément, **l'IC50 a été estimée et fixée à 25 µM pour le cadmium, 1 mM pour le cuivre, 2 mM pour le cobalt et le nickel, 3 mM pour le fer, 5 mM pour le zinc et 12 mM pour le manganèse.** De plus, pour tous les éléments testés à l'exception du cadmium et du cuivre, une concentration inférieure à 500 µM du métal n'affecte pas ou peu la croissance du champignon (< 10 % d'inhibition de croissance) et est donc considérée comme sublétale. Dans le cas du cadmium et du cuivre, les concentrations considérées comme sublétales sont respectivement de 10 et 150 µM.

Ce travail préliminaire a ainsi permis de déterminer les concentrations sublétales et toxiques pour chaque élément à utiliser pour l'étude de l'expression des gènes LbZips et LbCdFs notamment.

3.2. Capacité d'accumulation du zinc par *Laccaria bicolor*

Afin d'évaluer les capacités d'accumulation du zinc par *L. bicolor*, du mycélium a été cultivé une semaine en milieu Pachlewski liquide contenant différentes concentrations de zinc ; reflétant des conditions de carence (0 Zn), « normale » (3,2 µM Zn = concentration habituelle du Zn dans le milieu Pachlewski), ou d'excès sublétale (500 µM Zn) ou toxique (4 mM Zn). Le mycélium a ensuite été récolté, lavé à l'EDTA afin d'éliminer le zinc adsorbé aux parois et séché. Le contenu en zinc intracellulaire a alors été dosé par ICP-AES. Les résultats sont présentés dans la figure 60.

Même en situation de carence, le mycélium contient de faibles quantités de zinc. **Plus la concentration en zinc est élevée dans le milieu, plus le contenu intracellulaire en cet élément augmente.** Le mycélium de *L. bicolor* est capable d'accumuler jusqu'à environ 0,35 mg.g MS⁻¹ de zinc.

Peu de données sont disponibles sur l'accumulation du zinc par des champignons mycorhiziens isolés en culture pure. Des études réalisées sur des champignons formant des mycorhizes de type éricoïde, *H. ericae* et *O. maius*, ont montré une accumulation de zinc de l'ordre de 2 à 7 mg.g MS⁻¹ (Fomina *et al.*, 2005 ; Gibson & Mitchell, 2005). Le champignon ectomycorhizien *S. luteus* semble accumuler jusqu'à 15 mg.g MS⁻¹ de zinc (Colpaert *et al.*, 2005), soit 40 fois plus que ce qui a été observé chez *L. bicolor*. Cependant, dans ces différentes études, seul le contenu en zinc total a été estimé, c'est-à-dire le zinc adsorbé aux parois fongiques et le zinc intracellulaire. Or chez *S. luteus*, une expérience de localisation du zinc dans les mycorhizes a permis de mettre en évidence que cet élément est présent principalement au niveau de la paroi du manteau (Turnau *et al.*, 2001 ; Turnau *et al.*, 2002).

Dans le cadre de cette étude, nous avons pu démontrer que ***L. bicolor* accumule le zinc dans ses hyphes.**

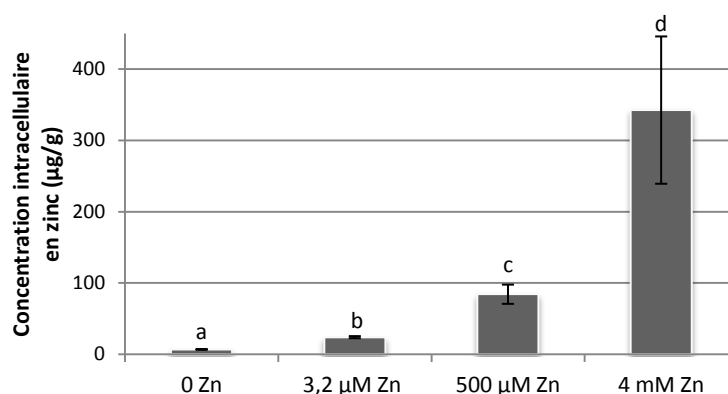


Figure 60 : Concentrations intracellulaires en zinc exprimées en $\mu\text{g.gMS}^{-1}$ dans le mycélium de *Laccaria bicolor*. Le mycélium a été cultivé une semaine en milieu Pachlewski liquide contenant différentes concentrations de zinc : 0 ; 3,2 μM ; 500 μM et 4 mM. Une concentration légèrement inférieure à l'IC50 (5 mM) a été choisie afin de récolter suffisamment de biomasse pour le dosage du zinc. Le mycélium a ensuite été récolté, lavé à l'EDTA afin d'éliminer le zinc adsorbé aux parois et séché 2 jours à 65 °C. Les barres représentent l'erreur standard (n=3). Les différentes lettres représentent les différences significatives à $p < 0,05$.

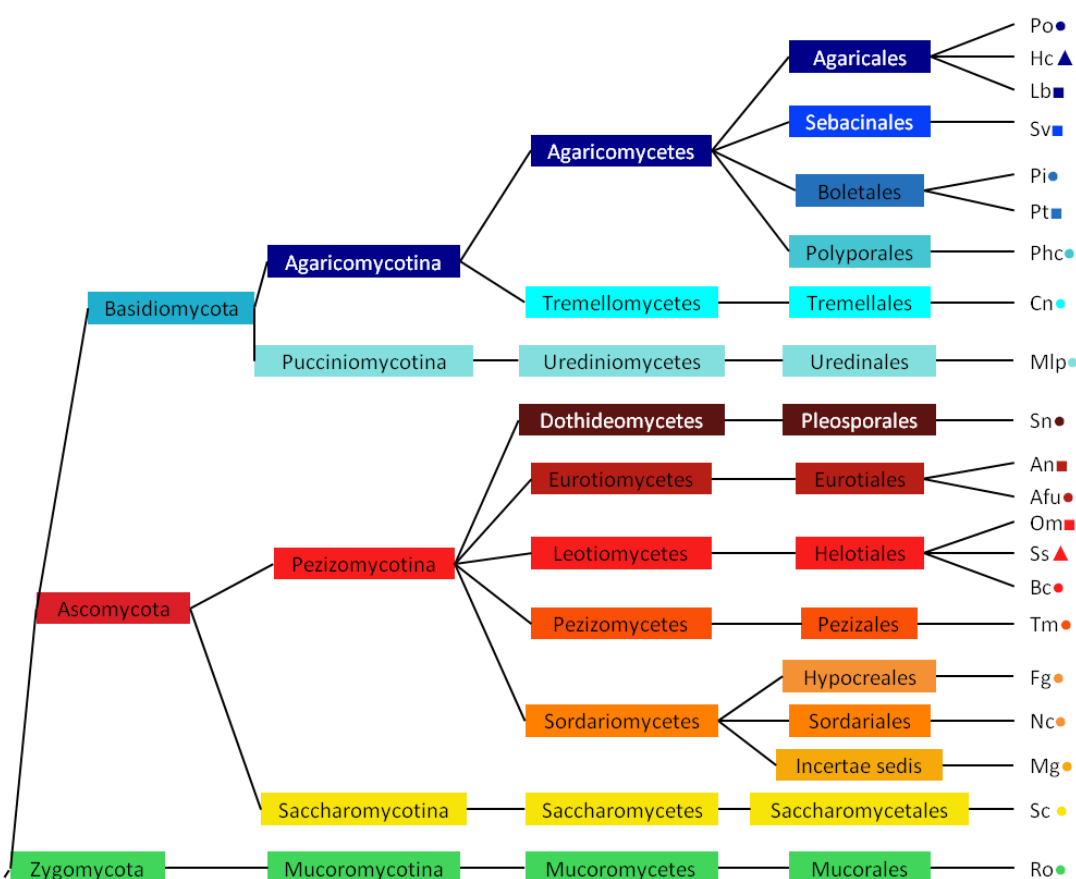


Figure 61 : Classification phylogénétique des organismes fongiques étudiés. Les Basidiomycètes sont indiqués en bleu, les Ascomycètes en rouge, orange et jaune et le Zygomycète en vert. Chaque nuance de couleur correspond à un ordre différent, les organismes fongiques appartenant au même ordre sont représentés avec un symbole différent. Basidiomycètes : *Cryptococcus neoformans* (Cn), *Hebeloma cylindrosporum* (Hc), *Laccaria bicolor* (Lb), *Melampsora larici-populina* (Mlp), *Phanerochaete chrysosporium* (Phc), *Paxillus involutus* (Pi), *Pleurotus ostreatus* (Po), *Pisolithus tinctorius* (Pt), *Sebacina vermifera* (Sv) ; Ascomycètes : *Aspergillus fumigatus* (Afu), *Aspergillus nidulans* (An), *Botrytis cinerea* (Bc), *Fusarium graminearum* (Fg), *Magnaporthe grisea* (Mg), *Neurospora crassa* (Nc), *Oidiodendron maius* (Om), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Stagonospora nodorum* (Sn), *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss), *Tuber melanosporum* (Tm) ; Zygomycètes : *Rhizopus oryzae* (Ro).

- Il serait alors intéressant de connaître les mécanismes permettant d'absorber et de stocker le zinc dans les cellules.

Pour cela, deux familles de protéines, ZIP (*Zrt-Irt like Proteins*) et CDF (*Cation Diffusion Facilitator*) respectivement impliquées dans l'absorption et la séquestration des ETM chez la levure ont été étudiées chez le champignon ectomycorhizien modèle, *L. bicolor*.

3.3. Les protéines LbZIPs

3.3.1. Etude phylogénétique et analyse des séquences des transporteurs

L'étude phylogénétique est basée sur les séquences protéiques appartenant à la famille ZIP de 22 organismes fongiques : 11 Ascomycètes dont 1 Saccharomycotina (*Saccharomyces cerevisiae*), et 10 Pezizomycotina (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Magnaporthe grisea*, *Neurospora crassa*, *Oidiodendron maius*, *Stagonospora nodorum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Tuber melanosporum*) ; 9 Basidiomycètes dont 8 Agaromycotina (*Cryptococcus neoformans*, *Hebeloma cylindrosporum*, *Laccaria bicolor*, *Melampsora larici-populina*, *Paxillus involutus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Pisolithus tinctorius*, *Sebacina vermifera*) et 1 Ustilaginomycotina (*Ustilago maydis*) ; et 1 Zygomycète (*Rhizopus oryzae*). Ces organismes ont été choisis car leurs génomes ont été séquencés et ils représentent différentes divisions fongiques et différents modes de vie (saprophytes, parasitiques ou symbiotiques). Pour plus de clarté, un code couleur a été attribué pour chaque embranchement phylogénétique (Figure 61).

Les séquences ont été obtenues par BLAST en utilisant les séquences des protéines ZIP déjà identifiées comme matrices sur les bases de données de référence de chacune de ces espèces. Les séquences incomplètes ont été corrigées manuellement par homologie avec les séquences déjà caractérisées, notamment celles de *S. cerevisiae*. Les informations génomiques des protéines LbZIPs sont données dans le tableau XLI.

L'**arbre phylogénétique** des transporteurs ZIP (Figure 62) montre l'**existence de quatre sous-familles**, numérotées I, II, III et IV. Les seuls membres de la famille ZIP déjà connus et caractérisés chez les champignons sont ceux de *S. cerevisiae* et des champignons filamenteux *Aspergillus fumigatus* et *Neurospora crassa*. Il est alors possible d'émettre des hypothèses sur les propriétés des transporteurs putatifs des autres champignons en utilisant la connaissance acquise sur ces protéines de référence. Le regroupement des séquences semble s'effectuer en fonction de la localisation membranaire du transporteur.

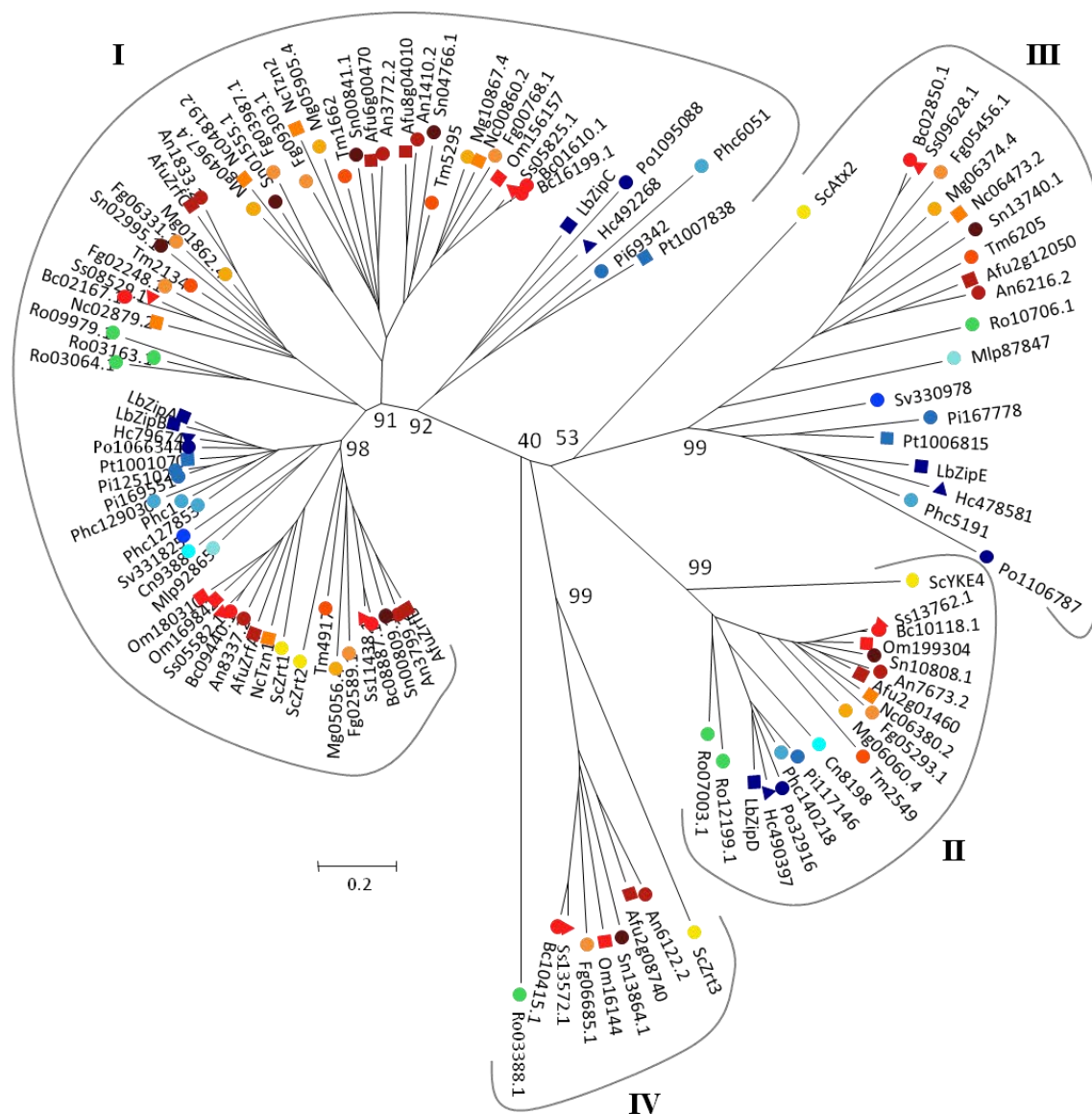


Figure 62 : Arbre phylogénique des protéines de la famille ZIP de 21 organismes fongiques. Basidiomycètes : *Cryptococcus neoformans* (Cn), *Hebeloma cylindrosporum* (Hc), *Laccaria bicolor* (Lb), *Melampsora larici-populina* (Mlp), *Phanerochaete chrysosporium* (Phc), *Paxillus involutus* (Pi), *Pleurotus ostreatus* (Po), *Pisolithus tinctorius* (Pt), *Sebacina vermifera* (Sv); Ascomycètes : *Aspergillus fumigatus* (Afu), *Aspergillus nidulans* (An), *Botrytis cinerea* (Bc), *Fusarium graminearum* (Fg), *Magnaporthe grisea* (Mg), *Neurospora crassa* (Nc), *Oidiodendron maius* (Om), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Stagonospora nodorum* (Sn), *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss), *Tuber melanosporum* (Tm); Zygomycètes : *Rhizopus oryzae* (Ro). L'arbre a été généré en utilisant le logiciel MEGA 4.1 d'après la méthode Neighbor-Joining (NJ) après l'alignement des séquences avec CLUSTALW, les valeurs de *bootstraps* (≥ 40) ont été calculées à partir de 1000 répétitions et sont notées uniquement aux principaux embranchements.

Tableau XLI : Informations génomiques des protéines LbZIPs³⁷

Nom	Nom du gène sur le site du JGI ^{xvii}	n° de la protéine	Localisation génomique	Brin
LbZIPA	Lacbi1.estExt_Genewise1_worm.C_310019	180140	LG_1:1278776-1280233	-
LbZIPB	Lacbi1.eu2.Lbscf0002g05030	305445	LG_10:2157421-2158809	+
LbZIPC	Lacbi1.eu2.Lbscf00042g00680	309863	scaffold_14:833331-835459	+
LbZIPD	Lacbi1.estExt_GeneWisePlus_worm.C_80360	189929	LG_3:7007170-7009579	+
LbZIPE	Lacbi1.eu2.Lbscf0003g07730	309134	LG_4:365737-366925	+

³⁷ <http://genome.jgi-psf.org/Lacbi2/Lacbi2.home.html>

3.3.1.1. Sous-famille I : localisation putative à la membrane plasmique

Dans la sous-famille I des protéines ZIP, plusieurs clusters sont visibles, en général spécifiques des Zygomycètes, Ascomycètes ou Basidiomycètes. Cependant, le cluster contenant les séquences protéiques de LbZIPA et LbZIPB est très proche du cluster contenant les séquences protéiques de ScZRT1 (Zhao & Eide, 1996a) et ScZRT2 (Zhao & Eide, 1996b), les transporteurs de zinc de forte et faible affinité de la levure. Ce cluster regroupe également les séquences des transporteurs plasmalemmiques AfuZRFA et AfuZRFB (Vicente-franqueira *et al.*, 2005), de forte et faible affinités pour le zinc chez *A. fumigatus*, ainsi que le transporteur de forte affinité NcTZN1 (Kiranmayi *et al.*, 2009) de *N. crassa*. La séquence protéique de LbZIPC groupe également dans la sous-famille I dans un cluster constitué uniquement de protéines appartenant aux Basidiomycètes. La présence de ces trois membres de la famille ZIP chez *L. bicolor* dans cette sous-famille laisse supposer une localisation membranaire ainsi qu'une fonction liée à l'absorption du zinc pour ces transporteurs.

3.3.1.2. Sous-famille II : localisation putative à la membrane du réticulum endoplasmique

Dans la sous famille II des protéines ZIP, des clusters constitués uniquement de séquences protéiques appartenant uniquement aux Zygomycètes, Ascomycètes ou Basidiomycètes sont visibles. Le seul transporteur caractérisé de cette sous-famille est ScYKE4, un transporteur permettant l'efflux de zinc du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme chez la levure (Kumànovics *et al.*, 2006). La protéine LbZIPD appartenant à cette sous-famille, il est possible qu'elle soit également localisée à la membrane du réticulum endoplasmique.

3.3.1.3. Sous-famille III : localisation putative à la membrane de l'appareil de Golgi

Dans la sous-famille III, les séquences protéiques étudiées regroupent également en fonction de leur appartenance à la division des Zygomycètes, Ascomycètes ou Basidiomycètes. Il est probable que les protéines de cette sous-famille, comme LbZIPE, aient une fonction similaire à celle de ScATX2, un transporteur de la levure permettant de remobiliser le manganèse de l'appareil de Golgi vers le cytoplasme (Lin & Culotta, 1996). Lors de cette thèse, nous nous sommes principalement intéressés à l'homéostasie au zinc chez *L. bicolor*, LbZIPE étant un transporteur putatif de manganèse, nous n'avons pas caractérisé ce transporteur.

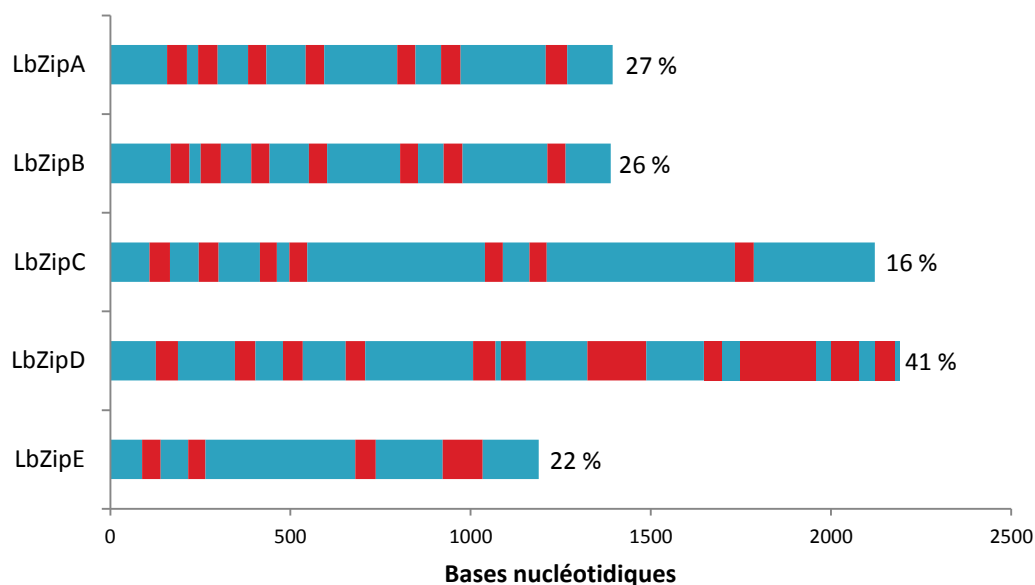


Figure 63 : Organisation des introns et exons dans les gènes LbZips étudiés (d'après Molins, 2007 ; Doillon, 2010). Les introns et exons de chaque gène sont représentés respectivement en rouge et en bleu. Le pourcentage d'intron de chaque gène est inscrit en vis-à-vis du nom du gène.

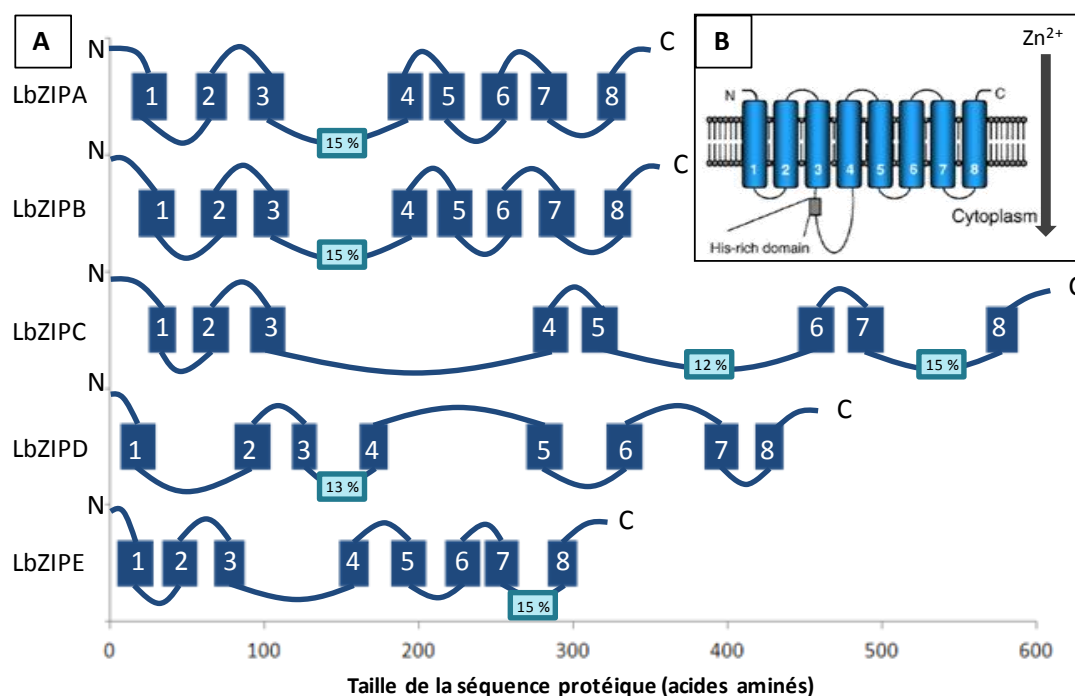


Figure 64 : A : Prédiction de la topologie des protéines ZIPs de *Laccaria bicolor*. Les domaines transmembranaires (DTM) sont représentés par les rectangles bleus ; les parties intracellulaires et extracellulaires sont représentées par des boucles, celles situées à l'extérieur de la cellule ou dans les compartiments intracellulaires sont dessinées au dessus des DTM et celles présentes dans le cytosol sont présentées en dessous des DTM. Les segments représentés par des rectangles bleu clair présentent une richesse relative en histidine, si le pourcentage d'histidine (valeur donnée dans le rectangle) du segment considéré dépasse celui de la séquence totale d'au moins 10 % alors il y a un enrichissement notable.

B : Topologie des protéines appartenant à la famille ZIP (Eide, 2006)

3.3.1.4. Sous-famille IV : localisation putative à la membrane vacuolaire

La petite sous-famille IV regroupe uniquement des séquences protéiques Ascomycètes ou Zygomycètes dont celle de la protéine ScZRT3, responsable de la remobilisation du zinc de la vacuole vers le cytoplasme en cas de carence en cet élément (MacDiarmid *et al.*, 2000). L'absence de séquences protéiques de Basidiomycètes parmi cette sous-famille, signifierait qu'il n'y aurait pas de protéine ZIP impliquée dans la remobilisation du zinc vacuolaire dans cet embranchement. Bien que surprenant, aucune protéine ZIP appartenant à cette sous-famille n'a été identifiée chez les Ascomycètes *Magnaporthe grisea*, *Neurospora crassa* et *Tuber melanosporum*.

3.3.1.5. Etude de la structure des gènes LbZips

Chez les eucaryotes, les gènes sont fréquemment constitués d'une suite d'exons et d'introns alternés. Les exons correspondent aux séquences codantes des gènes et les introns sont des séquences non codantes. Lors de la transcription de l'ADNg en ARN messenger, un ARN pré-messenger est synthétisé, contenant les exons et les introns, puis est épissé (les introns sont éliminés) en ARN messenger mature. Cet ARN messenger mature est ensuite traduit en protéine. Si les introns sont mal épissés, la protéine traduite peut alors être non fonctionnelle, soit par décalage du cadre de lecture et conduire à l'introduction prématurée d'un codon stop dans la séquence, la protéine synthétisée étant alors tronquée ; soit la modification de la séquence en acide aminés de la protéine modifie ses propriétés physico-chimiques et donc sa fonction. Parfois, l'expression des gènes peut être régulée par épissage alternatif, c'est-à-dire que certains introns sont délibérément non épissés. Les sites des introns sont souvent conservés entre espèces proches, facilitant leur identification par des logiciels de prédiction, de plus, chez *Laccaria bicolor*, ces sites sont majoritairement bordés par les doublets "GT" et "AG" respectivement comme « pieds » et « têtes » d'introns (Martin *et al.*, 2008).

La structure des gènes LbZips a alors été étudiée afin de comparer les séquences entre elles et notamment la succession des introns et des exons. D'après la figure 63, les introns occupent une proportion variable dans les séquences codantes des gènes Zips étudiés de *Laccaria bicolor*. Ainsi, les gènes LbZipA, LbZipB, LbZipC et LbZipE présentent une proportion faible (respectivement 27, 26, 16 et 22 %) d'introns, contre 41 % pour le gène LbZipD.

Les gènes LbZipA et LbZipB ont des tailles similaires (environ 1400 paires de bases) **et une organisation génique identique**, leurs introns étant localisés au même niveau dans leur séquence respective. Ces deux gènes **présentent 77 % d'identité dans leurs séquences nucléotidiques**. Les trois autres gènes, LbZipC, LbZipD et LbZipE ne présentent aucune similarité de taille ou d'organisation.

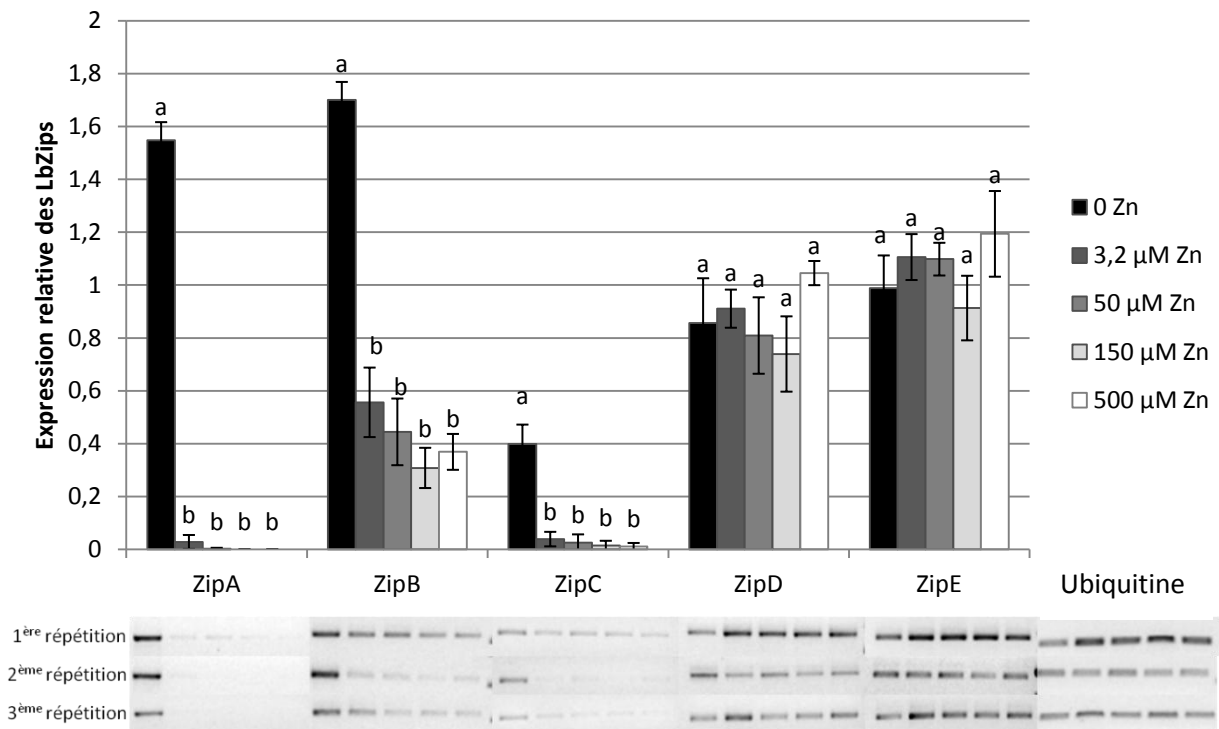


Figure 65 : Taux de transcrits des gènes LbZips en fonction de concentrations croissantes en zinc extracellulaire. La souche de *Laccaria bicolor* S238N-H82 a été cultivée une semaine en milieu Pachlewski liquide contenant différentes concentrations en zinc. L'expression relative des gènes LbZips a été calculée par rapport au taux d'expression du gène qui code l'ubiquitine. Les barres représentent les erreurs standards sur 3 répétitions. Les lettres différentes représentent les différences significatives à $p < 0,05$.

3.3.1.6. Etude de la topologie des protéines LbZIPs

La figure 64 (A) présente la topologie prédite des cinq protéines ZIPs de *L. bicolor*. Il y a une **conservation du modèle à huit domaines transmembranaires** proposé par Eide (2006) (Figure 64 (B)). Les cinq protéines ont leurs deux extrémités (C-ter et N-ter) situées à l'extérieur du cytoplasme. L'étude plus fine de la composition en bases de chaque séquence montre des similitudes. En effet, pour les trois protéines LbZIPA, LbZIPB et LbZIPD, il existe une longue boucle intracytoplasmique riche en histidine (plus de 10 % du nombre d'acides aminés sur le segment considéré) située après les trois premiers domaines transmembranaires ; **les protéines LbZIPA et LbZIPB présentant environ 80 % d'identité entre leurs séquences protéiques**. Pour la protéine LbZIPC, plus longue que les autres protéines LbZIPs, ce sont deux longues boucles riches en histidine qui sont présentes après les cinquième et septième domaines transmembranaires. La protéine LbZIPE ne possède pas de régions ni de motifs particulièrement riches en histidine mis à part une petite boucle cytoplasmique située avant le dernier domaine transmembranaire.

3.3.2. Etude du niveau d'expression des gènes par RT-PCR semi-quantitative

L'expression des gènes Zips de *Laccaria bicolor* a été mesurée en réponse à différentes conditions. Pour chaque test effectué, trois répétitions ont été réalisées.

En premier lieu, la régulation des gènes par la concentration en zinc intracellulaire a été observée. Pour cela, le mycélium a été cultivé une semaine en milieu Pachlewski liquide contenant différentes concentrations en zinc caractéristiques d'un milieu carencé (sans Zn ajouté au milieu), ou en excès (50, 150 et 500 μM de Zn), ou en condition « normale » (3,2 μM de Zn, concentration habituelle du milieu). Les résultats sont présentés dans la figure 65. **L'expression des gènes LbZipD et LbZipE ne varie pas quelle que soit la quantité de zinc extracellulaire apportée**. En revanche, les gènes **LbZipA et LbZipC sont fortement régulés par la quantité de zinc intracellulaire**. En effet, leur taux de transcrits est très fortement diminué dès l'ajout de 3,2 μM de zinc dans le milieu. **Le gène LbZipB est lui aussi régulé par le zinc** mais dans une moindre mesure puisqu'une expression résiduelle (≈ 3 fois moins de transcrits qu'en cas de carence en zinc) semble toujours visible même pour de fortes concentrations en zinc.

Ensuite, de plus faibles concentrations en zinc extracellulaire ont été testées de la même manière (0 Zn, 0,5 ; 1 ; 2 ; 3,2 μM de Zn) (Figure 66 (A)) uniquement sur les gènes LbZipA, B et C régulés par le zinc intracellulaire. **Les gènes LbZipA et LbZipC semblent régulés de la même façon**. L'expression de ces gènes diminue à partir de 0,5 μM de zinc ajouté dans le milieu. **Le gène LbZipB est régulé par des concentrations plus fortes en zinc, à partir de 2 μM .**

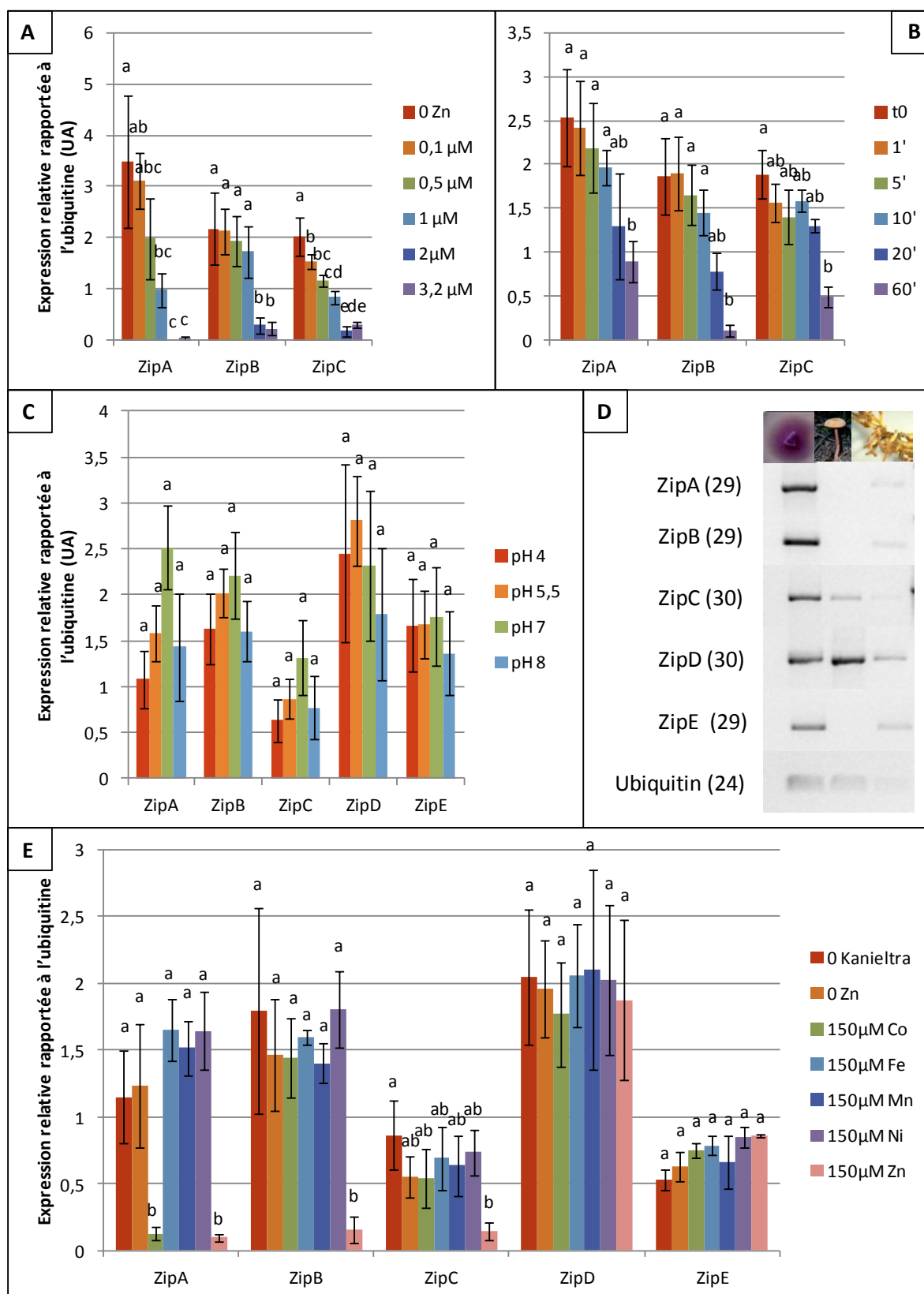


Figure 66 : Régulation de la transcription des gènes LbZips par le taux de zinc intracellulaire (A) ; en fonction du temps après ajout de 500 μM de Zn (B) ; par le pH extracellulaire (C) ; en fonction du « tissu » fongique (D) ; par différents ETM (E). La souche de *Laccaria bicolor* S238N-H82 a été cultivée une semaine en milieu Pachlewski liquide. Les barres représentent les erreurs standards sur 3 répétitions. Les lettres différentes représentent les différences significatives à $p < 0,05$. UA : Unité Arbitraire. Les chiffres entre parenthèses (D) représentent le nombre de cycles de PCR réalisés dans l'expérience.

Les gènes LbZipA, B et C étant régulés par le zinc intracellulaire, la vitesse de réponse a alors été évaluée. Pour cela, le mycélium a été cultivé une semaine en milieu carencé en zinc, puis à un temps t donné, 150 μ M de zinc ont été ajoutés dans le milieu, et le mycélium a ensuite été récolté après 0, 1, 5, 10, 20 et 60 minutes (Figure 66 (B)). **Le taux de transcrits des gènes LbZipA et LbZipC diminue entre 20 et 60 minutes** après l'ajout de zinc dans le milieu. L'expression du gène **LbZipB est régulée plus rapidement puisqu'elle a lieu entre 10 et 20 minutes** après l'ajout de zinc.

En deuxième lieu, l'influence du pH extracellulaire sur l'expression des gènes LbZips a été testée. Le mycélium a été cultivé pendant une semaine en milieu carencé en zinc puis transféré 18 heures dans un milieu normal tamponné à pH 4 ; 5,5 ; 7 ou 8 (Figure 66 (C)). **L'expression des gènes LbZips ne varie significativement pas quel que soit le pH du milieu.**

En troisième lieu, la spécificité « tissulaire » de l'expression des gènes LbZips a été étudiée. L'expression de ces gènes a été comparée entre du mycélium en culture pure, des mycorhizes de douglas et des carpophores (la fructification du champignon) (Figure 66 (D)). Les gènes LbZipA, B et E ne sont pas ou peu exprimés dans le carpophore et légèrement exprimés dans les mycorhizes. Le gène LbZipC est plus exprimé dans le carpophore que dans la mycorhize. Le gène LbZipD est très fortement exprimé dans les carpophores. Cependant, comme le niveau de zinc n'est pas connu dans les carpophores ou les mycorhizes, les différences de niveau de transcrits observées pour les gènes LbZipA, B et C entre les différents « tissus » de la symbiose ne reflètent pas forcément une différence d'expression liée à « l'organe » considéré.

Enfin, la régulation des gènes LbZips par d'autres métaux a été évaluée (Figure 66 (E)). Le mycélium a été cultivé une semaine en présence de différents métaux (Co, Fe, Mn, Ni, Zn) à des concentrations subtoxiques (150 μ M). Les points en carence en zinc (sans Zn) et en carence en éléments traces (sans Kanieltra) servent de contrôle. Les gènes LbZipD et E ne sont pas régulés quelle que soit la condition. Les gènes LbZipA, B et C sont régulés par le zinc intracellulaire comme observé précédemment. De plus, **l'expression du gène LbZipA est inhibée également par le cobalt.**

La régulation des gènes LbZips par des ETM à des concentrations toxiques (à l'IC50) pour le champignon a ensuite été analysée (Figure 67). D'une manière générale, le taux de transcrits des gènes LbZipA, B et C est plus faible en présence des ETM à des concentrations toxiques. Cependant, seuls certains métaux ont le même effet que le zinc sur l'expression de ces gènes. Ainsi, **l'expression du gène LbZipA semble fortement inhibée par le cadmium, le cobalt et le fer ; celles des gènes LbZipB et LbZipC semblent fortement inhibés par le fer en plus du zinc.**

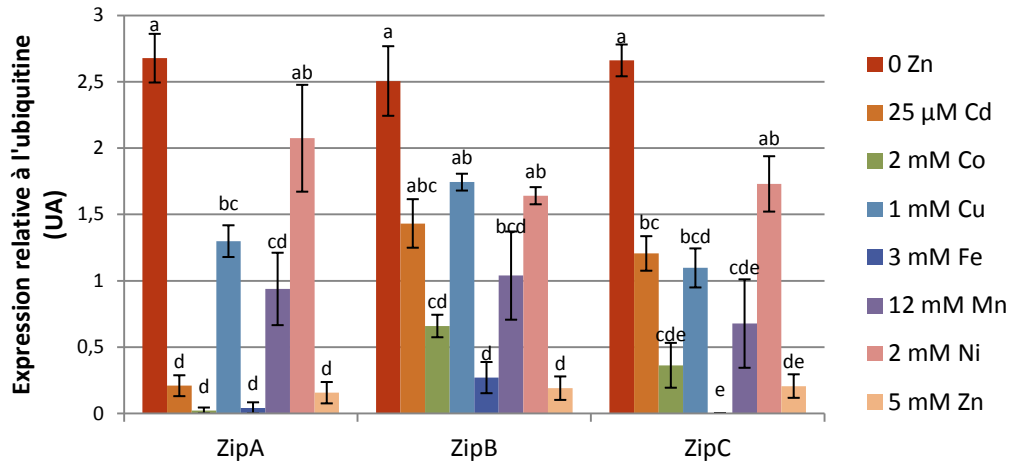


Figure 67 : Régulation de la transcription des gènes LbZips par différents ETM à la concentration inhibitrice à 50 % (IC50). La souche de *Laccaria bicolor* S238N-H82 a été cultivée une semaine en milieu Pachlewski liquide. Les barres représentent les erreurs standards sur 3 répétitions. Les lettres différentes représentent les différences significatives à $p < 0,05$. UA : Unité Arbitraire.

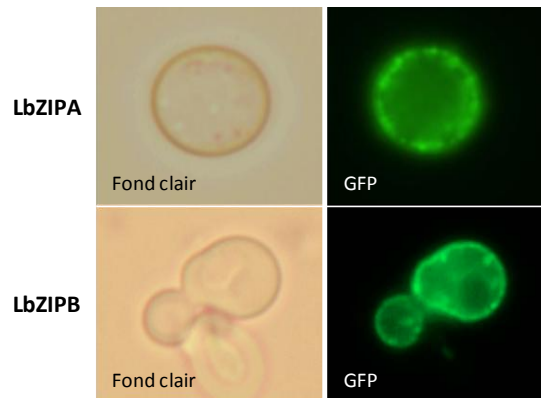


Figure 68 : Localisation subcellulaire des protéines LbZIPA et LbZIPB dans des cellules de levures exprimant respectivement les gènes LbZipA-GFP et LbZipB-GFP vues au microscope en lumière blanche ou en fluorescence (grossissement x1000) (Doillon, 2010)

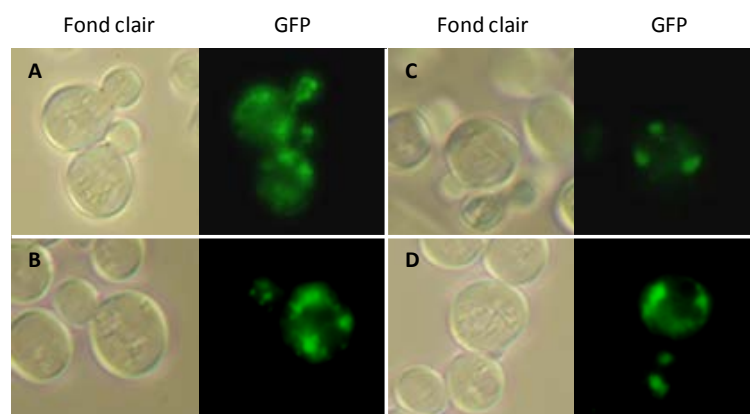


Figure 69 : Localisation subcellulaire de la protéine LbZIPA dans des cellules de levures exprimant les gènes LbZipA-GFP vues au microscope en lumière blanche ou en fluorescence (grossissement x1000) dans *Zrt1-Zrt2Δ* en condition non limitante en zinc (milieu SD-ura) (A) ; dans *Zrt1-Zrt2Δ* en condition de carence en zinc (milieu minimum sans zinc) (B) ; dans *Zrt1-Zrt2Δ* en condition de carence en zinc exprimant une mutation K119R (C) ; dans *End4Δ* en condition de carence en zinc (D). Des observations similaires ont été obtenues pour la protéine LbZIPB (résultats non présentés).

3.3.3. Localisation subcellulaire des protéines de la famille LbZIP

Les ADNc des gènes LbZipA, LbZipB, LbZipC et LbZipD ont été clonées dans le vecteur d'expression pYES2 en fusion avec la GFP afin de mettre en évidence la localisation subcellulaire des protéines correspondantes dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Dans un premier temps, les levures sont observées au microscope en lumière blanche afin de vérifier le bon état des cellules. Dans un second temps, un faisceau lumineux à la longueur d'onde d'excitation de la GFP est appliqué et un filtre adapté est utilisé pour capter le signal d'émission de la GFP.

3.3.3.1. Localisation cellulaire des protéines LbZIPA et LbZIPB

D'après l'analyse phylogénétique, les protéines LbZIPA et LbZIPB devraient être localisées au niveau de la membrane plasmique puisqu'elles semblent proches de ScZRT1 et ScZRT2, des transporteurs de zinc localisés au niveau de la membrane plasmique chez la levure. Lors de sa thèse, D. Doillon a réalisé une **localisation des protéines LbZIPA et B** par fusion GFP chez la levure (Figure 68) (Doillon, 2010) et a observé une localisation de ces deux protéines **au niveau de la membrane plasmique**. Afin de confirmer ces résultats, leur localisation a été vérifiée dans plusieurs conditions (Figure 69).

Dans un premier temps, la localisation a été réalisée dans la souche de levure mutante *Zrt1-Zrt2Δ*, déficiente en absorption du zinc, dans du milieu de culture SD-ura galactose. Dans les cellules exprimant la protéine chimère LbZIPA-GFP, le signal est diffus et semble localisé dans de petites vésicules (Figure 69 (A)). Chez la levure, il a été montré que la présence de zinc dans le milieu induit une réponse post-traductionnelle conduisant à l'ubiquitination des transporteurs ScZRT1 et ScZRT2, à leur endocytose et à leur dégradation dans la vacuole (Gitan *et al.*, 1998 ; Gitan & Eide, 2000) permettant de limiter l'entrée de zinc dans la cellule (Figure 21).

Dans un deuxième temps, la localisation a alors été réalisée dans un milieu carencé en zinc (milieu minimum sans zinc). Deux cas de figures se sont alors présentés : soit un faible signal GFP, persistant seulement quelques secondes, était visible à la membrane plasmique ; soit un signal plus fort était visible dans de petites vésicules (Figure 69 (B)).

Chez la levure *S. cerevisiae* et la plante *A. thaliana*, des sites spécifiques de liaison à l'ubiquitine respectivement de ScZRT1 et AtIRT1 ont été identifiés entre les domaines transmembranaires III et IV, proches du domaine riche en histidine (Gitan *et al.*, 2003 ; Kerkeb *et al.*, 2008). Plus particulièrement, chez *S. cerevisiae*, la mutation de la lysine en position 195, ou de la sérine en position 208, ou la délétion des acides aminés 205-211, empêche la dégradation de la protéine ScZRT1 en présence de zinc (Figure 21) (Gitan *et al.*, 2003). De même, chez *A. thaliana*, une lysine en position 146 semble essentielle à l'ubiquitination et la

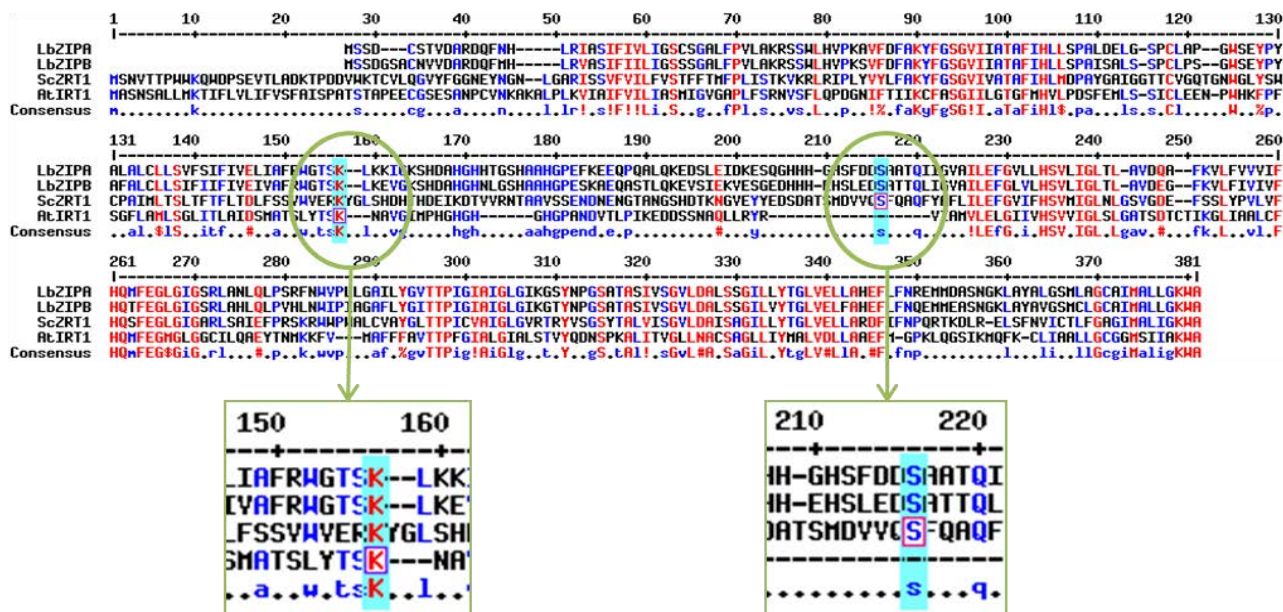


Figure 70 : Alignement des séquences protéiques de LbZIPA, LbZIPB, ScZRT1 et AtIRT1. La lysine 146 d'AtIRT1 impliquée dans la dégradation de la protéine en cas d'excès de fer est très conservée ainsi que la sérine 214 de ScZRT1, ces acides aminés ont alors été choisis pour mutation chez LbZIPA et LbZIPB. Les acides aminés sont représentés en rouge si identiques, en bleu si conservés dans au moins deux séquences et noirs si différents.

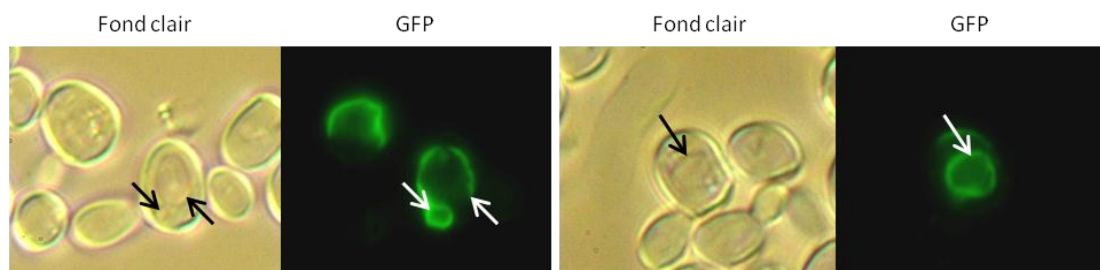


Figure 71 : Localisation subcellulaire de la protéine LbZIPC dans des cellules de levures exprimant le gène LbZipC-GFP vues au microscope en lumière blanche ou en fluorescence (grossissement x1000). Les flèches indiquent la membrane vacuolaire.

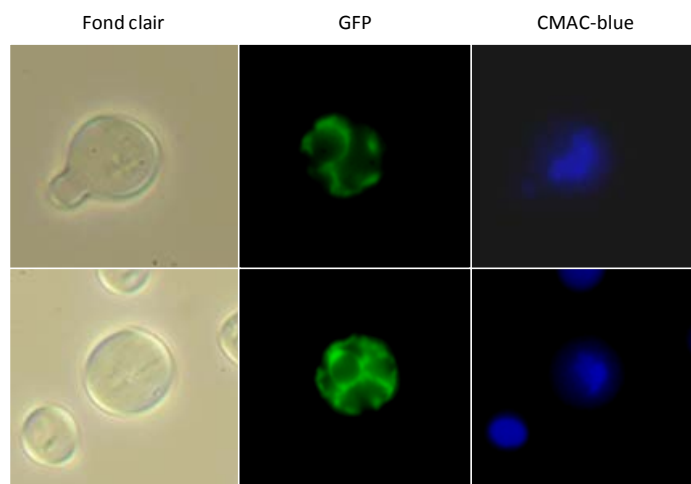


Figure 72 : Localisation subcellulaire de la protéine LbZIPD dans des cellules de levures exprimant le gène LbZipD-GFP vues au microscope en lumière blanche ou en fluorescence (grossissement x1000). Le CMAC-blue colore le lumen de la vacuole.

dégradation d'AtIRT1 en présence de fer (Kerkeb *et al.*, 2008). Un alignement de séquences de ces deux protéines et des séquences des protéines LbZIPA et LbZIPB a permis de mettre en évidence une conservation de ces acides aminés (Figure 70). Des mutations K119R et S176A de LbZIPA et K122R et S179A chez LbZIPB ont alors été réalisées. Cependant, ces mutations n'ont pas permis d'améliorer la qualité du signal GFP observé (Figure 69 (C)).

- Une délétion de plusieurs acides aminés dans la zone supposée active permettrait peut-être d'éviter la dégradation de ces protéines.

Enfin, comme les protéines LbZIPA et B semblent être internalisées dans des vésicules d'endocytose avant d'être dégradées au niveau de la vacuole, un mutant de levures incapable de réaliser l'endocytose, *End4Δ*, a été utilisé. Malheureusement, dans ce cas également, soit un signal faible de GFP était aperçu à la membrane plasmique, soit le signal était concentré dans de petites vésicules (Figure 69 (D)).

Toutefois, les protéines **LbZIPA et LbZIPB semblent localisées au niveau de la membrane plasmique** mais d'autres conditions devraient être testées afin d'éviter la dégradation de ces protéines.

3.3.3.2. Localisation cellulaire de LbZIPC

D'après l'analyse phylogénétique, la protéine LbZIPC devrait être localisée au niveau de la membrane plasmique puisqu'elle semble proche de ScZRT1 et ScZRT2. Cependant, d'après la figure 71, **la protéine LbZIPC semble plutôt localisée au niveau de la membrane de la vacuole**. Cette protéine pourrait alors être l'orthologue de ScZRT3, un transporteur de la levure impliqué dans la remobilisation du zinc stocké dans la vacuole (MacDiarmid *et al.*, 2000).

3.3.3.3. Localisation cellulaire de LbZIPD

D'après l'analyse phylogénétique, la protéine LbZIPD devrait être localisée au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique puisqu'elle semble proche de ScYKE4, un transporteur permettant l'efflux de zinc du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme chez la levure (Kumànovics *et al.*, 2006). D'après la figure 72, **la protéine LbZIPD semble effectivement localisée au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique** puisque le signal GFP semble localisé autour du noyau et rejoindre la membrane plasmique. De plus, aucune colocalisation avec le CMAC-blue, un colorant du lumen de la vacuole, n'est observée. Cette protéine pourrait alors être l'orthologue de ScYKE4.

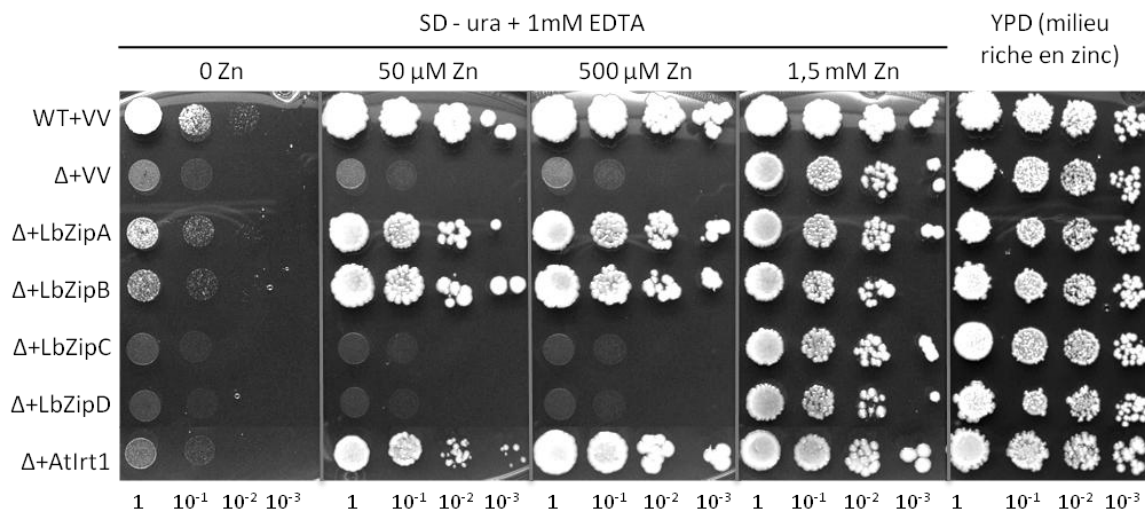


Figure 73 : Tests de complémentation de la levure mutante *Zrt1-Zrt2Δ*, déficiente en absorption du zinc, exprimant un gène de *Laccaria bicolor*, LbZipA, LbZipB, LbZipC ou LbZipD, ou d'*Arabidopsis thaliana*, Atlrt1 ; ou transformée par le vecteur vide pFL61 (VV) en milieu solide. La souche Δ+VV sert de témoin négatif alors que la souche sauvage vecteur vide (WT + VV) et la souche mutante transformée avec Atlrt1 servent de témoins positifs. L'EDTA permet de chélater le zinc disponible qui pourrait subsister dans le milieu. Plusieurs dilutions sont étalées (1 à 10⁻³) et le développement des colonies est observé après 5 jours de croissance. Trois répétitions avec trois transformants différents pour chaque plasmide utilisé ont été réalisées pour ce test.

3.3.4. Complémentation fonctionnelle en système hétérologue, la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Pour les différents tests de complémentation réalisés, la levure sauvage ou les levures mutantes déficientes en absorption de divers ETM transformées avec *AtIrt1* servent de contrôle positif. En effet, *IRT1* est un transporteur membranaire permettant l'absorption de fer, de zinc, et également d'autres éléments dans une moindre mesure, comme le manganèse, le cadmium, le cuivre et le cobalt (Korshunova *et al.*, 1999).

3.3.4.1. Complémentation de levures déficientes en absorption de divers ETM

3.3.4.1.1. Complémentation de la levure déficiente en absorption du zinc : *Zrt1-Zrt2Δ*

L'expression hétérologue des protéines ZIPs est étudiée dans *Zrt1-Zrt2Δ*, une souche déficiente pour l'absorption du zinc. Les souches sauvages (WT) et *Zrt1-Zrt2Δ* (Δ), délétée pour les gènes *ScZrt1* et *ScZrt2*, transformées avec le vecteur pFL61 vide servent respectivement de témoin positif et de témoin négatif.

Un premier test a été réalisé en milieu solide afin de s'assurer que les protéines LbZIPA et B restaurent la croissance de la souche mutante sur milieu sélectif pauvre en zinc (SD-ura EDTA 1mM Zn 50 μ M ou 500 μ M). Les résultats sont présentés dans la figure 73. Toutes les souches poussent de manière équivalente sur les milieux contrôle (YPD) et de sélection supplémenté en zinc (SD-ura EDTA 1 mM et Zn 1,5 mM) qui servent de témoins positifs de croissance. Le milieu de sélection carencé en zinc (SD-ura EDTA 1 mM) sert de témoin négatif de croissance. La souche *Zrt1-Zrt2Δ* transformée avec le plasmide portant le gène *AtIrt1* sert de contrôle positif. **L'expression des protéines LbZIPC et LbZIPD dans la souche *Zrt1-Zrt2Δ* ne permet pas de restaurer sa croissance.** Ceci confirme que leurs fonctions putatives seraient de remobiliser le zinc respectivement depuis la vacuole ou depuis le réticulum endoplasmique vers le cytoplasme. L'expression des gènes *LbZipA* et *B* chez la souche déficiente en absorption en zinc permet de restaurer la croissance sur un milieu limitant en zinc. **Les protéines LbZIPA et LbZIPB pourraient alors être responsables de l'import du zinc dans la cellule.**

Un deuxième test a alors été réalisé en milieu minimum liquide afin de confirmer ce premier résultat. Trois transformants par souche ont été cultivés en milieu minimum liquide supplémenté de 0, 50, 100, 200 ou 500 μ M de zinc pendant 48 heures. Le point à 24 heures de croissance a été choisi car il était le plus représentatif, les cultures témoin positif (WT-VV et *Zrt1-Zrt2Δ-AtIrt1*) étant en phase stationnaire de

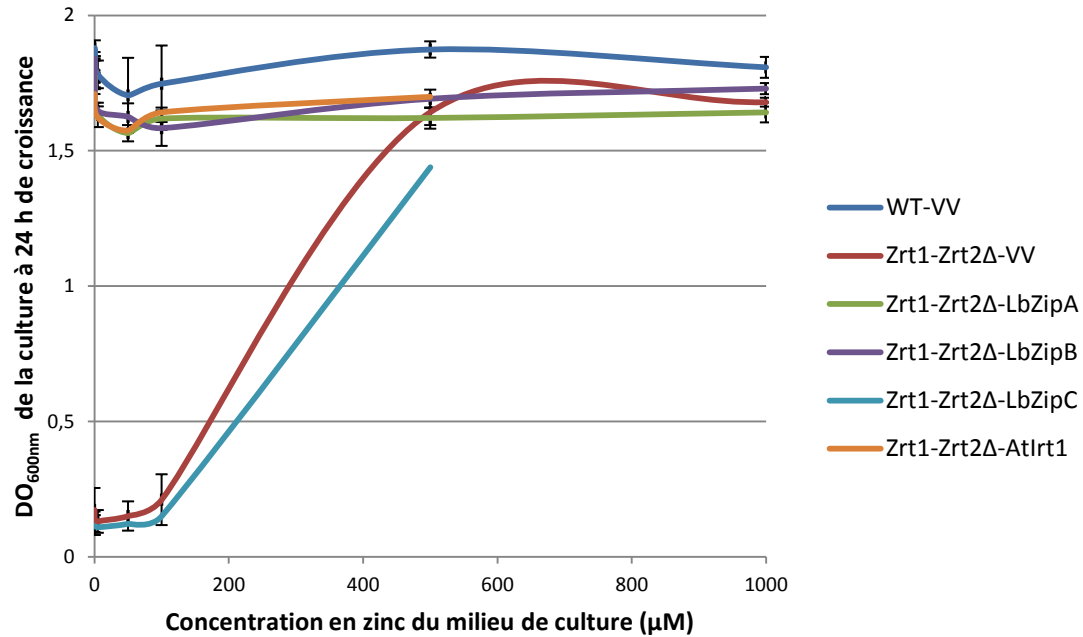


Figure 74 : Tests de complémentation de la levure mutante *Zrt1-Zrt2Δ*, déficiente en absorption du zinc, exprimant un gène de *Laccaria bicolor*, LbZipA, LbZipB ou LbZipC, ou d'*Arabidopsis thaliana*, AtIrt1 ; ou transformée par le vecteur vide pFL61 (VV) en milieu liquide. La souche Δ-VV sert de témoin négatif alors que la souche sauvage transformée avec le vecteur vide (WT-VV) et la souche mutante transformée avec AtIrt1 servent de témoins positifs. La densité optique de la culture de levures a été mesurée à 24 heures de croissance en milieu minimum supplémenté de 0, 50, 100, 200 ou 500 µM de zinc. Les barres représentent les écart-types (n = 3).

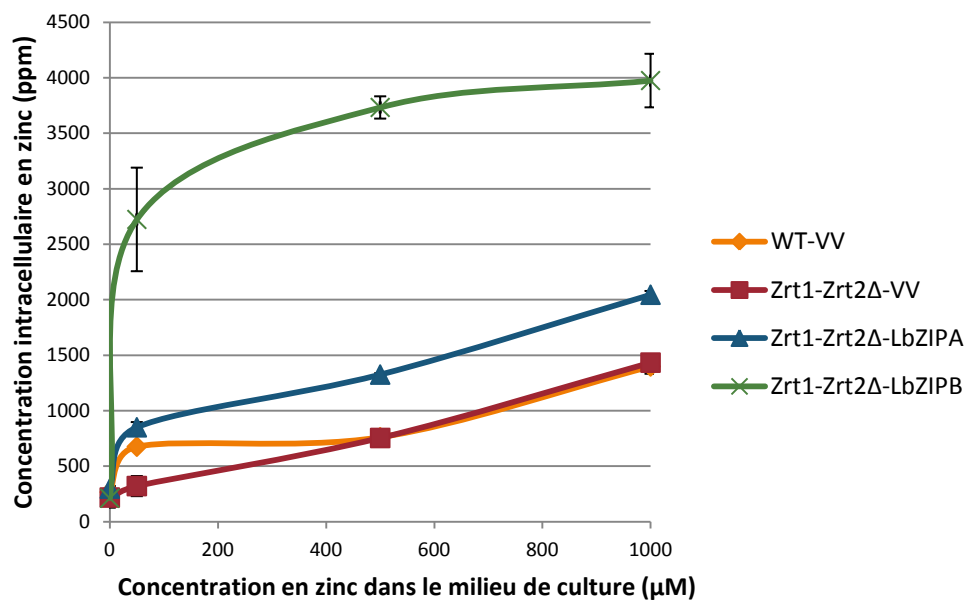


Figure 75 : Effet de la surexpression de LbZipA et LbZipB sur l'accumulation du zinc par *Zrt1-Zrt2Δ*, souche de levure déficiente en absorption du zinc, comparée à l'accumulation de la souche sauvage (WT), transformée par le vecteur vide (VV). Les différentes souches de levures ont été cultivées en milieu SD-ura supplémenté de 50, 100, 500 et 1000 µM de zinc jusqu'à une DO_{600nm} comprise entre 1,8 et 2. Trois transformants différents ont été utilisés pour chaque souche. Les levures ont ensuite été récoltées, lavées à l'EDTA (élimination des ETM adsorbés aux parois) et séchées. La concentration en zinc intracellulaire a été mesurée par dosage ICP-AES. Les barres représentent les écart-types (n = 3).

croissance sur tous les milieux testés. Les résultats sont présentés dans la figure 74. La croissance de la souche mutante transformée avec le vecteur vide et avec le vecteur contenant LbZipC est fortement ralentie en présence de zinc à faible concentration ($< 500 \mu\text{M}$), **l'expression du gène LbZipC ne permet pas de compléter la levure déficiente pour l'absorption du zinc**. En revanche, l'expression des gènes LbZipA et LbZipB permet de restaurer une croissance de la souche mutante équivalente à celle des témoins positifs sur tous les milieux testés. **Les protéines LbZIPA et LbZIPB pourraient donc être impliquées dans l'absorption du zinc.**

Afin de confirmer l'implication des protéines LbZIPA et B dans l'absorption du zinc, l'accumulation de zinc intracellulaire a été mesurée dans la levure sauvage, la levure mutante transformée avec le vecteur vide et celle transformée avec les vecteurs contenant les gènes LbZipA et B (Figure 75) ; en présence de 0, 50, 500 ou 1000 μM de zinc dans le milieu. Les souches mutante et sauvage transformées avec le vecteur vide accumulent peu de zinc (maximum $1,5 \text{ mg.gMS}^{-1}$) même en présence de 1 mM de zinc dans le milieu. Cependant, la souche sauvage semble accumuler plus de zinc que la souche mutante sur de faibles concentrations en zinc ($750 \mu\text{g.gMS}^{-1}$ au lieu de $250 \mu\text{g.gMS}^{-1}$ à $50 \mu\text{M}$ de zinc). **Les souches mutantes surexprimant les gènes LbZipA ou LbZipB accumulent fortement le zinc** par rapport à la souche déficiente en absorption du zinc, respectivement de 1,5 à 2,7 fois plus. De plus, **une quantité de zinc plus importante est accumulée dans les cellules lorsque le gène LbZipB est surexprimé par rapport aux cellules surexprimant le gène LbZipA** ; le transporteur LbZIPB pourrait alors permettre d'absorber une plus grande quantité de cet élément dans la cellule. Cette différence d'accumulation du zinc observée pourrait alors être due à une différence d'affinité des transporteurs LbZIPA et LbZIPB pour le zinc. En effet, les transporteurs de forte-affinité permettent d'absorber le zinc lorsque sa concentration extracellulaire est très faible et sont ensuite réprimés lorsque la concentration extracellulaire augmente. A l'inverse, les transporteurs de faible-affinité seront exprimés lorsque les concentrations extracellulaires en zinc sont plus importantes et permettent ainsi une absorption plus importante de cet élément. **La protéine LbZIPB pourrait ainsi être un transporteur de faible-affinité pour le zinc et LbZIPA un transporteur de forte-affinité.**

D'autres tests de complémentation ont ensuite été réalisés afin de déterminer si les protéines étudiées permettraient de transporter d'autres ETM comme cela a par exemple été montré pour le transporteur AtIRT1 (Korshunova *et al.*, 1999). La souche de levures sauvage BY4741 a été utilisée pour étudier l'absorption du cadmium, du cobalt, du manganèse, du nickel, du chrome, de l'argent et de l'aluminium. De même, des tests de complémentation ont été réalisés dans les souches de levures mutantes *Fet3-Fet4Δ* et *Ctr1Δ*, déficientes en absorption respectivement du fer et du cuivre.

Des tests de complémentation de la levure déficiente en absorption du manganèse *Smf1Δ* ont été réalisés mais n'ont pas permis de conclure sur les capacités d'absorption des différentes protéines testées.

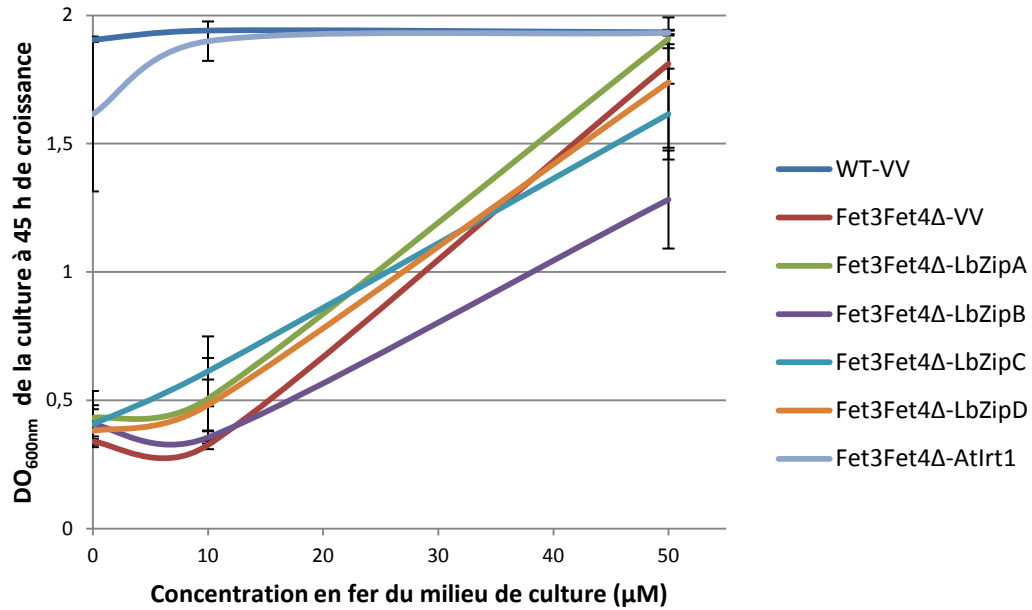


Figure 76 : Tests de complémentation de la levure mutante *Fet3-Fet4Δ*, déficiente en absorption du fer, exprimant un gène de *Laccaria bicolor*, LbZipA, LbZipB, LbZipC ou LbZipD, ou d'*Arabidopsis thaliana*, AtIrt1 ; ou transformée par le vecteur vide pFL61 (VV) en milieu liquide. La souche Δ-VV sert de témoin négatif alors que la souche sauvage transformée avec le vecteur vide (WT-VV) et la souche mutante transformée avec AtIrt1 servent de témoins positifs. La densité optique de la culture de levures a été mesurée à 45 heures de croissance en milieu minimum sans fer supplémenté de 0, 50, 100, 200 ou 500 μM de fer. Les barres représentent les écart-types (n = 3).

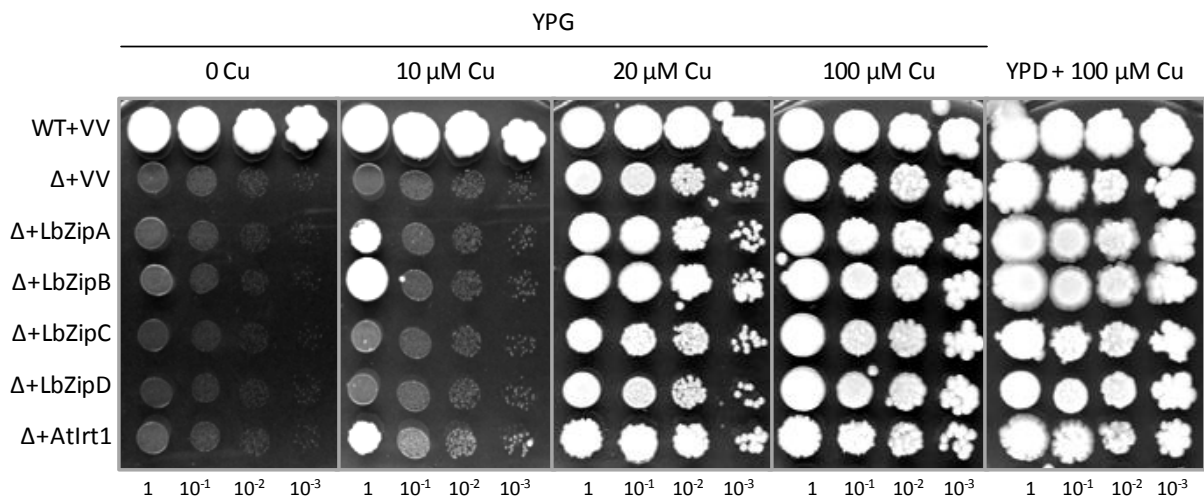


Figure 77 : Tests de complémentation de la levure mutante *Ctr1Δ*, déficiente en absorption du cuivre, exprimant un gène de *Laccaria bicolor*, LbZipA, LbZipB, LbZipC ou LbZipD, ou d'*Arabidopsis thaliana*, AtIrt1 ; ou transformée par le vecteur vide pFL61 (VV) en milieu solide. Le milieu YPG est préparé en remplaçant le glucose par du glycérol à 3 % (w/v). La souche Δ+VV sert de témoin négatif alors que la souche sauvage vecteur vide (WT + VV) et la souche mutante transformée avec AtIrt1 servent de témoins positifs. Plusieurs dilutions sont étalées (1 à 10⁻³) et le développement des colonies est observé après 5 jours de croissance. Trois répétitions avec trois transformants différents de chaque plasmide utilisé ont été réalisées pour ce test.

En effet, il a été impossible d'obtenir le phénotype d'absence de croissance sur le milieu carencé en manganèse.

3.3.4.1.2. Complémentation de la levure déficiente en absorption de fer : *Fet3-Fet4Δ*

Afin de déterminer si les protéines LbZIPs sont capables de transporter également le fer, une levure mutante *Fet3-Fet4Δ*, délétée pour les gènes *ScFet3* et *ScFet4* impliqués dans l'absorption du fer, a été utilisée. La souche sauvage (WT-VV) transformée avec le vecteur vide sert de témoin positif de croissance tout comme la souche mutante transformée avec *AtIrt1*, un gène impliqué dans l'absorption du fer et du zinc chez *A. thaliana*. La souche mutante transformée avec le vecteur vide sert de témoin négatif de croissance.

Pour ce test, trois transformants par souche ont été cultivés en milieu minimum liquide sans fer supplémenté de 0, 50, 100, 200 ou 500 μM de fer pendant 60 heures. Le point à 45 heures de croissance a été choisi car il était le plus représentatif, les cultures « témoin positif » (WT-VV et *Fet3-Fet4Δ-AtIrt1*) étant en phase stationnaire de croissance sur tous les milieux testés. Les résultats sont présentés dans la figure 76. Seules la souche sauvage et la souche mutante transformée avec *AtIrt1* sont capables de se développer sur le milieu de culture pauvre en fer. **Aucune des protéines LbZIPs** étudiées n'est capable, lorsqu'elles sont surexprimées, de restaurer la croissance de la souche déficiente en absorption du fer. Ces protéines **ne seraient donc pas des transporteurs de fer**.

3.3.4.1.3. Complémentation de la levure déficiente en absorption du cuivre : *Ctr1Δ*

Un test de complémentation de la levure déficiente en absorption du cuivre, *Ctr1Δ*, délétée pour le gène *ScCtr1* impliqué dans l'absorption du cuivre, a également été réalisé (Figure 77). Toutes les souches poussent de manière équivalente sur les milieux contrôle (YPD) et de sélection supplémenté en cuivre (YPG 100 μM Cu) qui servent de témoins positifs de croissance. Le milieu de sélection carencé en cuivre (YPG), contenant du glycérol comme source de carbone à la place du glucose, sert de témoin négatif de croissance. L'utilisation de glycérol dans le milieu à la place du glucose induit une condition d'anaérobiose qui a pour conséquence de limiter l'absorption du cuivre dans les cellules. Sur le milieu limitant en cuivre (YPG 10 μM de Cu), seules les levures transformées avec les plasmides contenant les gènes *AtIrt1*, *LbZipA* et *B* sont capables de se développer. **Les protéines LbZIPA et B seraient donc également impliqués dans l'absorption du cuivre**. Cependant, le phénotype observé est faible, il est alors probable que le cuivre ne soit pas l'élément préférentiellement pris en charge par ces transporteurs.

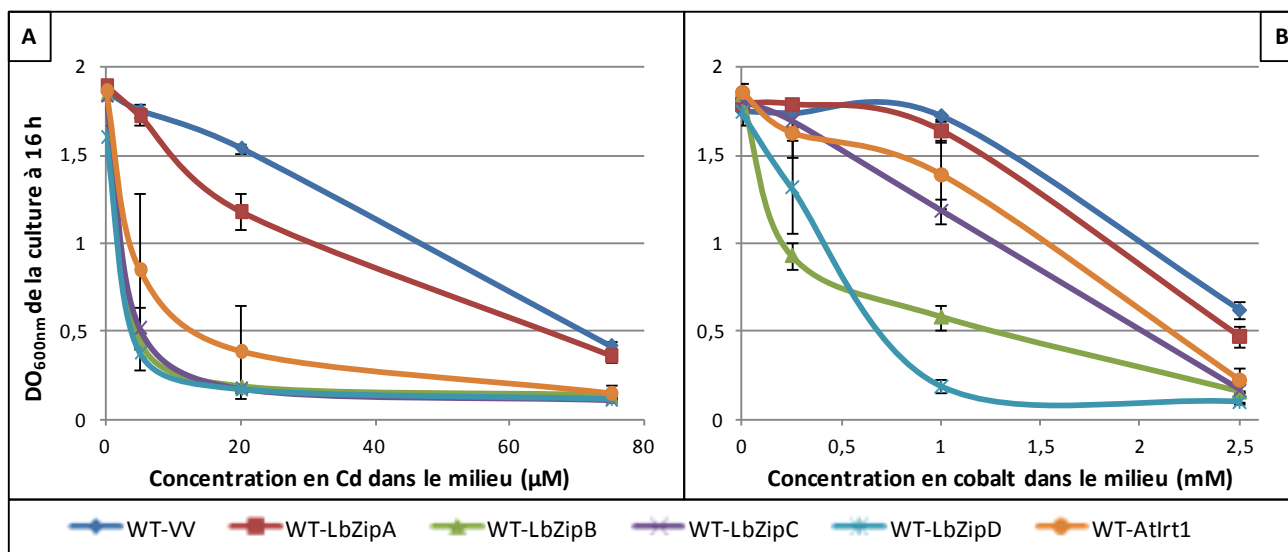


Figure 78 : Tests de résistance de la levure sauvage au cadmium (A) ou au cobalt (B), exprimant un gène de *Laccaria bicolor*, LbZipA, LbZipB, LbZipC ou LbZipD, ou d'*Arabidopsis thaliana*, AtIrt1 ; ou transformée par le vecteur vide pFL61 (VV). La densité optique de la culture de levures a été mesurée à 16 heures de croissance en milieu YPD supplémenté de 0, 10, 20 ou 50 μM de cadmium (A) ou de 0 ; 0,25 ; 1 ou 2,5 mM de cobalt (B). Les barres représentent les écarts-types (n = 3).

3.3.4.2. Surexpression des gènes LbZips chez la levure sauvage en présence de divers ETM

L'absorption d'autres ETM par les protéines ZIPs de *L. bicolor* ont également été testées par expression hétérologue dans la souche de levure sauvage BY4741 (WT). Dans ce cas, des concentrations de métaux subtoxiques et toxiques pour la levure sont utilisées. En effet, si la protéine est capable de transporter l'ETM étudié, la levure deviendra plus sensible cet élément. Les résultats obtenus pour le cadmium et le cobalt sont présentés dans la figure 78.

Pour le cadmium, les souches exprimant les gènes AtIrt1, LbZipB, LbZipC et LbZipD sont plus sensibles au cadmium que la souche sauvage transformée avec le vecteur vide. **Les protéines LbZIPB, C et D** pourraient être impliquées dans **l'absorption du cadmium ou dans un mécanisme augmentant la sensibilité des souches** à cet élément.

De même, pour le cobalt, les souches exprimant les gènes LbZipB et LbZipD sont plus sensibles au cobalt que la souche sauvage transformée avec le vecteur vide. Les souches exprimant les gènes LbZipC et AtIrt1 semblent également un peu plus sensibles. **Les protéines LbZIPB, C et D** pourraient être également impliquées dans **l'absorption du cobalt ou dans un mécanisme augmentant la sensibilité des souches** à cet élément.

D'autres ETM ont été testés comme le manganèse, le nickel, le chrome, l'argent et l'aluminium. Aucune sensibilité particulière de la souche sauvage exprimant les différents gènes étudiés n'a été observée (résultats non présentés). Il est donc probable que les protéines étudiées ne transportent pas ces éléments.

3.3.4.3. Complémentation de la souche de levure mutante *Zrt3Δ*, incapable de remobiliser le zinc stocké dans la vacuole

Lors de cette étude, plusieurs éléments laissent supposer que le gène LbZipC serait un orthologue de ScZrt3, un gène impliqué dans la remobilisation du zinc depuis la vacuole. En effet, la protéine LbZIPC semble localisée au niveau de la membrane vacuolaire et ne permet pas de compléter la souche de levure *Zrt1-Zrt2Δ* déficiente en absorption du zinc. De plus, le gène LbZipC est fortement régulé par le zinc intracellulaire comme cela a déjà été rapporté chez ScZrt3 de la levure (MacDiarmid *et al.*, 2000). Ainsi, un test de complémentation de la souche de levure mutante *Zrt3Δ*, délétée pour le gène ScZrt3, a été réalisé avec le gène LbZipC afin de vérifier cette hypothèse.

Dans le cas où la protéine LbZIPC serait impliquée dans la remobilisation du zinc depuis la vacuole, une surexpression de cette protéine dans la cellule pourrait induire une sensibilité au zinc de la cellule en augmentant la concentration en zinc du cytoplasme. Afin de vérifier cette hypothèse, la souche de levure sauvage a été transformée avec le plasmide pFL61-LbZipC dont l'expression est constitutive. La sensibilité de

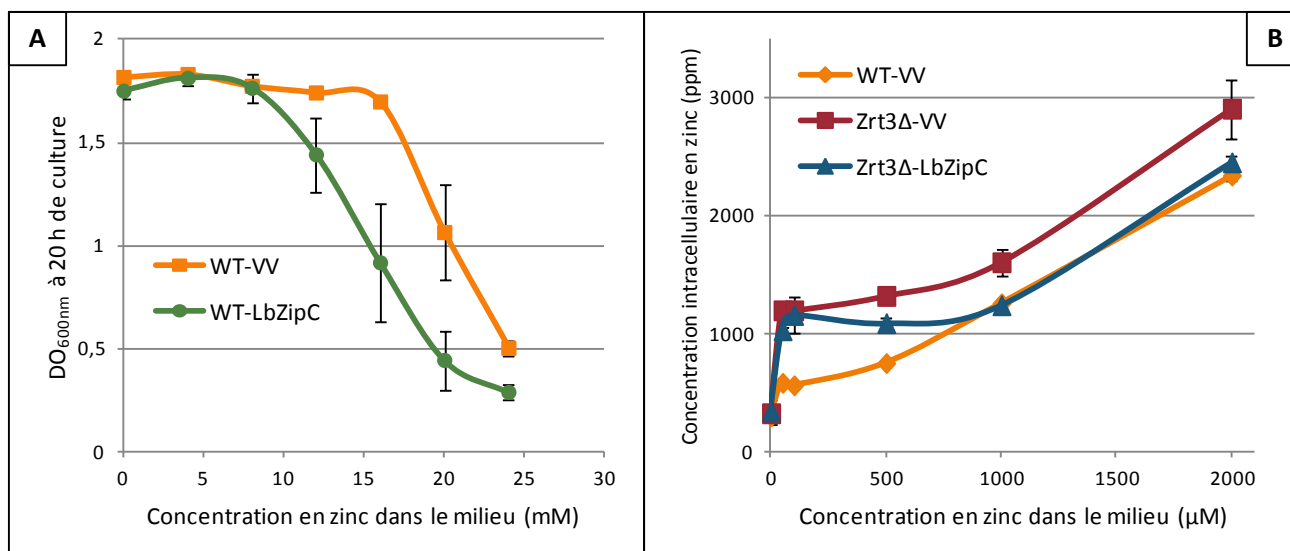


Figure 79 : Caractérisation de la protéine LbZIPC à l'aide :

A : d'un test de résistance de la levure sauvage au zinc, exprimant un gène de *Laccaria bicolor*, LbZipC, ou transformée par le vecteur vide pFL61 (VV). La densité optique de la culture de levures a été mesurée à 20 heures de croissance en milieu YPD supplémenté de 0, 5, 10, 15, 20 ou 25 mM de zinc. Les barres représentent les écart-types ($n = 3$).

B : de l'étude de l'effet de la surexpression du gène LbZipC sur l'accumulation du zinc par *Zrt3Δ*, souche de levure incapable de remobiliser le zinc stocké dans la vacuole, comparée à l'accumulation des souches sauvage (WT) et *Zrt3Δ*, transformées par le vecteur vide (VV). Les différentes souches de levures ont été cultivées en milieu SD-ura supplémenté de 50, 100, 500, 1000 et 2000 μM de zinc jusqu'à une DO_{600nm} comprise entre 1,8 et 2. Les levures ont ensuite été récoltées, lavées à l'EDTA et séchées. La concentration en zinc intracellulaire a été mesurée par dosage ICP-AES. Les barres représentent les écart-types ($n = 3$).

cette souche au zinc a ensuite été comparée à celle de la souche sauvage transformée avec le vecteur vide (Figure 79 (A)). La concentration inhibitrice à 50 % de la souche surexprimant le gène LbZipC est d'environ 15 mM de zinc contre 22 mM pour la souche sauvage. **La protéine LbZIPC augmente donc la sensibilité de la cellule au zinc.**

Ensuite, chez la levure, la majorité du zinc en excès est stocké dans la vacuole (Eide, 2006). La levure délétée pour ScZrt3, *Zrt3Δ*, incapable de remobiliser le zinc stocké dans la vacuole, accumule donc plus de zinc que la levure sauvage (MacDiarmid *et al.*, 2000) (Figure 79 (B)). **La surexpression du gène LbZipC dans la souche mutante *Zrt3Δ* permet de restaurer le phénotype de la souche sauvage** à de fortes concentrations en zinc (> à 1 mM) (Figure 79 (B)). **La protéine LbZIPC pourrait donc être un orthologue de ScZRT3 et permettre la remobilisation du zinc depuis la vacuole.**

3.3.5. Discussion

Les différentes protéines ZIPs de *Laccaria bicolor* ont été caractérisées grâce à diverses approches ciblées. Au niveau génomique, des analyses phylogénétiques et topologiques des protéines LbZIPs ont été menées afin de les comparer à d'autres protéines ZIPs caractérisées chez d'autres organismes comme la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Egalement, la régulation de l'expression des gènes LbZips a été évaluée par mesure des taux de transcrits par RT-PCR dans différentes conditions de croissance. Enfin, la caractérisation fonctionnelle par complémentation et la localisation des protéines ZIPs de *L. bicolor* a été observée dans un système hétérologue, la levure *S. cerevisiae*, la transformation de *L. bicolor* étant encore assez difficile. Jusqu'ici, les essais effectués au sein de notre unité n'ont pas été concluants et seule une équipe située en Argentine est capable de produire des transformants de *L. bicolor* (résultats non publiés).

L'analyse phylogénétique de la famille ZIP chez les champignons fait apparaître **quatre sous-familles distinguées par la localisation putative de leurs protéines** (déterminée à l'aide des protéines déjà caractérisées) au niveau de la membrane plasmique (sous-famille I), au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (sous-famille II ou LIV-1/LZT), au niveau de la membrane de l'appareil de Golgi (sous-famille III ou Atx2/ZIP9) ou au niveau de la membrane vacuolaire (sous-famille IV ou GufA). Cette classification semble **conforme à celles précédemment décrites par Blaby-Haas & Merchant (2012) et Gaither & Eide (2011)**. En effet, la famille ZIP a été originellement découpée en quatre sous-familles chez les eucaryotes : la sous-famille LIV-1 comprenant ScYKE4, la sous-famille GufA comprenant ScZRT3, la sous-famille I comprenant ScZRT1, ScZRT2 et ScATX2 et la sous-famille II ne comprenant que des membres de la famille ZIP appartenant aux plantes ou aux animaux (Gaither & Eide, 2001). Cependant, une amélioration de cette

classification a permis d'identifier deux nouvelles sous-familles : la sous-famille Atx2/ZIP9 (issue de la sous-famille I décrite par Gaither & Eide (2001)) et la sous-famille ZTP50 ne comprenant que des membres appartenant aux plantes ou aux animaux (Blaby-Haas & Merchant, 2012). Les séquences utilisées pour construire l'arbre phylogénétique appartenant uniquement aux champignons, aucun membre appartenant aux sous-familles II ou ZTP50 n'a été identifié. Il est également intéressant de noter qu'aucun membre de la famille ZIP appartenant aux Basidiomycètes n'est présent dans la sous famille IV/GufA.

La topologie des protéines LbZIPA, LbZIPB, LbZIPC, LbZIPD et LbZIPE est similaire au modèle présenté par Eide (2006), avec notamment la conservation du modèle à **huit domaines transmembranaires**, avec les **deux extrémités (N-terminale et C-terminale) localisées à l'extérieur du cytosol**. Chez la plupart des protéines ZIP, la région située entre les domaines transmembranaires III et IV est appelée région variable et contient généralement un domaine riche en histidine cytoplasmique. La fonction de ce domaine est encore inconnue mais pourrait servir de site de liaison aux ions métalliques (Eide, 2006). Le mécanisme permettant le transport d'ETM par les protéines ZIPs est encore mal connu, mais pourrait être un système passif médié par un gradient de concentration des ions métalliques (Blaby-Haas & Merchant, 2012).

D'après l'analyse phylogénétique, la protéine LbZIPE semble très proche de ScATX2, un transporteur impliqué dans la remobilisation du manganèse depuis l'appareil de Golgi vers le cytoplasme (Li & Culotta, 1996). L'expression du gène LbZipE est constitutive quelle que soit la condition testée. Cependant, ce travail de thèse étant centré sur la caractérisation des transporteurs de zinc, la caractérisation de cette protéine n'a pas été approfondie.

La protéine LbZIPD semble quant à elle très proche phylogénétiquement de la protéine ScYKE4, impliquée dans la remobilisation du zinc depuis le réticulum endoplasmique chez la levure (Kumànovics *et al.*, 2006). Or, la localisation subcellulaire de **la protéine LbZIPD** par fusion GFP en système hétérologue a permis de confirmer sa **localisation au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique**. Ce serait donc bien **un orthologue de la protéine ScYKE4 chez la levure** (Kumànovics *et al.*, 2006).

L'analyse de l'expression du gène LbZipD a mis en évidence qu'elle **était constitutive** quelle que soit la condition testée. Particulièrement, la carence ou l'excès de zinc et d'autres ETM ne semble pas avoir d'effet sur le niveau de transcrits de ce gène. Sa régulation, s'il y en a une, est peut-être influencée par

d'autres facteurs comme le stress, démontré pour ScYke4, orthologue de LbZipD chez la levure (Kumànovics *et al.*, 2006). Cependant, au niveau « tissulaire », le gène LbZipD est fortement exprimé dans le carpophore par rapport au mycélium ou à la mycorhize, ce qui suggérerait une fonction particulière dans ce « tissu ».

- *Des tests de localisation in situ pourraient permettre de vérifier cette hypothèse.*

Les différents **tests de complémentation réalisés n'ont pas permis de mettre en évidence les ETM transportés par la protéine LbZIPD**. En effet, les souches mutantes de levures utilisées dans cette étude ne sont pas adaptées pour la caractérisation d'un transporteur putatif de zinc localisé à la membrane du réticulum endoplasmique. Cependant, la surexpression de la protéine LbZIPD chez la levure sauvage semble augmenter la sensibilité de celle-ci au cadmium et au cobalt. Or, une partie de la synthèse protéique cellulaire est réalisée dans le réticulum endoplasmique. Il est alors possible que **la surexpression de la protéine LbZIPD appauvrisse le réticulum endoplasmique en un élément nécessaire aux mécanismes de tolérance au stress induit par la présence de cadmium ou de cobalt**. Par exemple, certaines enzymes permettant la résistance au stress oxydatif, les superoxyde-dismutases, ont besoin de cofacteurs comme le zinc, le cuivre ou le manganèse pour être fonctionnelles (Bellion *et al.*, 2006).

- *L'utilisation d'un mutant de levures approprié permettrait d'approfondir la caractérisation de cette protéine.*

En ce qui concerne les protéines LbZIPA et LbZIPB, l'analyse phylogénétique montre que celles-ci sont très proches de ScZRT1 et ScZRT2, des transporteurs respectivement de forte et faible affinités pour le zinc localisés au niveau de la membrane plasmique chez la levure (Zhao & Eide, 1996a ; Zhao & Eide, 1996b). La topologie de ces deux protéines est également très proche du modèle décrit par Eide (2006) notamment avec des domaines riches en histidine localisées entre les domaines transmembranaires III & IV. Ces deux gènes, LbZipA et LbZipB, présentent également une forte similarité, leurs organisations géniques étant identiques et leurs séquences nucléotidiques présentant 77 % d'identité.

L'analyse de l'expression des **gènes LbZipA et B** a montré qu'ils **sont fortement régulés par le taux de zinc intracellulaire**. Le gène LbZipA a une réponse au zinc beaucoup plus importante que le gène LbZipB. En effet, la présence de zinc dans le milieu extracellulaire, même à faible concentration (< à 0,5 μM), inhibe fortement l'expression de ce gène par rapport à celle du gène LbZipB, inhibée par des concentrations supérieures à 1 μM . Une première hypothèse était alors que **LbZIPA serait un transporteur de forte affinité pour le zinc alors que LbZIPB serait de faible affinité**. Des systèmes d'absorption du zinc de faible et forte

affinités ont déjà été décrits chez d'autres champignons. En effet, *Saccharomyces cerevisiae* possède deux transporteurs : ScZRT1 de forte affinité pour le zinc et ScZRT2 de faible affinité (Zhao & Eide, 1996a ; Zhao & Eide, 1996b). Ce système à deux niveaux d'affinité est également retrouvé chez *Neurospora crassa* et *Aspergillus fumigatus*, deux champignons filamenteux dont des membres de la famille ZIP ont déjà été caractérisés. Ainsi, NcTzn1 et AfZrfA sont les orthologues de ScZrt1 tandis que NcTzn2 et AfZrfB sont les orthologues de ScZrt2 (Vicentefranqueira *et al.*, 2005 ; Kiranmayi *et al.*, 2009).

- Des tests de mesure d'absorption d'un isotope stable du zinc permettraient de confirmer cette hypothèse sur l'affinité de ces transporteurs.

De plus, **l'expression des gènes LbZipA et B est induite en condition de carence en zinc et réprimée en condition d'excès**. Cette régulation des gènes Zips par le zinc intracellulaire a déjà été observée chez la levure pour ScZrt1, ScZrt2 et ScZrt3 (Zhao & Eide, 1996a ; Zhao & Eide, 1996b ; MacDiarmid *et al.*, 2000) ; chez *A. fumigatus* pour AfZrfA, AfZrfB et AfZrfC (Vicentefranqueira *et al.*, 2005 ; Amich *et al.*, 2010) ; et chez *N. crassa* pour NcTzn1 et NcTzn2 (Kiranmayi *et al.*, 2009). Chez la levure, cette régulation de la transcription requiert l'activité du gène ScZap1. **La protéine ScZAP1** de 93 kDa est **un activateur de transcription** avec une structure en doigt de zinc qui **contrôle directement l'expression des gènes sensibles au zinc dans la levure** (Zhao & Eide, 1997). En condition de carence en zinc, le facteur de transcription ScZAP1 reconnaît des séquences particulières des promoteurs des gènes cibles, appelées **motifs ZRE pour « Zinc Responsive Elements »**, s'y fixe et permet ainsi la transcription de ces gènes cibles. La séquence type de ce motif ZRE est 5'-ACCYYNAAGGT-3', le Y correspondant à une base C ou T, et le N pouvant être n'importe quelle base nucléotidique (Zhao *et al.*, 1998). Ce facteur de transcription ZAP1 active un régulon constitué de plus d'une cinquantaine de gènes dont ScZap1, ScZrt1, ScZrt2 et ScZrt3 (Wu *et al.*, 2008). La protéine ZAP1 possède deux domaines particuliers, nommés AD1 et AD2 pour « *Activation Domain* », riches en cystéine et histidine qui pourraient se lier aux ions Zn^{2+} et permettre l'activation de ce facteur de transcription (Frey & Eide, 2011). Des motifs 5'-CAAGGT-3' ressemblant à l'extrémité 3' des motifs ZRE de la levure ont également été identifiés chez *A. fumigatus* dans la séquence des promoteurs des gènes AfZrfA, AfZrfB, AfZrfC et d'un gène nommé AfZafA (Moreno *et al.*, 2007). Ce gène, nommé **AfZafA pour « Zinc-responsive Activating Factor »**, code la protéine AfZAFA qui est un **orthologue de ScZAP1**. En effet, la protéine AfZAFA peut remplacer fonctionnellement ScZAP1 chez la levure. De plus, l'expression du gène AfZafA est induite en condition de carence en zinc et réprimée en condition d'excès, tout comme ScZap1 (Moreno *et al.*, 2007).

- Il serait alors intéressant de rechercher l'équivalent des motifs ZRE dans les séquences promotrices des gènes LbZips ainsi que de rechercher et étudier le facteur transcriptionnel équivalent à ScZAP1 et AfZAFA chez *L. bicolor*.

Enfin, la régulation de l'expression des gènes LbZipA et B par d'autres ETM que le zinc a été analysée car il a été montré que certains membres de la famille Zip sont régulés par d'autres ETM. En effet,

l'expression des gènes AfZrfA et AfZrfB est inhibée par le cadmium en plus du zinc (Vicentefranqueira *et al.*, 2005). De plus, l'expression du gène AtIrt1 est régulée négativement par la présence de fer dans le milieu (Eide, 2006). **Le gène LbZipA semble régulé négativement en présence de cobalt** en concentration sublétales dans le milieu. La protéine LbZIPA pourrait permettre de transporter également le cobalt. Or, les tests de complémentation effectués dans la souche de levures sauvage ont permis de montrer que la protéine LbZIPA ne transporte pas le cobalt. Cependant, cet élément peut interagir avec les ions Zn^{2+} et Mg^{2+} et modifier ainsi l'homéostasie du zinc dans la cellule (Ortega *et al.*, 2009). Il est alors possible que **l'effet observé sur le niveau d'expression du gène LbZipA soit un effet indirect**. De plus, de fortes concentrations (à IC50) de fer semblent avoir également un effet inhibiteur sur l'expression des gènes LbZipA et B. Cependant, les homéostasies au cuivre, au fer et au zinc sont intimement liées, ce qui implique qu'un **excès d'un élément dans la cellule peut modifier l'homéostasie métallique** et par exemple **déplacer l'affinité de certaines protéines pour un élément donné** (Rutherford & Bird, 2004 ; Waldron *et al.*, 2009). Cet excès d'ETM dans la cellule peut ainsi conduire à une baisse du niveau de zinc intracellulaire et **mimer ainsi les effets d'une carence**. De même, l'expression du gène LbZipA semble réprimée en présence de cadmium à des concentrations toxiques pour la cellule. Or, les ions cadmium Cd^{2+} sont proches chimiquement des ions Zn^{2+} mais ne peuvent les remplacer de façon fonctionnelle comme cofacteurs d'enzymes (Gitan *et al.*, 1998). Enfin, la répression de la transcription des gènes LbZipA et B observée en présence d'ETM à des concentrations toxiques (à IC50) pourrait également être contrôlée par des facteurs indirects comme le stress. En effet, il a été montré que chez la levure, le domaine AD2 permettant l'activation du facteur de transcription ScZAP1, est activé par une situation de carence en zinc couplée à une situation de stress comme un choc thermique (Frey & Eide, 2011).

Les protéines LbZIPA et LbZIPB semblent toutes les deux **localisées au niveau de la membrane plasmique** et pourraient toutes les deux être **impliquées dans l'absorption du zinc dans les hyphes**. Ce seraient donc les premiers orthologues caractérisés chez un champignon mycorhizien de ScZRT1 et ScZRT2 chez la levure, ou de AfZRFa et AfZRFB chez *A. fumigatus*, ou de NcTZN1 et NcTZN2 de *N. crassa*, les transporteurs de forte et faible affinités impliqués dans l'absorption du zinc chez ces organismes.

- *Il serait maintenant intéressant de confirmer ceci en réalisant une localisation in situ de ces protéines ZIPs chez Laccaria bicolor.*

Les protéines LbZIPA et LbZIPB semblent également **régulées au niveau post-traductionnel** par un mécanisme proche de celui mis en évidence chez *S. cerevisiae* ou *A. thaliana*. En effet, en cas d'excès de zinc dans la cellule, l'ubiquitine, une protéine signal permettant la dégradation d'autres protéines se fixe sur les transporteurs ScZrt1 ou AtIrt1 sur des sites de liaisons spécifiques situés entre les domaines transmembranaires III et IV. Ces transporteurs couplés à l'ubiquitine sont ensuite transportés par

endocytose jusqu'à la vacuole pour y être dégradés (Gitan *et al.*, 1998 ; Gitan & Eide, 2000 ; Kerkeb *et al.*, 2008). Ce système permet de **limiter rapidement l'entrée de zinc dans la cellule en cas d'excès**. Or, dans le cas des protéines LbZIPA et B, de très faibles concentrations de zinc dans le milieu de culture des levures semble modifier la localisation du signal GFP vers de petites vésicules d'endocytose.

- *Il serait alors intéressant de mettre en évidence, dans la séquence de ces transporteurs, le motif qui serait reconnu par l'ubiquitine.*

En effet, des essais de mutagenèse dirigée ont été réalisés en modifiant des acides aminés potentiellement impliqués dans la signalisation de la dégradation. Ces acides aminés ont été ciblés par comparaison de séquence avec **les protéines ScZRT1 et AtIRT1**, pour lesquelles **une sérine et une lysine clés** avaient été identifiées entre les domaines transmembranaires III et IV (Gitan *et al.*, 2003 ; Kerkeb *et al.*, 2008). Cependant, **ces deux acides aminés ne semblent pas impliqués dans la dégradation des protéines ZIPA et ZIPB de *L. bicolor***.

La complémentation fonctionnelle en levures a permis de confirmer la fonction de transporteurs de ces protéines LbZIPs et a permis de mettre en évidence les différents ETM pris en charge par ces transporteurs.

En effet, la complémentation de la souche mutante *Zrt1-Zrt2Δ*, déficiente en absorption du zinc, a permis de mettre en évidence que les protéines **LbZIPA et LbZIPB sont des transporteurs impliqués dans l'absorption du zinc**. De plus, l'hypothèse sur l'affinité de ces deux transporteurs pour le zinc est renforcée par les données issues de la comparaison de l'accumulation du zinc intracellulaire chez la souche mutante surexprimant la protéine LbZIPA ou LbZIPB. Ainsi, **LbZIPA serait le transporteur de forte affinité pour le zinc et LbZIPB le transporteur de faible affinité**.

- *Des mesures de cinétique d'absorption d'un isotope stable du zinc permettraient de la confirmer.*

La **protéine LbZIPA** pourrait également permettre **l'absorption du cuivre** et la **protéine LbZIPB** pourrait être impliquée dans **l'absorption du cuivre, du cadmium et du cobalt**.

- *Des expériences de compétition entre l'absorption d'un isotope stable du zinc et d'autres ETM permettraient de confirmer ces hypothèses.*

En ce qui concerne la **protéine LbZIPC**, l'analyse phylogénétique montre **la présence de deux domaines riches en histidine** entre les domaines transmembranaires V & VI, et **VII & VIII**. La présence d'un domaine riche en histidine entre les domaines transmembranaires VII et VIII a déjà été **décrit pour la protéine ScZRT3 chez la levure** (MacDiarmid *et al.*, 2000). Ce domaine pourrait alors être déterminant dans

la localisation subcellulaire de la protéine. Or la localisation subcellulaire de **la protéine LbZIPC** par fusion GFP a révélé qu'elle serait **localisée au niveau de la membrane de la vacuole** et non au niveau de la membrane plasmique comme initialement supposé. Cette localisation à la vacuole est plutôt inattendue et suggère que **les analyses bioinformatiques et phylogénétiques ne sont pas suffisantes pour déterminer la fonction d'un gène**. De plus, l'expression du gène LbZipC est inhibée par la présence d'un excès de zinc intracellulaire tout comme le gène ScZrt3 (MacDiarmid *et al.*, 2000). La protéine LbZIPC est donc probablement plutôt un orthologue de ScZRT3, **le transporteur vacuolaire permettant la remobilisation du zinc** chez la levure, que de ScZRT1 ou ScZRT2.

La complémentation de la souche de levures mutante *Zrt3Δ*, incapable de remobiliser le zinc depuis la vacuole, a permis de confirmer cette hypothèse. La protéine **LbZIPC serait ainsi un transporteur localisé à la membrane vacuolaire et impliqué dans la remobilisation du zinc en cas de carence**. De plus, la surexpression du gène LbZipC dans la levure sauvage induit une sensibilité accrue au cadmium et au cobalt de cette souche. Il est alors possible que **le transporteur LbZIPC contribue à la remobilisation du cadmium et du cobalt (stockés dans la vacuole pour détoxifier la cellule) vers le cytoplasme**.

Ce serait la première fois qu'un orthologue de ScZRT3 serait identifié chez un Basidiomycète. Certains champignons sont en effet capables de stocker le zinc dans leurs vacuoles et auraient ainsi besoin d'un transporteur permettant de le remobiliser. Par exemple, certaines souches de *Suillus bovinus* stockent préférentiellement le zinc dans les vacuoles (Colpaert *et al.*, 2011). De même, le zinc est stocké dans les vacuoles de *Suillus luteus* lors de l'association symbiotique avec *Pinus sylvestris* (Turnau *et al.*, 2002). Chez la levure, cet élément peut être stocké soit dans les vacuoles, soit dans de petites vésicules appelées zincosomes (Eide, 2006). De petites vésicules de stockage du zinc ont également été identifiées chez le champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum* (Blaudez & Chalot, 2011).

➤ *Il serait alors intéressant de vérifier dans quel organite le zinc est stocké chez L. bicolor.*

Des essais de localisation *in situ* du zinc intracellulaire ont été réalisés chez *L. bicolor* au laboratoire par marquage du zinc avec un fluorochrome, la zinquin, et en collaboration avec Pierre-Emmanuel Courty de l'université de Bâle, par cryo-fixation à haute pression des hyphes et observation du zinc aux rayons X. Cependant, ces essais n'ont pas permis de déterminer la localisation de cet élément au sein des cellules fongiques.

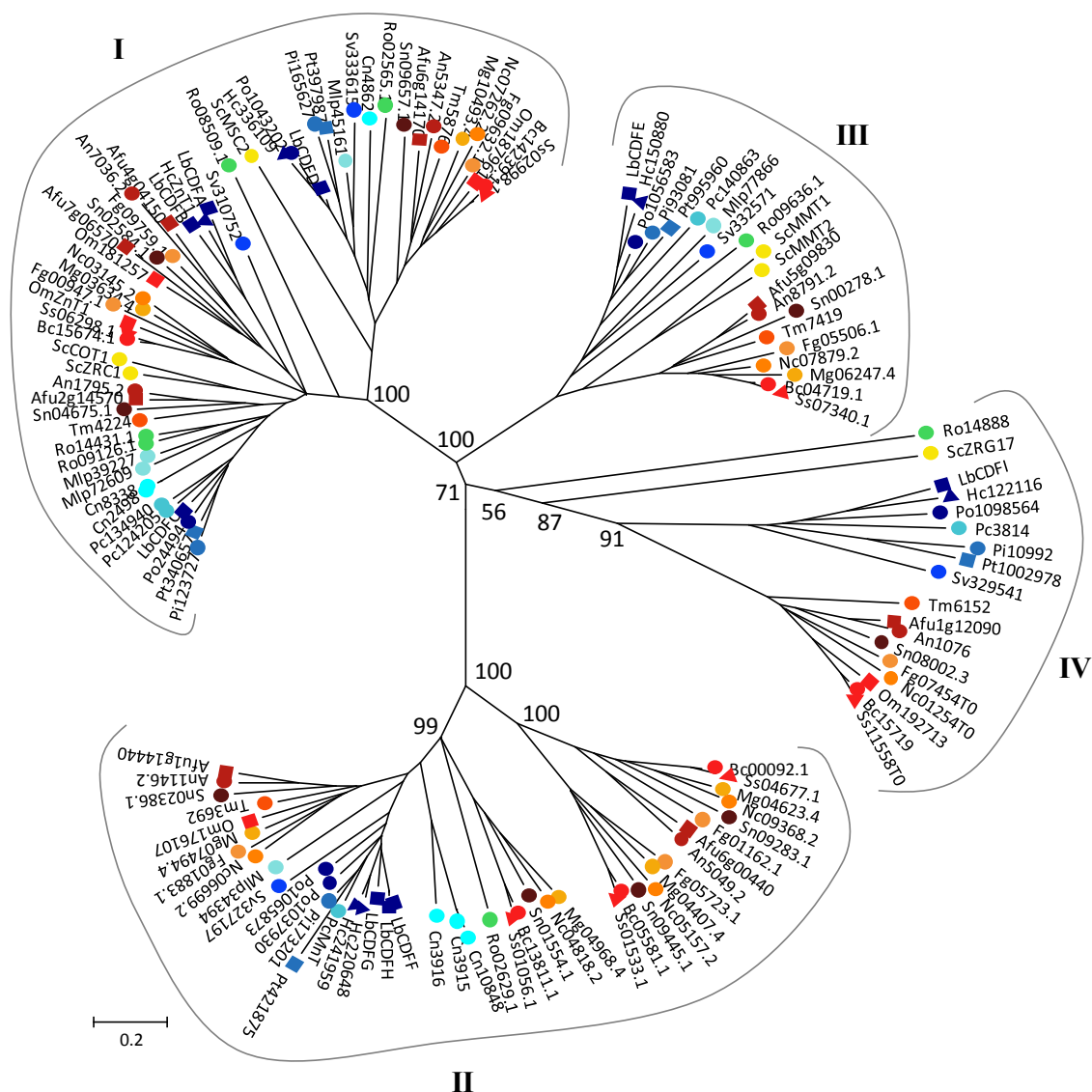


Figure 80 : Arbre phylogénétique des protéines de la famille CDF de 21 organismes fongiques.

Basidiomycètes : *Cryptococcus neoformans* (Cn), *Hebeloma cylindrosporum* (Hc), *Laccaria bicolor* (Lb), *Melampsora larici-populina* (Mlp), *Phanerochaete chrysosporium* (Pc), *Paxillus involutus* (Pi), *Pleurotus ostreatus* (Po), *Pisolithus tinctorius* (Pt), *Sebacina vermifera* (Sv), Ascomycètes : *Aspergillus fumigatus* (Afu), *Aspergillus nidulans* (An), *Botrytis cinerea* (Bc), *Fusarium graminearum* (Fg), *Magnaporthe grisea* (Mg), *Neurospora crassa* (Nc), *Oidiodendron maius* (Om), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Stagonospora nodorum* (Sn), *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss), *Tuber melanosporum* (Tm) ; Zygomycètes : *Rhizopus oryzae* (Ro). L'arbre a été généré en utilisant le logiciel MEGA 4.1 d'après la méthode *Neighbor-Joining* (NJ) après l'alignement des séquences avec CLUSTALW, les valeurs de *bootstraps* (>50) ont été calculées à partir de 1000 répétitions et sont notées uniquement aux principaux embranchements.

Tableau XLII : Informations génomiques des protéines LbCDFs³⁸

Nom	Nom du gène sur le site du JGI ^{xviii}	n° de la protéine	Localisation génomique	Brin
LbCDFA	Lacbi1.eu2.Lbscf0002g03750	305317	LG_10:1878728-1880533	+
LbCDFB	Lacbi1.eu2.Lbscf0038g00260	307944	scaffold_16:459932-461796	+
LbCDFC	estExt_Genewise1Plus.C_LG_1_t90347	625478	LG_1:4758628-4761025	-
LbCDFD	Lacbi1.estExt_GeneWisePlus_worm.C_220012	191080	scaffold_13:1232324-1234309	-
LbCDFE	Lacbi1.e_gwh1.10.327.1	234505	LG_9:1290754-1292158	+
LbCDFF	Lacbi1.e_gww1.2.941.1	244654	LG_10:2075347-2077126	-
LbCDFG	Lacbi1e_gww1.1.466.1	681521	LG_1:6137178-6139357	+
LbCDFH	Lacbi1.e_gww1.75.46.1	256277	LG_8:959099-960876	+
LbCDFI	Lacbi1e_gww1.9.136.1	248983	scaffold_9:322297-324074	-

³⁸ <http://genome.jgi-psf.org/Lacbi2/Lacbi2.home.html>

3.4. Les protéines CDF

Afin de mieux comprendre les mécanismes de séquestration des ETM dans les hyphes des champignons mycorhiziens, nous nous sommes intéressés à la famille de protéines CDF (*Cation Diffusion Facilitator*), largement répandue chez les eucaryotes, impliquée dans le transport des ETM dans les organites intracellulaires ou à l'extérieur de la cellule (Montanini *et al.*, 2007). Plusieurs membres de cette famille ont été caractérisés chez les plantes et sont souvent reportés comme impliqués dans la tolérance aux ETM, d'où leur nom, MTP, pour « *Metal Tolerance Protein* » (Persans *et al.*, 2001 ; Blaudez *et al.*, 2003 ; Montanini *et al.*, 2007 ; Shahzad *et al.*, 2012). Cependant, cette famille de protéines est encore mal connue chez les champignons mycorhiziens. Seuls trois transporteurs CDF ont été caractérisés à ce jour, un chez le champignon endomycorhizien *Glomus intraradices*, GintZNT1 (Gonzalez-Guerrero *et al.*, 2005), un chez le champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum*, HcZNT1 (Blaudez & Chalot, 2011), et un chez le champignon éricoïde *Oidiodendron maius*, OmZNT1, pour lequel j'ai participé au travail de caractérisation lors de ma thèse (Khouja *et al.*, 2013).

3.4.1. Etude phylogénétique et analyse des séquences des transporteurs

L'étude phylogénétique est basée sur les séquences protéiques appartenant à la famille CDF des 21 organismes fongiques déjà utilisés pour la constitution de l'arbre phylogénétique de la famille ZIP.

Les séquences ont été obtenues par BLAST en utilisant les séquences des protéines CDF déjà identifiées comme matrices sur les bases de données de référence de chacune de ces espèces. Les séquences incomplètes ont été corrigées manuellement par homologie avec les séquences déjà caractérisées, notamment celle de *S. cerevisiae*. Les informations génomiques des protéines LbCDFs sont données dans le tableau XLII.

L'analyse phylogénétique de cette famille révèle **la présence de quatre sous-familles, numérotées de I à IV** (Figure 80). Ces **subdivisions seraient notamment dues au substrat préférentiel du transporteur** (Montanini *et al.*, 2007) : les protéines transportant spécifiquement du zinc (sous-famille I), du manganèse (sous-famille II), du fer et du zinc (sous-famille III), et le cluster incluant ScZRG17 (sous-famille IV).

3.4.1.1. Sous-famille I : transporteurs putatifs de zinc

A l'intérieur de la sous-famille I, deux clusters ont pu être identifiés. **Le premier cluster**, plus important en nombre de membres, comprend les représentants de **ScZRC1** (Kamizono *et al.*, 1989) et **ScCOT1** (Conklin *et al.*, 1992) de la levure déjà caractérisés ainsi que OmZnT1, caractérisé chez le champignon éricoïde, *O. maius* (Khouja *et al.*, 2013). **La protéine LbCDFC** de *Laccaria bicolor* semble être un

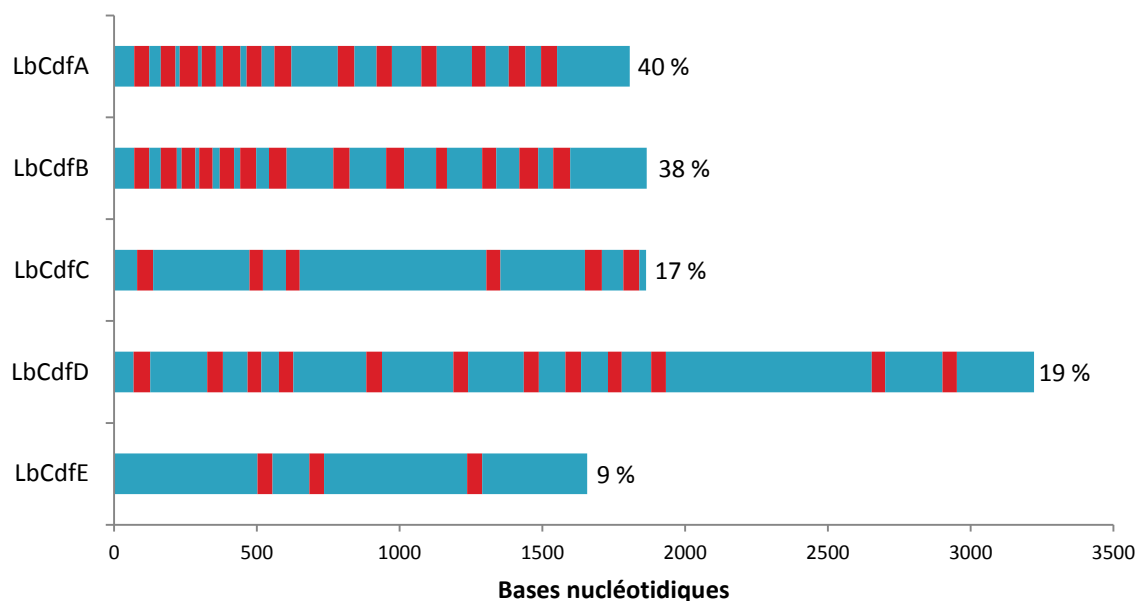


Figure 81 : Organisation des introns et exons dans les gènes LbCdfs étudiés (d'après Molins, 2007 ; Doillon, 2010). Les introns et exons de chaque gène sont représentés respectivement en rouge et en bleu. Le pourcentage d'intron de chaque gène est inscrit en vis-à-vis du nom du gène correspondant.

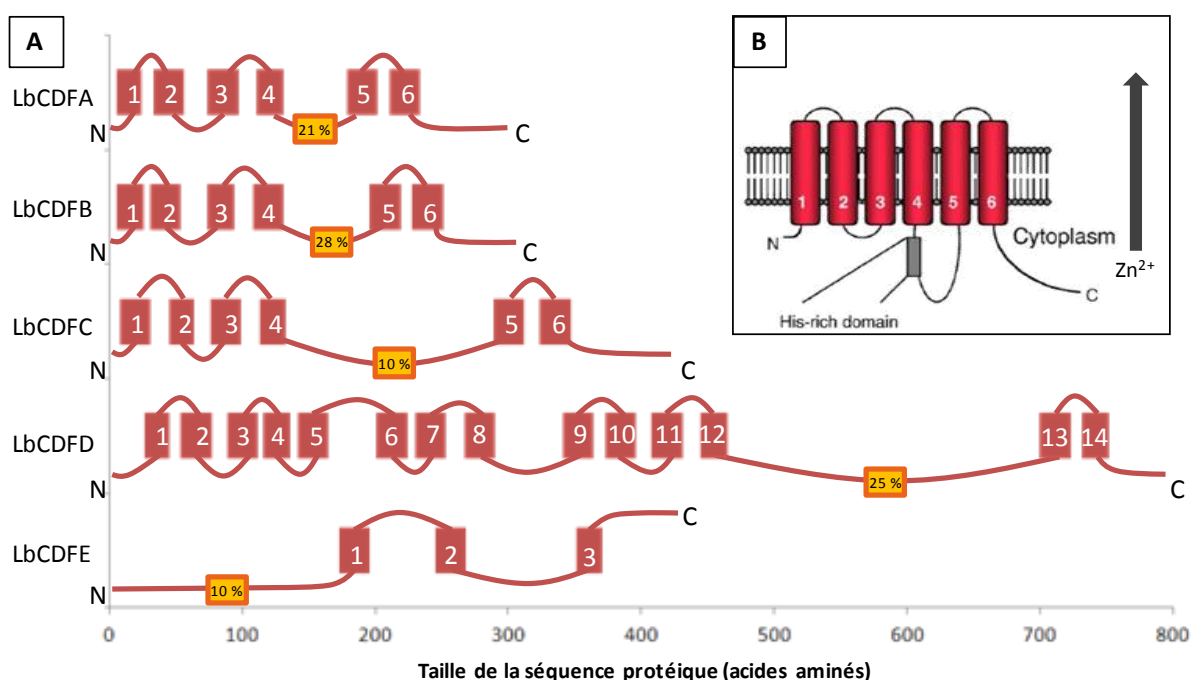


Figure 82 : A : Prédiction de la topologie des protéines CDF étudiées de *Laccaria bicolor*. Les domaines transmembranaires (DTM) sont représentés par les rectangles rouges ; les parties intracellulaires et extracellulaires sont représentées par des boucles, celles situées à l'extérieur de la cellule ou dans les compartiments intracellulaires sont au dessus des DTM et celles présentes dans le cytosol sont en dessous des DTM. Les segments représentés par des rectangles orange présentent une richesse relative en histidine, si le pourcentage d'histidine (valeur donnée dans le rectangle) du segment considéré dépasse celui de la séquence totale d'au moins 10 % alors il y a un enrichissement notable.

B : Topologie des protéines appartenant à la famille CDF (Eide, 2006)

orthologue de ces deux protéines et est regroupé dans le même cluster. **Les protéines LbCDFA et B** de *L. bicolor* sont aussi présentes dans ce cluster mais semblent plus éloignées phylogénétiquement de ScZRC1 et ScCOT1. Ces deux protéines semblent très proches de HcZnT1, un transporteur impliqué dans la tolérance au zinc permettant l'import de cet élément dans le réticulum endoplasmique chez *Hebeloma cylindrosporum* (Blaudez & Chalot, 2011).

Le second cluster comprend des protéines dont la séquence est plus longue que celles du premier cluster décrit ci-dessus. Ce cluster comprend un transporteur de zinc de la famille CDF caractérisé chez la levure, **ScMSC2**, localisé au niveau de la membrane nucléaire et du réticulum endoplasmique (Li & Kaplan, 2001). La protéine **LbCDFS** fait également partie de ce cluster.

Quatre protéines CDFs de *L. bicolor* sont ainsi présentes dans cette sous-famille I ce qui représente une protéine supplémentaire par rapport à *C. neoformans* (Tremellomycètes) et *M. larici-populina* (Urediniomycètes), et deux protéines supplémentaires par rapport aux autres Agaricomycètes (*H. cylindrosporum*, *P. chrysosporium*, *P. involutus*, *P. ostreatus*, *P. tinctorius*, *S. vermifera*). **Les protéines LbCDFA et B**, très proches phylogénétiquement, pourraient alors être **issues d'un évènement de duplication-spéciation** (Martin *et al.*, 2008).

La présence dans cette sous-famille I de plusieurs transporteurs caractérisés **prenant en charge préférentiellement le zinc** suggère que les autres protéines qui en font partie sont également capables de transporter cet élément. Il est également possible que les protéines LbCDFA, B, C ou D soient capables de prendre en charge d'autres métaux comme le cobalt ou le cadmium comme cela a déjà été montré pour ScCOT1 (Conklin *et al.*, 1992).

3.4.1.2. Sous-famille II : transporteurs putatifs de manganèse

La sous-famille II (transporteurs de manganèse) contient trois transporteurs putatifs chez *Laccaria bicolor*, LbCDFF, G et H, soit un à deux protéines de plus que chez les autres Agaricomycètes. Mais celle-ci ne contient aucun orthologue chez *S. cerevisiae*, en revanche certains Saccharomycetales comme *Candida* en contiennent. Ceci laisse supposer que les levures ont perdu le gène au cours de l'évolution et que des évènements de duplication auraient eu lieu chez les champignons filamenteux. Les transporteurs caractérisés de ce groupe ont été en mesure d'augmenter la tolérance de la souche de levures *Pmr1Δ* même à de fortes concentrations de manganèse, mais n'améliorent pas la croissance des souches hypersensibles aux autres métaux. Ces transporteurs auraient donc une implication spécifique dans l'homéostasie ou la tolérance au manganèse (Peiter *et al.*, 2007). Récemment, **un transporteur de manganèse, PcMnT**, appartenant à cette sous-famille a été caractérisé **chez *Phanerochaete chrysosporium***, un champignon saprophyte de pourriture blanche (Diss *et al.*, 2011).

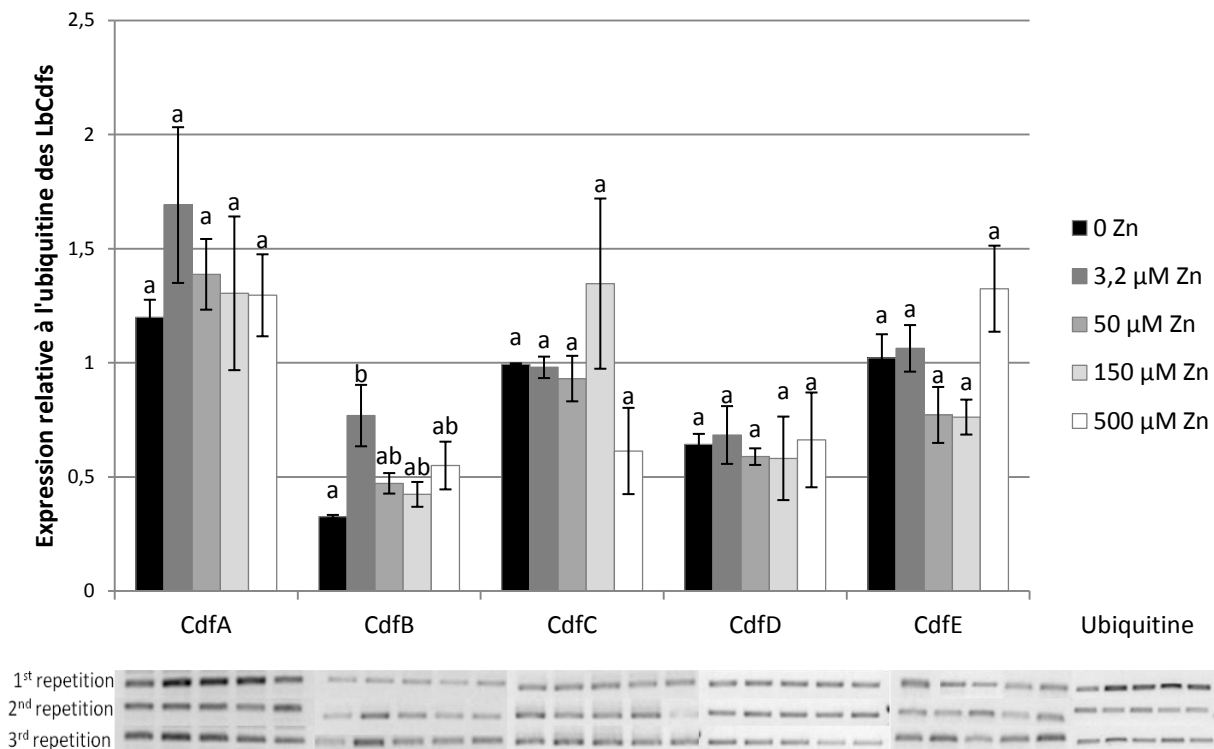


Figure 83 : Régulation de la transcription des gènes LbCdFs par le zinc intracellulaire. La souche de *Laccaria bicolor* S238N-H82 a été cultivée une semaine en milieu Pachlewski liquide contenant différentes concentrations en zinc. Les barres représentent les erreurs standards sur 3 répétitions. Les lettres différentes représentent les différences significatives à $p < 0.05$.

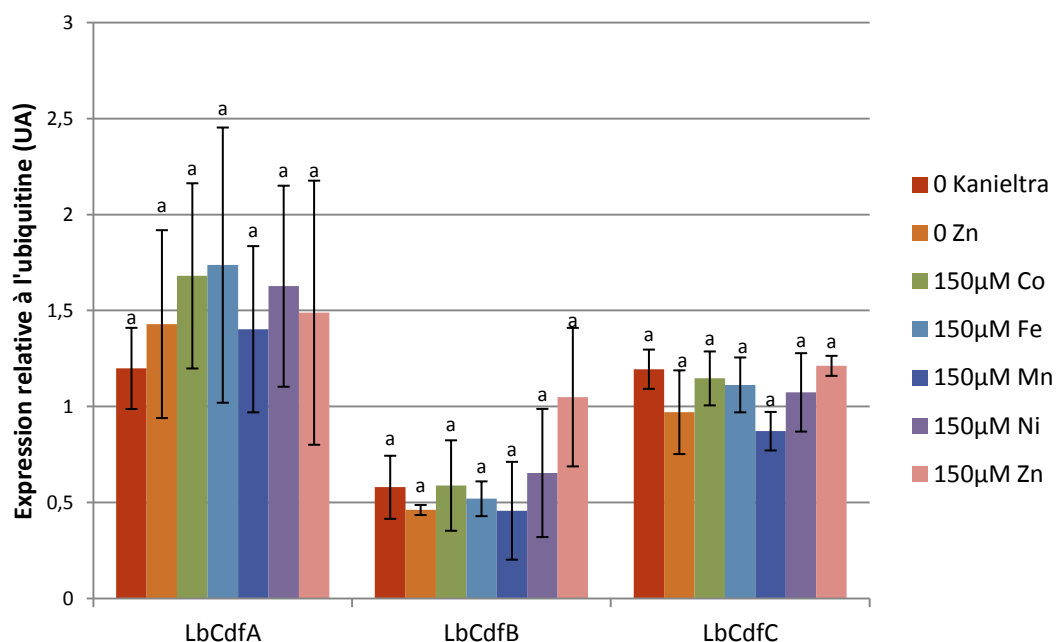


Figure 84 : Régulation de la transcription des gènes LbCdFs par différents métaux. La souche de *Laccaria bicolor* S238N-H82 a été cultivée une semaine en milieu Pachlewski liquide contenant différents métaux (Co, Fe, Mn, Ni et Zn) à une concentration de 150 µM. Les conditions sans zinc (0 Zn) et sans micro-éléments (0 Kanieltra) servent de contrôle. Les barres représentent les erreurs standards sur 3 répétitions. Les lettres différentes représentent les différences significatives à $p < 0.05$.

3.4.1.3. Sous-famille III : transporteurs putatifs de fer et de zinc

La sous-famille III comprend **deux transporteurs de fer et de zinc** chez la levure, **ScMMT1 et ScMMT2** (Li & Kaplan, 1997) localisés au niveau de la membrane de la mitochondrie. Cependant, les autres organismes étudiés possèdent seulement un orthologue de ces deux transporteurs. Un phénomène de spéciation/duplication a pu apparaître chez la levure. **La protéine LbCDFE** de *L.bicolor* fait partie de cette famille ce qui suggère qu'il pourrait lui aussi être impliqué dans l'influx de fer et zinc vers les mitochondries.

3.4.1.4. Sous-famille IV : transporteurs proches de ScZRG17

La sous-famille IV comprend un membre de la famille CDF caractérisé chez la levure, **ScZRG17, localisé au niveau du réticulum endoplasmique** (Ellis *et al.*, 2005). Chaque autre organisme étudié possède un **orthologue** de ce transporteur, nommé **LbCDFI** chez *L. bicolor*.

Les gènes CdfA, B, C, D et E de *Laccaria bicolor* ont été étudiés préférentiellement car ce sont des transporteurs putatifs de zinc. Ces gènes ont été clonés et leurs séquences vérifiées lors du stage de master d'H. Molins (Molins, 2007) et de la thèse de D. Doillon (Doillon, 2010). La spécificité des amorces pour l'étude de l'expression de ces gènes a donc été vérifiée en utilisant les différents gènes LbCdfs clonés comme matrice pour la PCR.

3.4.1.5. Etude de la structure des gènes LbCdfs étudiés

La structure des gènes LbCdfs est présentée dans la figure 81. **Les introns occupent une proportion forte dans les gènes LbCdfA et LbCdfB, respectivement 40 et 38 %** de l'ADN génomique, une proportion plus faible dans les gènes LbCdfC et LbCdfD (17 et 19 %), et une proportion très faible dans le gène LbCdfE (9 %). Les séquences des gènes LbCdfA et LbCdfB présentent toutes deux 13 introns, contre 12 pour celle du gène LbCdfD, 6 pour celle du gène LbCdfC, et seulement 3 pour celle du gène LbCdfE. De plus, l'ordonnement des introns-exons à l'intérieur des **séquences de LbCdfA et LbCdfB est très similaire**, ces deux gènes présentant **64 % d'identité** au niveau de leurs séquences nucléotidiques.

3.4.1.6. Etude de la topologie des protéines LbCDFs étudiées

L'étude de la topologie des protéines CDF étudiées montre que celles-ci ont toutes leurs extrémités N-ter et C-ter situées dans le cytosol (Figure 82), excepté pour l'extrémité C-ter de LbCDFE. Les trois

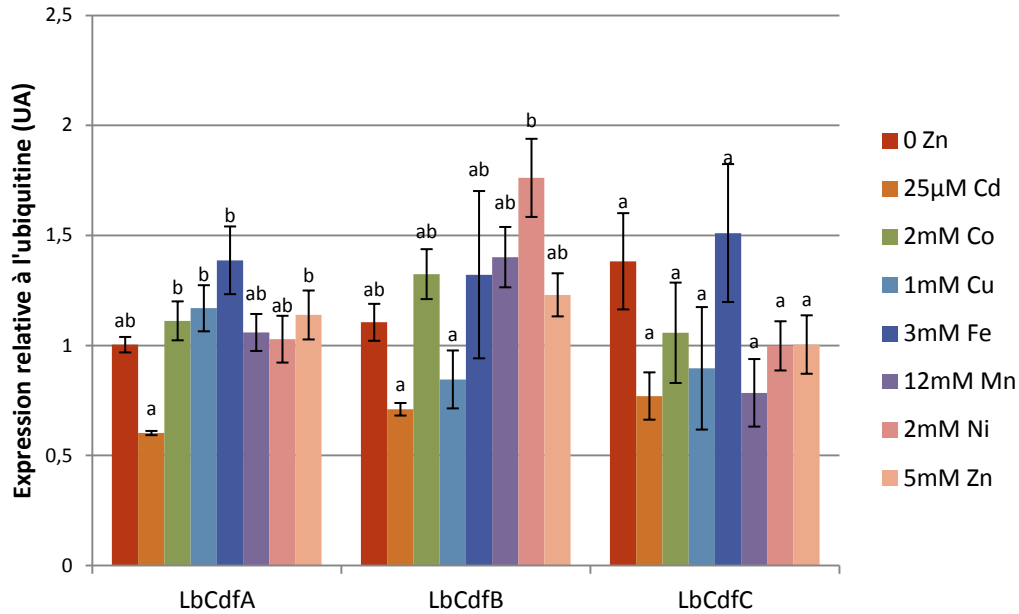


Figure 85 : Régulation transcriptionnelle des gènes LbCdfs par différents métaux à la concentration inhibitrice à 50 % (IC50). La souche de *Laccaria bicolor* S238N-H82 a été cultivée une semaine en milieu Pachlewski liquide contenant différents métaux (Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni et Zn) aux différentes concentrations précisées dans la légende. Les conditions sans zinc (0 Zn) et sans micro-éléments (0 Kanieltra) servent de contrôle. Les barres représentent les erreurs standards sur 3 répétitions. Les lettres différentes représentent les différences significatives à $p < 0.05$.

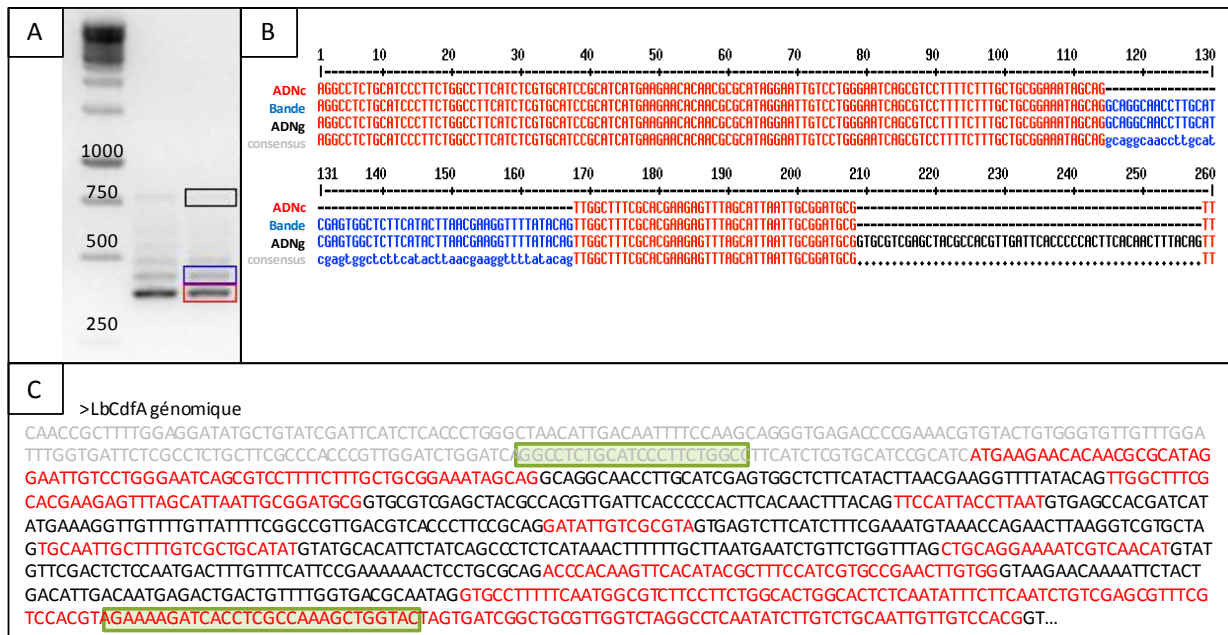


Figure 86 : Régulation de la transcription du gène LbCdfA par épissage alternatif.

A : Exemple de profil d'expression du gène LbCdfA. A gauche est représenté le marqueur de taille avec les tailles des bandes principales (en pb). A droite, les bandes correspondant à l'ADN complémentaire (ADNc), une séquence de taille intermédiaire (bande) et à l'ADN génomique (ADNg) sont respectivement entourées en rouge, bleu et noir. Ces bandes ont été isolées et séquencées.

B : Alignement des séquences des différentes bandes observées lors de l'étude de l'expression du gène LbCdfA. Les nucléotides sont représentés en rouge si identiques, en bleu si conservés dans au moins deux séquences et noirs si différents.

C : Emplacement des amorces de RT-PCR utilisées dans cette étude. La séquence 5'UTR est en gris, les exons en rouge et les introns en noir. L'emplacement des amorces est marqué par l'encadré vert.

protéines LbCDFA, LbCDFB, et LbCDFC possèdent six domaines transmembranaires avec une longue boucle riche en histidine entre les domaines transmembranaires IV et V, comme généralement observé chez les protéines CDFs (Eide, 2006). De plus, des protéines LbCDFA, B et C présentent des similitudes dans leurs séquences protéiques, excepté au niveau de leurs boucles intracytoplasmiques riches en histidine. **Les protéines LbCDFD et LbCDFE diffèrent des autres de par leur nombre de domaines transmembranaires (respectivement 14 et 3) et la localisation de leur boucle riche en histidine (respectivement entre les domaines transmembranaires XII et XIII et avant le domaine I).**

3.4.2. Etude de l'expression des gènes par RT-PCR semi-quantitative

L'expression des gènes Cdfs de *Laccaria bicolor* a été mesurée en réponse à différentes concentrations de zinc extracellulaire. Le mycélium est cultivé une semaine en milieu Pachlewski liquide contenant différentes concentrations en zinc caractéristiques d'un milieu carencé (sans Zn ajouté au milieu), en excès (50, 150 et 500 μM de Zn), ou en condition « normale » (3,2 μM de Zn, concentration habituelle du milieu). D'après la figure 83, **l'expression des gènes LbCdfA, C, D et E ne varie pas quelle que soit la quantité de zinc apportée dans le milieu**. L'expression du gène LbCdfB semble cependant légèrement plus faible en situation de carence en zinc que sur le milieu contrôle (3,2 μM de Zn). Quand la quantité de zinc extracellulaire augmente, l'expression du gène LbCdfB revient à un niveau plus basal.

La régulation de l'expression des gènes LbCdfA, B et C a ensuite été étudiée **en présence d'autres métaux (Co, Fe, Mn et Ni) à des concentrations sublétales**, comme décrit précédemment dans l'étude des gènes LbZips. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 84. **L'expression de ces trois gènes ne varie pas** quelle que soit la condition testée.

Les gènes LbCdfs étant potentiellement impliqués dans la tolérance aux ETM, la régulation de leur expression a également été observée en situation de **stress métallique**, en présence de plusieurs ETM (Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Zn) à des concentrations toxiques pour la cellule (IC_{50}) (Figure 85). **L'expression des gènes LbCdfA, B et C ne varie pas ou très peu** quelle que soit la condition testée.

Cependant, lors de cette étude, il est apparu **qu'une régulation du gène LbCdfA pourrait peut-être s'effectuer par épissage alternatif**. En effet, dans toutes les conditions testées, plusieurs bandes étaient visibles sur le gel, s'échelonnant de la taille attendue pour le fragment amplifié (381 pb) à la taille attendue de l'ADN génomique (771 pb) (Figure 86 (A)). Les différentes bandes ont alors été extraites et séquencées, les bandes intermédiaires correspondaient à l'ADNc amplifié avec un ou plusieurs introns non épissés (Figure 86 (B)). Des **résultats similaires** ont été observés **avec le gène LbCdfB** (résultat non présenté). L'intensité des bandes intermédiaires ne variant pas quelles que soit les conditions testées, seules les bandes correspondant à l'ADNc prédit ont été utilisées pour l'analyse de l'expression des gènes LbCdfA et B.

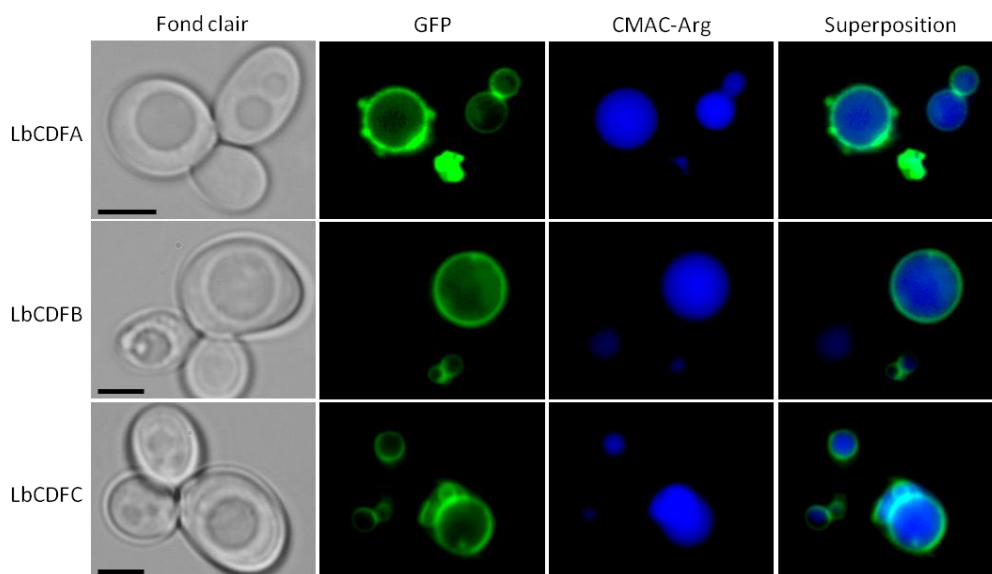


Figure 87 : Localisation subcellulaire des protéines LbCDFA, B et C dans des cellules de levures exprimant les gènes LbCdfA-GFP ou LbCdfB-GFP ou LbCdfC-GFP vues au microscope en lumière blanche ou en fluorescence (grossissement x1000) (d'après Doillon, 2010). Le CMAC-arg colore le lumen de la vacuole.

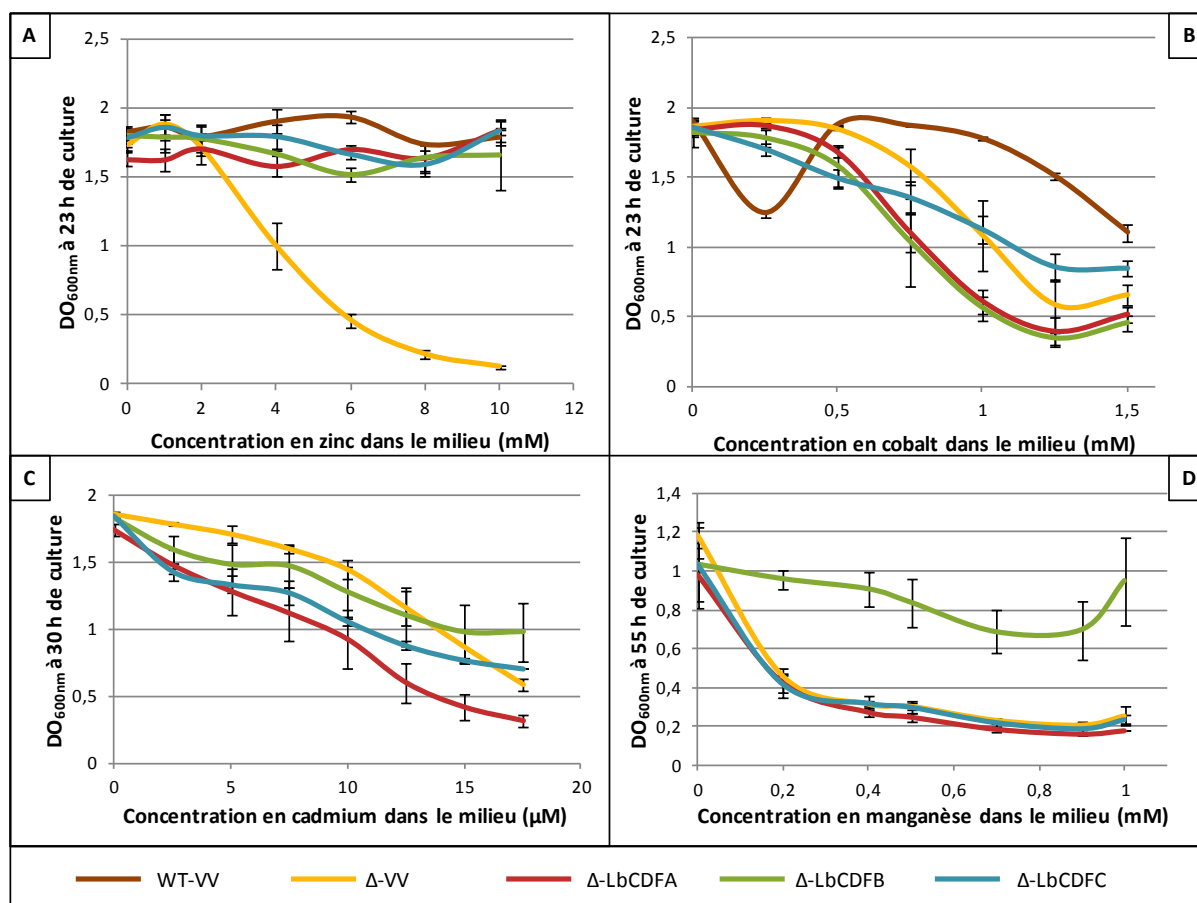


Figure 88 : Tests de complémentation en milieu liquide de souches de levures mutantes (Δ) sensibles au zinc (A : *Zrc1Δ*), au cobalt (B : *Cot1Δ*), au cadmium (C : *Ycf1Δ*) et au manganèse (D : *Pmr1Δ*), exprimant les gènes LbCdfA, LbCdfB, LbCdfC ou transformées avec le vecteur vide. Les densités optiques des cultures de levures ont été mesurées à 23, 30 ou 55 heures de croissance sur milieu SD-ura supplémenté de zinc, cobalt, cadmium ou manganèse aux concentrations données. Les barres représentent les écart-types ($n = 3$).

3.4.3. Localisation subcellulaire des protéines LbCDFA, B et C

Les protéines LbCDFA, LbCDFB et LbCDFC ont été clonées dans le vecteur d'expression pYES2 en fusion avec la GFP pour mettre en évidence leur localisation subcellulaire chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* par D. Doillon lors de sa thèse (Doillon, 2010). La figure 87 résume les résultats de localisation obtenus lors de son travail. **Les protéines LbCDFA, B et C sont localisées au niveau de la membrane vacuolaire et pourraient donc être impliquées dans la séquestration du zinc et d'autres ETM dans la vacuole.**

Afin de vérifier cette hypothèse, des tests de complémentation de levures mutantes sensibles aux ETM ont été réalisés.

3.4.4. Complémentation fonctionnelle en système hétérologue

Lors de son travail de thèse, D. Doillon a pu mettre en évidence grâce à un test en gouttes en milieu solide que **les protéines LbCDFA, B et C permettent de restaurer la croissance d'un mutant de levure sensible au zinc, *Zrc1Δ***. En utilisant d'autres mutants de levures sensibles au cadmium (*Ycf1Δ*), au cobalt (*Cot1Δ*), au fer (*Ccc1Δ*) et au manganèse (*Pmr1Δ*), il a également pu mettre en évidence que ces protéines seraient capables de prendre en charge d'autres métaux. En effet, **la protéine LbCDFB pourrait transporter le manganèse et le cadmium ; et la protéine LbCDFC le cadmium, le cobalt et le fer**, en plus du zinc (Doillon, 2010).

Afin de confirmer et d'affiner ces résultats, les mêmes tests de complémentation ont été réalisés en milieu liquide par suivi de DO avec l'aide de Julie Foulon, en CDD au laboratoire. Les principaux résultats obtenus sont présentés dans la figure 88. L'expression des gènes LbCdfA, B ou C chez la levure *Zrc1Δ*, sensible au zinc, permet bien de restaurer la croissance de cette souche. De même, les protéines LbCDFB et LbCDFC restaurent la croissance de la souche *Ycf1Δ*, sensible au cadmium, au traitement de 17,5 μ M de cadmium. La croissance de la souche *Cot1Δ*, sensible au cobalt, est également améliorée lorsqu'elle est transformée avec le vecteur contenant le gène LbCdfC au traitement de 1,5 mM de cobalt. Enfin, l'expression du gène LbCdfB permet d'améliorer la croissance de la souche *Pmr1Δ*, sensible au manganèse. Les résultats précédemment obtenus ont donc été confirmés.

3.4.5. Discussion

L'analyse phylogénétique de la famille CDF fait apparaître quatre sous-familles. Ces transporteurs peuvent être classés selon leur affinité pour un ou plusieurs métaux (Montanini *et al.*, 2007). Des membres

de la famille CDF de *Laccaria bicolor* sont retrouvés dans chacune des quatre sous-familles (quatre dans la sous-famille Zn-CDF, trois dans la sous-famille Mn-CDF, un dans la sous-famille Fe/Zn-CDF, et un dans la sous-famille ScZRG17). Avec **neuf membres appartenant à la famille CDF**, *Laccaria bicolor* est l'organisme étudié **le plus représenté dans cette étude**. Ce constat concorde avec **l'expansion du nombre de gènes** observée chez ce champignon (Martin *et al.*, 2008).

La **topologie des protéines LbCDFA, B et C est conforme à celle prédite par Eide (2006)**, à savoir six domaines transmembranaires, les extrémités N- et C-terminales localisées dans le cytoplasme et la présence d'une boucle riche en histidine (proportion > 10 %) située entre les domaines IV et V. En revanche, la topologie prédite de LbCDFE ne présente que trois domaines transmembranaires avec une boucle riche en histidine localisée à l'extrémité N-ter de la protéine. Il est alors possible que ce soit une erreur de prédiction du logiciel utilisé dans cette étude. Cependant, les protéines CDFs ne possèdent pas toujours six domaines transmembranaires, leur nombre peut en effet varier de trois à quinze (Montanini *et al.*, 2007). De plus, il a été montré chez la levure et chez l'homme que **des protéines CDFs peuvent s'associer en hétérodimères**, respectivement ScMSC2/ScZRG17, et ZnT5/ZnT6, afin de faciliter le transport du zinc vers le réticulum endoplasmique (Ellis *et al.*, 2005 ; Fukunaka *et al.*, 2009). De même, chez *Arabidopsis halleri*, des hétérodimères se formeraient entre les protéines AhMTP1-A2 et AhMTP1-B, C ou D, modifiant ainsi positivement ou négativement le niveau de tolérance au zinc de mutants de levures *Zrc1Δ-Cot1Δ* co-exprimant deux de ces transporteurs (Shahzad *et al.*, 2012). De plus, il a également montré chez le peuplier que la protéine PtMTP1 peut former **des homodimères** (Blaudez *et al.*, 2003). **Il est alors possible que la fonction de la protéine LbCDFE soit assurée par un homodimère LbCDFE-LbCDFE**. De même, la protéine LbCDFD posséderait quatorze domaines transmembranaires au lieu des six prédits par Eide (2006). Il a été montré chez d'autres protéines CDF que le nombre de domaines transmembranaires peut varier, par exemple, les transporteurs ZnT5 et ScMSC2 possèderaient respectivement quinze et douze domaines transmembranaires (Li & Kaplan, 2001 ; Kambe *et al.*, 2002).

L'expression des gènes CdfA, B, C, D et E de *L. bicolor* n'est pas régulée par la quantité de zinc extracellulaire ni par la présence d'autres métaux dans le milieu même en fortes concentrations (à l'IC50). Il a **déjà été reporté chez d'autres organismes** une expression constitutive des gènes Cdfs. Par exemple, l'expression du gène ZnT1 de *H. cylindrosporum*, qui code un transporteur de zinc localisé à la membrane du réticulum endoplasmique, ne varie pas quelle que soit la quantité de zinc apportée au milieu (de 0,3 à 3000 μ M) (Blaudez & Chalot, 2011). De même, chez le peuplier, l'expression du gène Mtp1, impliqué dans la

séquestration du zinc dans les vacuoles, est constitutive quel que soit le tissu considéré (Blaudez *et al.*, 2003).

Cependant, dans certains cas particuliers, une régulation de l'expression des gènes Cdfs a été observée, notamment en cas de « choc » pour la cellule. Ainsi, ScZrc1, un transporteur de zinc orthologue de LbCdfA, LbCdfB et LbCdfC présente un niveau d'expression qui augmente en cas d'excès de zinc extracellulaire (Miyabe *et al.*, 2000). Gonzales-Guerrero *et al.* (2005) montrent aussi une régulation d'un Zn-CDF, GintZnT1, à un choc en zinc. Une expression maximale à douze et six heures après l'ajout respectif d'une quantité modérée ou forte de zinc dans le milieu est observée. Il serait donc intéressant de tester des concentrations plus élevées en zinc ajoutées sur un temps plus court chez *L. bicolor*. De plus, chez *Thlaspi goesingense*, deux transporteurs appartenant à la famille CDF ont été caractérisés : TgMTP1(1) et TgMTP1(2). Ces deux transporteurs seraient deux variants d'une même protéine TgMTP1 qui auraient été obtenus par épissage alternatif lors de la transcription. L'incorporation d'introns supplémentaires chez TgMTP1(1) par rapport à TgMTP1(2) changerait la spécificité de substrat de ces deux protéines. En effet, TgMTP1(1) permet la séquestration de zinc, cobalt et cadmium dans les vacuoles alors que TgMTP1(2) permet la séquestration de nickel (Persans *et al.*, 2001). Or, chez *L. bicolor*, **les gènes LbCdfA et B semblent régulés par épissage alternatif ce qui semble consistant avec le fait que ces deux gènes ont une proportion d'introns assez élevée (40 et 38 %) par rapport aux autres Cdf étudiés (< 20 %).**

- *Il serait alors intéressant de cloner les variants non épissés des gènes LbCdfA et B afin de les caractériser.*

Les protéines LbCDFA, B et C permettent de restaurer la croissance du mutant de levures *Zrc1Δ*, sensible au zinc. De plus, ces protéines **semblent localisées au niveau de la membrane vacuolaire**. Ces protéines pourraient donc être **impliquées dans la détoxification de la cellule par séquestration du zinc en excès dans la vacuole**. Ce résultat confirme l'hypothèse de départ obtenue par l'analyse phylogénétique, à savoir que ces protéines appartiennent à la sous-famille Zn-CDF. De plus, ces protéines sont proches phylogénétiquement de ScZRC1, un transporteur permettant la séquestration du zinc dans les vacuoles chez la levure (MacDiarmid *et al.*, 2000). Les protéines LbCDFA, B et C seraient donc des orthologues de ScZRC1. De plus, tout comme ScZRC1, capable de transporter le manganèse et le fer en plus du zinc (MacDiarmid *et al.*, 2000) ; **la protéine LbCDFB serait capable de transporter le manganèse et le cadmium, et la protéine LbCDFC le cadmium, le fer et le cobalt** en plus du zinc. Cependant, ces ETM sont certainement **pris en charge secondairement** par les transporteurs LbCDFB et C puisque les phénotypes observés avec le cadmium, le cobalt, le fer et le manganèse sont moins marqués qu'avec le zinc.

- *Des expériences de compétition entre l'absorption d'un isotope stable du zinc et d'autres ETM permettraient de le confirmer.*
- *De plus, il serait intéressant de localiser ces protéines in situ chez le champignon.*

Cette séquestration de zinc et autres ETM dans les vacuoles par les protéines LbCDFA, B et C permettrait ainsi de détoxifier le cytoplasme de ces éléments en cas d'excès et permettrait également de constituer un pool remobilisable en cas de carence, notamment par la protéine LbZIPC.

Conclusions générales et perspectives

L'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire s'inscrit dans le cadre du projet ANR international BIOFILTEREE, qui vise à réduire les ETM dans la biomasse des arbres, et notamment du peuplier, à l'aide d'organismes fongiques symbiotiques mycorhiziens. Les objectifs majeurs de ce projet sont (i) la réalisation originale *in situ* d'essais de phytostabilisation à grande échelle, basés sur des co-cultures de peupliers et d'aulnes en mode taillis à courte rotation associés à des champignons endo- et ectomycorhiziens ; (ii) l'utilisation de la biomasse produite dans un but de valorisation énergétique (combustion ou gazéification) ; (iii) la sélection de symbiotes microbiens participant à la réduction de la teneur en ETM dans les parties aériennes des arbres ainsi que l'étude aux niveaux physiologique et moléculaire des mécanismes de tolérance de ces champignons. L'objectif général de ma thèse, financée par l'ADEME et la région Lorraine, était alors de développer une stratégie de réduction des teneurs en ETM dans la biomasse du peuplier dédiée à la valorisation énergétique, par l'utilisation de filtres biologiques naturels, ses champignons associés.

Le premier objectif de la thèse était l'identification des communautés fongiques mycorhiziennes du peuplier sur sol pollué.

Pour cela, une campagne de prélèvement de racines de peupliers a été réalisée sur le dispositif expérimental de Pierrelaye (parcelle PHYTOPOP) en septembre 2009 afin de déterminer le potentiel de mycorhization du peuplier sur un site pollué et d'identifier les communautés fongiques qui lui sont associées. Le pourcentage d'ectomycorhization variait de 6 à 60 % et le pourcentage d'endomycorhization de 4 à 35 %. De plus, les endomycorhizes étaient fonctionnelles puisqu'une proportion d'environ 20 % d'arbuscules, structure fongique intracellulaire permettant les échanges entre la plante et le champignon, a été observée. **Tous les peupliers étaient donc colonisés à la fois par des champignons endo- et ectomycorhiziens.** Le degré de colonisation ne semble pas lié au génotype de peuplier ni à la placette mais plutôt aux paramètres physico-chimiques du sol. En effet, la **colonisation des racines par des champignons ectomycorhiziens** était **corrélée négativement avec la concentration en cadmium biodisponible** dans le sol alors que la **colonisation par les champignons endomycorhiziens** semblait **corrélée négativement avec les concentrations en phosphore et cadmium** totales du sol.

L'analyse des communautés fongiques en association avec les racines de peupliers a permis de confirmer la présence de champignons endo- et ectomycorhiziens sur les racines ainsi que de champignons saprophytes, parasitiques ou endophytes. Notamment, des espèces comme *Pyrenochaeta* sp., *Phoma exigua*, *Ilyonectria* sp., *Ceratobasidium*, *Rhizoctonia* ou *Tetracladium* ont été identifiées sur les racines. Cependant, ces espèces peuvent avoir un mode de vie parasitique, mais l'absence de symptômes visibles sur

les arbres suggère un mode de vie endophyte. Six OTUs (*Operational Taxonomic Units*) d'espèces fongiques endomycorhiziennes ont été identifiées. Trois OTUs semblaient majoritaires, *Diversispora* sp., *Glomus* sp. (proche des espèces *intraradices* ou *irregulare*) et *Glomus lamellosum*, et pourraient être impliquées dans la tolérance aux ETM des peupliers sur ce site. En ce qui concerne les champignons ectomycorhiziens, plusieurs OTUs ont été identifiées appartenant aux genres *Peziza*, *Laccaria*, *Sebacina*, *Geopora*, *Tuber*, *Entoloma*, *Tricholoma* et *Hebeloma*. Cependant, **une spécificité d'hôte** semble se dégager. En effet, les espèces appartenant au genre *Hebeloma* ne colonisaient que les clones « Bakan » ou « Skado » de génotype *P. trichocarpa* x *P. maximowiczii*, alors que des espèces comme *Laccaria* sp. ou *Sebacina vermifera* étaient préférentiellement associées aux racines du clone « Triplo » de génotype *P. deltoides* x *P. nigra*. **La structure des communautés fongiques associées aux racines était fortement liée au génotype du clone de peuplier** et non aux paramètres physico-chimiques du sol ou à la placette. Cependant, les paramètres qui structurent ces communautés fongiques sont encore mal connus.

- *Un suivi du potentiel de mycorhization et des communautés fongiques associées aux mêmes clones de peupliers de génotypes différents sur plusieurs sites pollués, à différentes saisons et à différents stades de développement permettrait de développer un modèle de succession et structuration des communautés fongiques au fil du temps et en fonction du degré de pollution et/ou de l'hôte végétal. Ceci permettrait de mieux cibler les espèces fongiques choisies dans une optique de phytostabilisation assistée par des champignons mycorhiziens.*

De plus, la méthode d'identification des communautés fongiques par amplification moléculaire des séquences ITS et discrimination par RFLP utilisée lors de ce travail de thèse présente certaines limites. En effet, la diversité d'espèces recensées permet d'obtenir une bonne représentation des communautés fongiques mais est loin d'être exhaustive. Cette méthode s'est avérée également très coûteuse en terme de temps, nécessitant de travailler sur des *pools* d'ADN plutôt que sur les échantillons individuels. De plus, chaque étape (extraction de l'ADNg, amplification par PCR, ligation, clonage, RFLP) est critique. Enfin, les séquences ITS ciblées pour l'identification ne permettent pas toujours de discriminer le genre ou l'espèce fongique.

- *L'utilisation d'une méthode plus directe, certes plus coûteuse, comme le séquençage à haut-débit, permettrait d'apporter plus de précision en terme de diversité des communautés, d'éliminer une partie des étapes critiques et de multiplier les répétitions. Cette technologie s'est très fortement développée ces dernières années et semble très prometteuse pour ce type d'étude. Avec les améliorations techniques et la réduction des coûts prévues, pour de telles questions scientifiques, cette technologie sera à privilégier dans le futur.*

- D'autres couples d'amorces, permettant une meilleure discrimination entre les espèces, notamment chez les Gloméromycètes, devraient également être testés. Les gènes des transporteurs de phosphate seraient notamment de bons marqueurs permettant la discrimination des différentes espèces de Glomus (Sokolski et al., 2011).

Cette étude préliminaire nous a permis d'identifier des espèces fongiques comme *Diversispora* sp., *Hebeloma* sp., *Sebacina* sp., *Laccaria* sp. ou *Tricholoma* sp., colonisant les racines de peupliers et qui pourraient s'avérer être de bons candidats en terme de phytostabilisation.

Le deuxième objectif de ce travail visait à isoler et sélectionner des souches fongiques performantes dans la séquestration des ETM dans une optique de phytostabilisation.

La sélection de souches fongiques ectomycorhiziennes performantes dans une optique de phytostabilisation nécessite la validation de plusieurs étapes clés.

Dans un premier temps, il est nécessaire d'isoler un maximum de souches fongiques afin de tester leurs capacités de tolérance aux ETM et leurs impacts sur la croissance et le développement de leurs plantes hôtes. Cependant, cette étape est délicate car plusieurs paramètres sont limitants. En effet, **la formation des ectomycorhizes et des carpophores est saisons- et conditions climatiques-dépendante**. Il est alors nécessaire de multiplier les campagnes de prélèvements afin de permettre l'isolement d'une plus grande diversité de souches. De plus, l'isolement en lui-même est une étape critique puisque **de nombreux contaminants, bactériens ou fongiques**, peuvent se développer et souvent bien plus rapidement que les souches d'intérêt. Selon la méthode employée, le **rendement de l'isolement** peut alors être très **faible** (< à 0,2 %). De même, les milieux de culture utilisés pour l'isolement doivent être choisis avec soin car **chaque souche fongique présente ses propres exigences nutritionnelles**. Cependant, lors de ce travail de thèse, le protocole d'isolement de souches fongiques a largement été optimisé, ce qui permet maintenant de réaliser ces isollements en routine au laboratoire.

Dans un deuxième temps, il est important de caractériser la souche fongique isolée, c'est-à-dire identifier l'espèce, connaître ses exigences nutritionnelles et le type d'association symbiotique qu'elle peut former avec les racines. Ainsi, une **identification moléculaire** par amplification des séquences ITS est réalisée puis le **milieu de prédilection** de la souche est déterminé par des tests de croissance dans différentes conditions. Il est également important de s'assurer que la souche isolée est capable de s'associer aux

racines, les repiquages successifs pouvant leur faire perdre leurs capacités de mycorhization ; et de connaître le **type d'association formée** (ECM, ERM, endophyte...).

- *Des mises au point sont encore à apporter au protocole de test des capacités de mycorhization des différentes souches isolées.*

Au cours de ce travail, **43 souches fongiques ectomycorhiziennes** issues de plusieurs campagnes de prélèvement ont pu être **isolées**. Ainsi, plusieurs souches de *Paxillus involutus*, *Hebeloma* sp., *Suillus* sp. ou appartenant à l'ordre des Helotiales ont été isolées de sites pollués ou non pollués.

- *Afin de faciliter le suivi des différentes souches isolées, une fiche signalétique renseignant leurs caractéristiques importantes devrait être créée.*

De plus, lors de ce travail, des espèces fongiques non mycorhiziennes classées comme DSE avaient également été isolées, appartenant aux genres *Cadophora*, *Leptodontium* ou *Phialophora*, pour lesquelles la sélection n'avait pas été poursuivie. Cependant, les champignons DSE (« *Dark Septate Endophyte* ») pourraient également protéger la plante contre les effets néfastes des ETM (Likar & Regvar, 2009 ; Regvar et al., 2010).

- *La caractérisation de ces souches DSE devrait être poursuivie afin de vérifier si elles peuvent avoir un éventuel effet positif sur la tolérance des plantes aux ETM, voire assister la phytostabilisation. Charlotte Berthelot (stagiaire de master 2) et Julie Foulon (en première année de thèse) devraient participer à ce travail.*

Dans un troisième temps, la capacité de tolérance des différentes souches isolées est évaluée afin de **sélectionner les souches les plus tolérantes aux ETM**. En effet, plusieurs études montrent que les souches les plus tolérantes permettent d'améliorer la croissance et la tolérance de la plante en présence d'ETM (Adriaensen et al., 2005 ; Adriaensen et al., 2006 ; Jourand et al., 2010b). Lors de cette thèse, plusieurs souches particulièrement tolérantes aux ETM ont été identifiées. Ainsi, les candidats les plus intéressants seraient les souches de ***P. involutus* HE01 et LS02**, très tolérantes respectivement aux couples zinc/cadmium et nickel/cuivre ; ainsi que les souches **d'*Hebeloma* P24, P28 et M05** particulièrement tolérantes au zinc et au cadmium. Cependant, les mécanismes de tolérance de ces souches ne sont pas connus. De plus, certaines souches, comme Helotiales M03, étaient capables d'extraire jusqu'à 12 % du zinc et 30 % du cadmium disponibles dans le milieu.

- *Ces souches particulièrement tolérantes aux ETM devraient être testées en conditions contrôlées en association avec le peuplier ou un autre hôte végétal afin de tester leur potentiel de phytostabilisation.*
- *Une analyse plus fine des mécanismes de tolérance mis en place par ces souches d'intérêt permettrait d'évaluer leur potentiel de phytostabilisation. En effet, les mécanismes les plus*

intéressants seraient l'excrétion de composés chélatants ou la séquestration des ETM dans les hyphes, soit par adsorption à la paroi fongique, soit par absorption et séquestration intracellulaire.

La **caractérisation des gènes Zips et Cdfs, impliqués respectivement dans l'absorption et la séquestration des ETM** chez le champignon ectomycorhizien modèle *Laccaria bicolor*, a notamment permis d'apporter des éléments clés dans la compréhension de ces mécanismes.

Dans un quatrième temps, le potentiel de phytostabilisation des souches fongiques d'intérêt associées au peuplier a été testé en conditions contrôlées. L'objectif de cette étape est de **sélectionner des souches fongiques permettant d'améliorer la croissance de la plante et de réduire le transfert des ETM vers les parties aériennes**. Cependant, les différents essais réalisés en pots n'ont pas permis la formation d'ectomycorhizes sur les racines.

- *Une mise au point du protocole de fabrication de l'inoculum fongique et de contact avec la plante hôte est nécessaire. Plusieurs points peuvent être améliorés : i) la composition du milieu de culture de l'inoculum fongique est à optimiser ; ii) les conditions d'arrosage des plants sont à surveiller ; iii) le substrat utilisé pour le contact ne doit pas être trop riche en phosphore et en azote, au risque de défavoriser la mycorhization. Une solution à envisager serait de mycorhizer les plants sur un substrat pauvre (tourbe, vermiculite...) puis de les transférer sur les substrats contrôle et pollué.*

Enfin, une fois les précédentes étapes validées, les souches d'intérêt peuvent être testées à plus grande échelle sur le terrain.

- *Dans l'objectif d'une application sur le terrain, la possibilité de produire l'inoculum fongique en quantité importante devrait être réfléchi. La capacité des souches à se développer en bioréacteur devrait notamment être étudiée.*

Le temps alloué à une thèse ne permettant pas de valider toutes ces étapes, chacune prenant plusieurs mois, des dispositifs expérimentaux sur les sites de Pierrelaye, Tavaux et Fresnes-sur-Escaut ont été mis en place au printemps 2011 en utilisant un inoculum fongique (mélange de champignons endo- et ectomycorhiziens) commercial fourni par la société Symbiom.

L'apport de cet inoculum commercial à la phytostabilisation avait alors été testé en conditions contrôlées au laboratoire. La méthode d'inoculation des champignons endomycorhiziens a été un succès puisque les peupliers du substrat contrôle « stérile » étaient endomycorhizés. De plus, **cet inoculum endomycorhizien a eu un léger impact sur le transfert des ETM dans les parties aériennes** notamment pour le fer, le zinc et le cadmium. Cependant, **un effet clone a été observé** puisque le transfert vers les parties aériennes de ces éléments était augmenté chez le clone « I214 » et diminué chez le clone « Skado ».

- Un suivi de l'accumulation des ETM dans les parties aériennes des peupliers des sites expérimentaux devra être réalisé.
- De même, un suivi de l'inoculum fongique implanté sur les racines devra être réalisé au cours des différentes saisons de croissance. L'idéal serait de quantifier régulièrement les taux de mycorhization des racines et de développer des outils moléculaires permettant de vérifier la persistance des différentes espèces inoculées. De tels outils, basés sur les variations des séquences microsatellites, existent déjà pour certaines souches comme *G. irregulare/intradices* DAOM197198 fournie par la société Agronutrition.

Le troisième objectif de la thèse était la caractérisation des mécanismes d'absorption et de séquestration des éléments traces métalliques par les champignons mycorhiziens.

Parmi les mécanismes de tolérance aux ETM mis en place par les champignons, les plus pertinents en terme de phytostabilisation sont i) l'excrétion de composés chélatants ; ii) l'adsorption aspécifique aux parois ou iii) l'absorption et la séquestration des ETM dans les hyphes fongiques. Ce dernier mécanisme est encore mal connu chez les champignons mycorhiziens. Ainsi, afin d'appréhender ces mécanismes d'absorption et de séquestration des ETM et plus particulièrement du zinc, chez les champignons mycorhiziens, l'étude s'est focalisée sur la caractérisation des gènes de *Laccaria bicolor*, un champignon ectomycorhizien modèle, appartenant aux familles Zip (« *Zrt-Irt like Proteins* ») et Cdf (« *Cation Diffusion Facilitator* »), impliquées dans ces mécanismes chez la levure (Figure 19). Les différentes techniques utilisées au cours de ce travail (analyse phylogénétique, mesure du taux de transcrits par RT-PCR semi-quantitative, complémentation fonctionnelle en système hétérologue et localisation subcellulaire par fusion GFP) nous ont permis de proposer des fonctions pour une partie de ces gènes LbZips et LbCdFs.

En ce qui concerne la famille de protéines ZIPs, notre étude s'est focalisée sur les transporteurs LbZIPA, B, C et D, impliqués préférentiellement dans l'homéostasie au zinc.

Tout d'abord, l'analyse phylogénétique des protéines ZIPs chez les champignons a permis de mettre en évidence quatre sous-familles I, II (LIV-1/LZT), III (Atx2/ZIP9) et IV (GufA/Zrt3). Des protéines LbZIPs étaient présentes dans chacune de ces sous-familles sauf dans la sous-famille IV laissant supposer qu'il n'y aurait pas de transporteurs ZIPs impliqués dans la remobilisation du zinc depuis la vacuole chez les Basidiomycètes. Cependant, la caractérisation de la protéine LbZIPC, supposée impliquée dans l'absorption

du zinc dans les cellules d'après l'analyse phylogénétique, s'est avérée être un orthologue de ScZRT3 permettant la remobilisation du zinc depuis la vacuole. C'est **la première fois qu'un orthologue de ScZRT3 est décrit chez les Basidiomycètes**. L'analyse phylogénétique n'est donc pas toujours un outil fiable pour décrire la fonction d'un gène ou d'une protéine.

L'analyse du taux de transcrits des gènes LbZips a permis de mettre en évidence **une forte régulation des gènes LbZipA, LbZipB et LbZipC par le zinc extracellulaire** tout comme leurs homologues chez la levure (ScZrt1, ScZrt2 et ScZrt3) ou chez *A. fumigatus* (AfZrfA et AfZrfB). Les facteurs de transcription ScZAP1 et AfZAF1 sont les acteurs de cette régulation par le zinc respectivement chez la levure et chez *A. fumigatus*.

- *Il serait intéressant de rechercher ce facteur de transcription chez L. bicolor et de le caractériser.*

De même, les expériences de localisation des protéines **LbZIPA et LbZIPB, localisées à la membrane plasmique**, par fusion GFP chez la levure ont mis en évidence **une régulation post-traductionnelle** de ces transporteurs. Chez la levure ou *A. thaliana*, en cas d'afflux massif de zinc dans la cellule, l'ubiquitine se lie spécifiquement aux transporteurs ScZRT1 et AtIRT1 et déclenche un signal permettant l'endocytose et la dégradation de ces protéines dans la vacuole. Des motifs particuliers présents entre les domaines transmembranaires III et IV de ces transporteurs sont spécifiquement reconnus par l'ubiquitine.

- *Les protéines LbZIPA et LbZIPB possèdent probablement des motifs reconnus par l'ubiquitine, il serait intéressant de les rechercher et de les identifier.*

Les tests de complémentation en levures ont permis de mettre en évidence les différents éléments transportés par les protéines LbZIPs. Ainsi, la protéine **LbZIPA** serait impliquée dans **l'absorption du zinc et du cuivre** alors que la protéine **LbZIPB** serait impliquée dans **l'absorption du zinc, du cadmium, du cuivre et du cobalt** dans les cellules. De même, plusieurs indices laissent supposer que **LbZIPA serait un transporteur de forte affinité pour le zinc et LbZIPB de faible-affinité**.

- *Il serait alors nécessaire d'étudier l'affinité de ces transporteurs, par exemple via des marquages avec un isotope stable du zinc.*

De même, **LbZIPC serait un transporteur de zinc, de cadmium et de cobalt, impliqué dans la remobilisation de ces éléments depuis la vacuole**. Et **LbZIPD, serait un transporteur permettant l'influx de zinc dans le réticulum endoplasmique**.

- *Des expériences de compétition entre un isotope stable du zinc et d'autres ETM permettraient de confirmer ces hypothèses.*

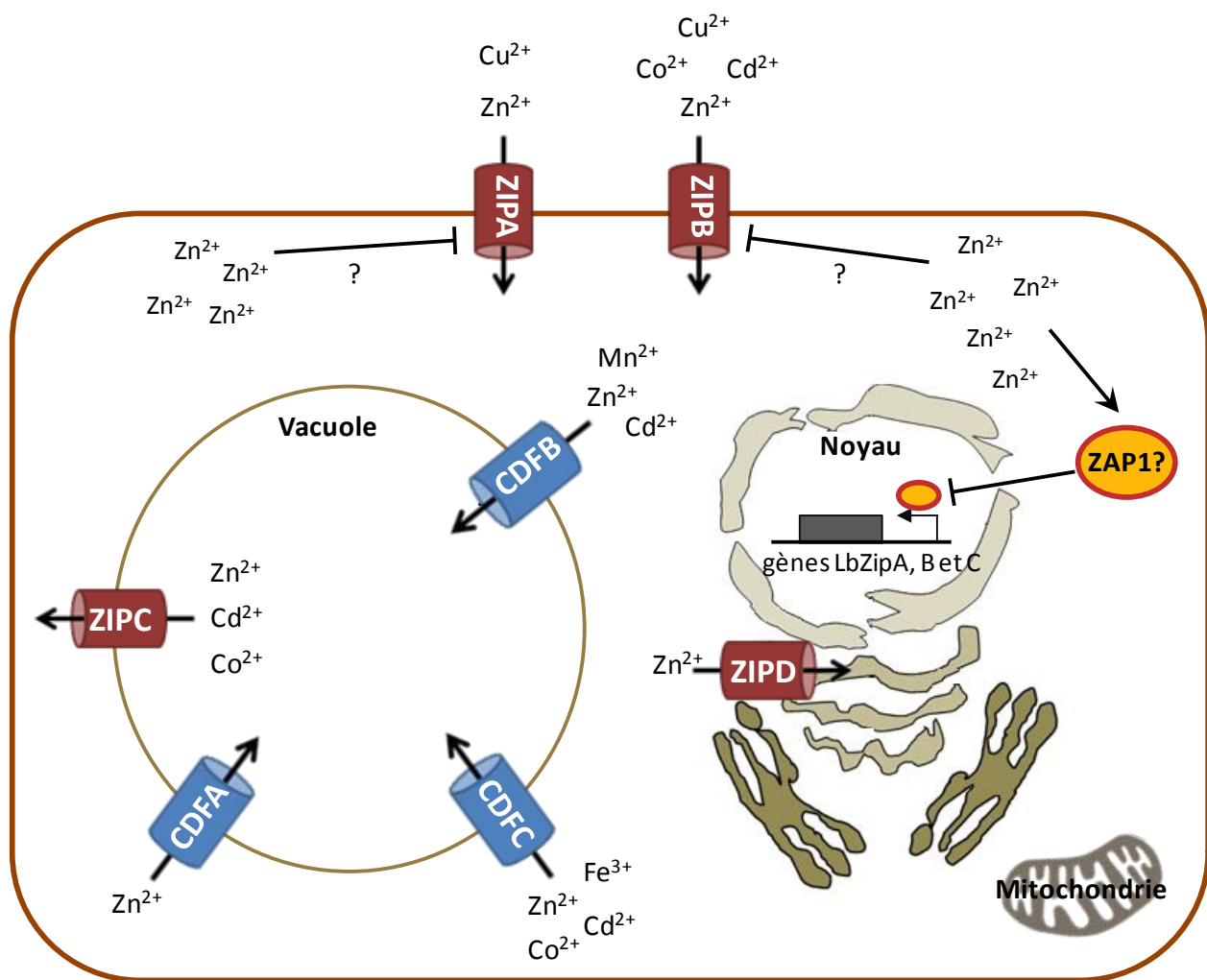


Figure 89 : Modèle proposé de l'homéostasie au zinc issue de l'activité des protéines CDFs et ZIPs chez *Laccaria bicolor*. Les transporteurs de la famille CDF sont représentés en bleu et les transporteurs de la famille ZIP en rouge. Les localisations cellulaires des transporteurs étudiés lors de cette thèse sont déduites d'après les résultats de caractérisation fonctionnelle par fusion GFP. Les différents ETM transportés sont déduits d'après les résultats de complémentation fonctionnelle en levures. Les mécanismes de régulation putatifs de ces gènes sont représentés, une flèche signale une activation alors qu'un connecteur barré signale une répression de l'expression.

En ce qui concerne la famille CDF, notre étude s'est principalement focalisée sur l'étude des protéines LbCDFA, B et C, homologues de ScZRC1 et ScCOT1, impliquées dans la séquestration du zinc et d'autres ETM dans la vacuole chez la levure.

Les protéines **LbCDFA, LbCDFB et LbCDFC** sont toutes les trois localisées au niveau de la membrane vacuolaire. La présence d'une protéine supplémentaire localisée à la membrane vacuolaire par rapport à la levure est consistante avec l'expansion de gènes observée chez *L. bicolor* par Martin *et al.* (2008). Cependant, la présence de cette protéine supplémentaire pourrait également s'expliquer par des spécificités et/ou affinités différentes pour divers ETM. Ainsi, **LbCDFA** serait un transporteur de **zinc**, **LbCDFB** serait un transporteur de **zinc, cadmium et manganèse** et enfin **LbCDFC** permettrait l'influx de **zinc, fer, cadmium et cobalt** dans la vacuole.

- Des marquages avec un isotope stable du zinc permettraient d'étudier l'affinité de ces transporteurs.
- De plus, des expériences de compétition entre un isotope stable du zinc et d'autres ETM permettraient de vérifier la spécificité de substrat métallique de ces différentes protéines LbCDFs.

L'analyse de l'expression des gènes LbCdfs en présence de zinc ou d'autres ETM à des concentrations sublétales ou toxiques a mis en évidence **une expression constitutive des gènes LbCdfA, B, C, D et E**. Cependant, les **gènes LbCdfA et LbCdfB semblaient régulés par épissage alternatif**. Chez *Thlaspi goesingense*, le gène TgMtp1 est régulé par épissage alternatif ce qui conduit à une différence de spécificité de substrat métallique pour la protéine non épissée par rapport à la protéine épissée.

- Il serait intéressant d'étudier la fonction des différentes protéines LbCDFA et B non épissées et de vérifier leur spécificité de substrat.

La figure 89 propose un modèle de nos connaissances actuelles sur l'homéostasie métallique (principalement du zinc) du champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor*. Cette étude a permis de caractériser **quatre gènes de la famille LbZip impliqués dans l'absorption et la remobilisation du zinc** et d'autres ETM dans la cellule fongique. **Trois gènes appartenant à la famille Cdf**, LbCdfA, B et C, ont également été caractérisés et seraient **impliqués dans la séquestration du zinc** et d'autres ETM **dans la vacuole**. De plus, un mécanisme de régulation de l'homéostasie au zinc a été mis en évidence chez *L.bicolor*. En effet, en cas d'excès de zinc dans le milieu extracellulaire, des régulations post-transcriptionnelle, probablement *via* un orthologue du facteur transcriptionnel ScZAP1, et post-traductionnelle, probablement par ubiquitination et dégradation des transporteurs, sont mise en place afin de limiter l'entrée de cet élément dans la cellule. De même, l'absorption via les transporteurs LbZIPA et B, et la remobilisation du zinc

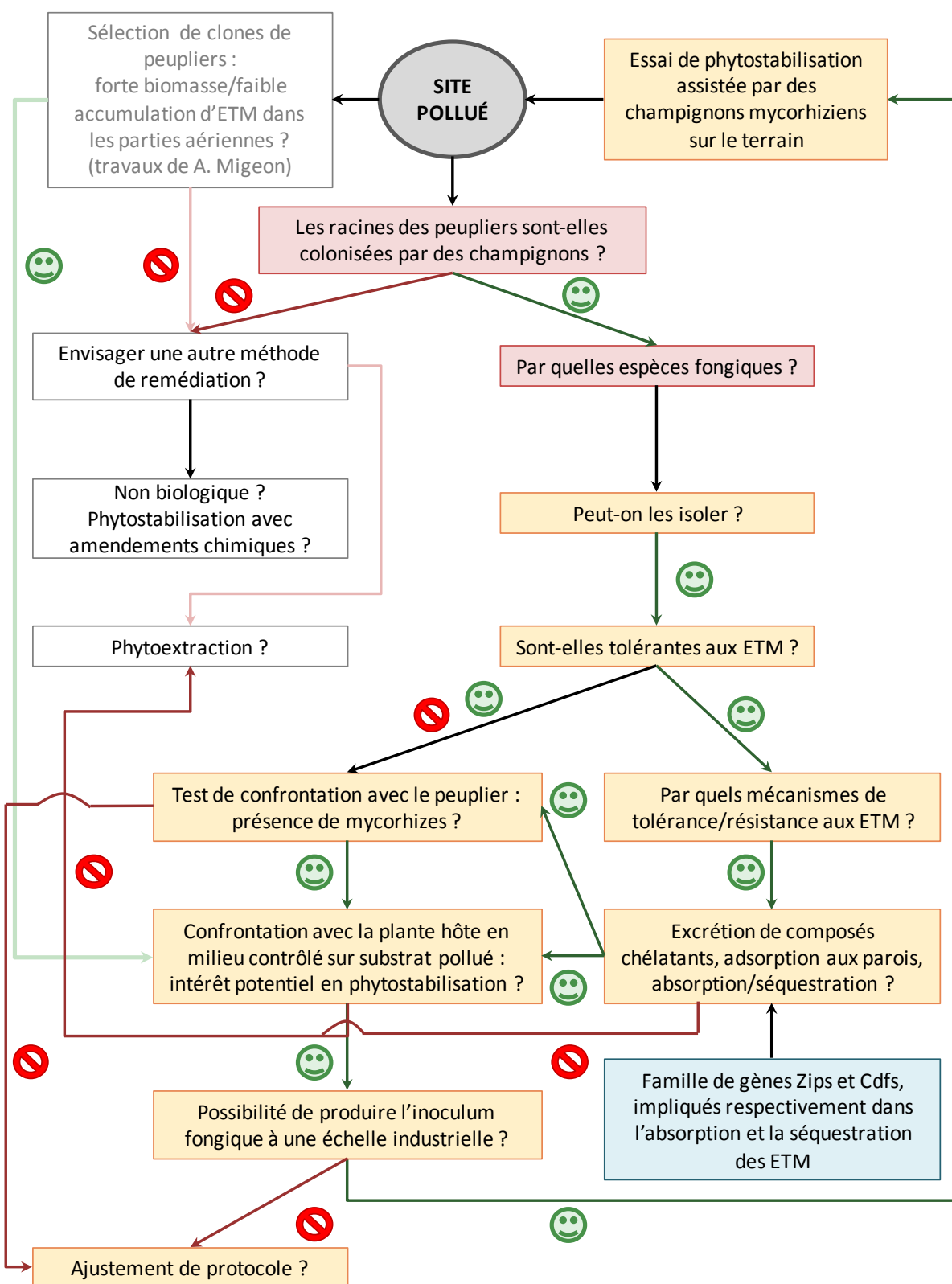


Figure 90 : Outil d'aide à la décision en vue de la phytostabilisation de sites pollués par des ETM à l'aide du peuplier, assistée par des champignons mycorhiziens. Les encadrés roses concernent le premier objectif de la thèse (identification des communautés fongiques mycorhiziennes du peuplier sur sol pollué) ; les encadrés jaunes concernent le deuxième objectif (isoler et sélectionner des souches fongiques performantes dans la séquestration des ETM dans une optique de phytostabilisation) et les encadrés bleus concernent le troisième objectif (caractérisation des mécanismes d'absorption et de séquestration des éléments traces métalliques par les champignons mycorhiziens). Les flèches vertes font référence aux questions pour lesquelles la réponse est oui, les flèches rouges aux questions pour lesquelles la réponse est non. Les différents points validés au cours de la thèse d'A. Migeon apparaissent plus clairs.

depuis la vacuole par le transporteur LbZIPC sont stimulées en situation de carence en cet élément dans la cellule.

- *Afin de compléter ce modèle, la caractérisation des autres gènes Zips et CdFs de L. bicolor est nécessaire.*
- *De même, il serait intéressant d'utiliser des marqueurs spécifiques du zinc ou d'autres ETM afin de déterminer leur localisation dans les hyphes du champignon et au sein des différents « tissus » de la symbiose.*
- *Enfin, la fonction de ces différentes protéines devrait être étudiée in situ chez L. bicolor. Cependant, cette étude nécessiterait de travailler avec des double- (délété des gènes LbZipA et B) ou triple-mutants (délété des gènes LbCdfA, B et C) du champignon, impossibles à obtenir à l'heure actuelle.*

La fonction et la régulation des gènes LbZips et LbCdFs étudiés semblent proches de ce qui a été montré chez d'autres champignons saprophytes ou parasitiques appartenant à la famille des Ascomycètes (*S. cerevisiae*, *A. fumigatus* et *N. crassa*). Il est alors possible que chez d'autres champignons plus proches de *L. bicolor* (Basidiomycètes ou mycorrhiziens), la fonction et la régulation des gènes Zips et CdFs soient équivalentes.

- *Récemment, un projet de séquençage de génomes de 30 espèces de champignons ectomycorhiziens a été mis en place par le JGI. Il serait alors intéressant d'étudier ces gènes Zips et CdFs chez ces autres organismes fongiques afin de proposer un modèle plus complet de l'homéostasie métallique chez les champignons.*

En conclusion, ce travail de thèse a permis de mettre en évidence la faisabilité d'un essai de phytostabilisation assistée par des champignons mycorrhiziens sur le terrain dont les principales étapes développées au cours de ce travail sont présentées dans la figure 90. En effet, nous avons pu vérifier la présence de champignons mycorrhiziens en interaction avec les racines de plusieurs essences végétales, dont le peuplier, sur plusieurs sites pollués par des ETM. De plus, l'analyse des communautés fongiques associées au peuplier et les différents campagnes de prélèvement de carpophores sur sites pollués par des ETM nous ont permis d'identifier des espèces fongiques d'intérêt appartenant aux genres *Glomus*, *Hebeloma* ou *Paxillus*. Parmi les souches fongiques isolées, quelques-unes se sont avérées être particulièrement tolérantes aux ETM et pourraient être de très bonnes candidates en terme de phytostabilisation. Enfin, la caractérisation des mécanismes d'absorption et de séquestration des ETM chez le champignon ectomycorhizien *L. bicolor*, a posé des bases solides pour la compréhension des mécanismes de tolérance aux ETM utiles pour la sélection de souches fongiques performantes en phytostabilisation. Le séquençage récent de plusieurs génomes de champignons mycorrhiziens pourrait permettre d'affiner ce modèle.

Références bibliographiques

- Abdel-Fattah GM, Shabana YM. 2002.** Efficacy of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* in protection of cowpea plants against root rot pathogen *Rhizoctonia solani*. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection* **109**: 207-215.
- Adams P, De-Leij FAAM, Lynch JM. 2007.** *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 mediates growth promotion of crack willow (*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal-contaminated soil. *Microbial Ecology* **54**: 306-313.
- ADEME. 2007.** Traitabilité des sols pollués : Guide méthodologique pour la sélection des techniques et l'évaluation de leurs performances. *Dueso N., Cadiere F.*
- ADEME, APCA. 2005.** Dérogations relatives à la réglementation sur l'épandage des boues de stations d'épuration. Comment formuler une demande pour les sols à teneurs naturelles élevées en éléments traces métalliques? Guide technique. In *S. T. Baize D., Piquet A., Ciesielski H., Béraud J., Bispo A.*
- Adriaensen K, Van Der Lelie D, Van Laere A, Vangronsveld J, Colpaert JV. 2004.** A zinc-adapted fungus protects pines from zinc stress. *New Phytologist* **161**: 549-555.
- Adriaensen K, Vangronsveld J, Colpaert JV. 2006.** Zinc-tolerant *Suillus bovinus* improves growth of Zn-exposed *Pinus sylvestris* seedlings. *Mycorrhiza* **16**: 553-558.
- Adriaensen K, Vralstad T, Noben JP, Vangronsveld J, Colpaert JV. 2005.** Copper-adapted *Suillus luteus*, a symbiotic solution for pines colonizing Cu mine spoils. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 7279-7284.
- Adriano DC, Wenzel WW, Vangronsveld J, Bolan NS. 2004.** Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. *Geoderma* **122**: 121-142.
- Aggangan NS, Dell B, Malajczuk N. 1998.** Effects of chromium and nickel on growth of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus* and formation of ectomycorrhizas on *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. *Geoderma* **84**: 15-27.
- Ahonen-Jonnarh U, Van Hees PAW, Lundstrom US, Finlay RD. 2000.** Organic acids produced by mycorrhizal *Pinus sylvestris* exposed to elevated aluminium and heavy metal concentrations. *New Phytologist* **146**: 557-567.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402.
- Alvarenga P, Goncalves AP, Fernandes RM, de Varennes A, Vallini G, Duarte E, Cunha-Queda AC. 2009.** Organic residues as immobilizing agents in aided phytostabilization: (I) Effects on soil chemical characteristics. *Chemosphere* **74**: 1292-1300.
- Amich J, Vicentefranqueira R, Leal F, Calera JA. 2010.** *Aspergillus fumigatus* survival in alkaline and extreme zinc-limiting environments relies on the induction of a zinc homeostasis system encoded by the *zrfc* and *aspf2* genes. *Eukaryotic Cell* **9**: 424-437.
- Anderson CWN, Brooks RR, Chiarucci A, LaCoste CJ, Leblanc M, Robinson BH, Simcock R, Stewart RB. 1999.** Phytomining for nickel, thallium and gold. *Journal of Geochemical Exploration* **67**: 407-415.
- Andrade SAL, Silveira APD, Mazzafera P. 2010.** Arbuscular mycorrhiza alters metal uptake and the physiological response of *Coffea arabica* seedlings to increasing Zn and Cu concentrations in soil. *Science of the Total Environment* **408**: 5381-5391.
- Anjos C, Magalhaes MCF, Abreu MM. 2012.** Metal (Al, Mn, Pb and Zn) soils extractable reagents for available fraction assessment: Comparison using plants, and dry and moist soils from the Bracal abandoned lead mine area, Portugal. *Journal of Geochemical Exploration* **113**: 45-55.
- Antosiewicz DM, Escudé-Duran C, Wierzbowska E, Sklodowska A. 2008.** Indigenous plant species with the potential for the phytoremediation of arsenic and metals contaminated soil. *Water, Air, and Soil Pollution* **193**: 197-210.
- Babula P, Adam V, Opatrilova R, Zehnalek J, Havel L, Kizek R. 2008.** Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. *Environmental Chemistry Letters* **6**: 189-213.
- Bago B, Pfeffer PE, Abubaker J, Jun J, Allen JW, Brouillette J, Douds DD, Lammers PJ, Shachar-Hill Y. 2003.** Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant Physiology* **131**: 1496-1507.

- Baize D. 1997.** *Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France)* Paris: INRA editions.
- Baize D, Tercé M. 2002.** *Les éléments traces métalliques dans les sols. Approches fonctionnelles et spatiales.* Paris: INRA Editions.
- Bakircioglu D, Kurtulus YB, Ibar H. 2011.** Comparison of extraction procedures for assessing soil metal bioavailability of to wheat grains. *Clean-Soil Air Water* **39**: 728-734.
- Bali R, Siegele R, Harris AT. 2010.** Phytoextraction of Au: Uptake, accumulation and cellular distribution in *Medicago sativa* and *Brassica juncea*. *Chemical Engineering Journal* **156**: 286-297.
- Ban YH, Tang M, Chen H, Xu ZY, Zhang HH, Yang YR. 2012.** The response of Dark Septate Endophytes (DSE) to heavy metals in pure culture. *Plos One* **7**.
- Baptista P, Ferreira S, Soares E, Coelho V, Bastos MD. 2009.** Tolerance and stress response of *Macrolepota procera* to nickel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 7145-7152.
- Battke F, Ernst D, Fleischmann F, Halbach S. 2008.** Phytoreduction and volatilization of mercury by ascorbate in *Arabidopsis thaliana*, European beech and Norway spruce. *Applied Geochemistry* **23**: 494-502.
- Bedini S, Turrini A, Rigo C, Argese E, Giovannetti M. 2010.** Molecular characterization and glomalin production of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing a heavy metal polluted ash disposal island, downtown Venice. *Soil Biology and Biochemistry* **42**: 758-765.
- Bellion M, Courbot M, Jacob C, Blaudez D, Chalot M. 2006.** Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *Fems Microbiology Letters* **254**: 173-181.
- Bellion M, Courbot M, Jacob C, Guinet F, Blaudez D, Chalot M. 2007.** Metal induction of a *Paxillus involutus* metallothionein and its heterologous expression in *Hebeloma cylindrosporum*. *New Phytologist* **174**: 151-158.
- Bert V, Bonnin I, Saumitou-Laprade P, de Laguerie P, Petit D. 2002.** Do *Arabidopsis halleri* from nonmetallicolous populations accumulate zinc and cadmium more effectively than those from metallicolous populations? *New Phytologist* **155**: 47-57.
- Bert V, Lors C, Ponge JF, Caron L, Biaz A, Dazy M, Masfaraud JF. 2012.** Metal immobilization and soil amendment efficiency at a contaminated sediment landfill site: A field study focusing on plants, springtails, and bacteria. *Environmental Pollution* **169**: 1-11.
- Bert V, Seuntjens P, Dejonghe W, Lacherez S, Thuy HTT, Vandecasteele B. 2009.** Phytoremediation as a management option for contaminated sediments in tidal marshes, flood control areas and dredged sediment landfill sites. *Environmental science and pollution research* **16**: 745-764.
- Berthelot C. 2012.** *rapport de M1 : Caractérisation de souches fongiques endophytes isolées de racines de peupliers issus de sols pollués par des métaux lourds.* Université de Lorraine. Vandoeuvre-lès-Nancy.
- Bertin G, Averbeck D. 2006.** Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* **88**: 1549-1559.
- Bhaduri AM, Fulekar MH. 2012.** Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. *Reviews in Environmental Science and Bio-Technology* **11**: 55-69.
- Bidar G, Pruvot C, Garcon G, Verdin A, Shirali P, Douay F. 2009.** Seasonal and annual variations of metal uptake, bioaccumulation, and toxicity in *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal-contaminated field. *Environmental science and pollution research* **16**: 42-53.
- Blaby-Haas CE, Merchant SS. 2012.** The ins and outs of algal metal transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1823**: 1531-1552.
- Blaudez D, Botton B, Chalot M. 2000a.** Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Microbiology* **146**: 1109-1117.
- Blaudez D, Chalot M. 2011.** Characterization of the ER-located zinc transporter ZnT1 and identification of a vesicular zinc storage compartment in *Hebeloma cylindrosporum*. *Fungal Genetics and Biology* **48**: 496-503.
- Blaudez D, Jacob C, Turnau K, Colpaert JV, Ahonen-Jonnarth U, Finlay R, Botton B, Chalot M. 2000b.** Differential responses of ectomycorrhizal fungi to heavy metals in vitro. *Mycological Research* **104**: 1366-1371.

- Blaudez D, Kohler A, Martin F, Sanders D, Chalot M. 2003. Poplar Metal Tolerance Protein 1 confers zinc tolerance and is an oligomeric vacuolar zinc transporter with an essential leucine zipper motif. *Plant Cell* **15**: 2911-2928.
- Bojarczuk K, Kieliszewska-Rokicka B. 2010. Effect of ectomycorrhiza on Cu and Pb accumulation in leaves and roots of silver birch (*Betula pendula* Roth.) seedlings grown in metal-contaminated soil. *Water, Air, and Soil Pollution* **207**: 227-240.
- Bolchi A, Ruotolo R, Marchini G, Vurro E, di Toppi LS, Kohler A, Tisserant E, Martin F, Ottonello S. 2011. Genome-wide inventory of metal homeostasis-related gene products including a functional phytochelatin synthase in the hypogeous mycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. *Fungal Genetics and Biology* **48**: 573-584.
- Bonfante P, Genre A. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications* **1**.
- Bonnard M, Devin S, Leyval C, Morel JL, Vasseur P. 2010. The influence of thermal desorption on genotoxicity of multipolluted soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **73**: 955-960.
- Borghi M, Tognetti R, Monteforti G, Sebastiani L. 2008. Responses of two poplar species (*Populus alba* and *Populus x canadensis*) to high copper concentrations. *Environmental and Experimental Botany* **62**: 290-299.
- Bourennane H, Dère C, Lamy I, Cornu S, Baize D, Van Oort F, King D. 2006. Enhancing spatial estimates of metal pollutants in raw wastewater irrigated fields using a topsoil organic carbon map predicted from aerial photography. *Science of the Total Environment* **361**: 229-248.
- Bourrelrier PH, Berthelin J. 1998. *Contamination des sols par les éléments en traces : les risques et leur gestion*. Paris: Tec et Doc.
- Boyle H, Zimdars B, Renker C, Buscot F. 2006. A molecular phylogeny of *Hebeloma* species from Europe. *Mycological Research* **110**: 369-380.
- BRGM. 2010. Rapport final : Quelles techniques pour quels traitements - Analyse coûts-bénéfices. In S. A. Colombano S, Guerin V, Bataillard P, Bellenfant G, Beranger S, Hube D, Blanc C, Zornig C et Girardeau I.
- Brown SL, Chaney RL, Angle JS, Baker AJM. 1995. Zinc and cadmium uptake by hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* grown in nutrient solution. *Soil Science Society of America Journal* **59**: 125-133.
- Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N. 1996. *Working with mycorrhizas in forestry and agriculture*. Canberra, Australia: ACIAR Monograph.
- Brunner I, Frey B. 2000. Detection and localization of aluminum and heavy metals in ectomycorrhizal Norway spruce seedlings. *Environmental Pollution* **108**: 121-128.
- Caboche J, Perdrix E, Malet B, Laurent YA. 2011. Development of an in vitro method to estimate lung bioaccessibility of metals from atmospheric particles. *Journal of Environmental Monitoring* **13**: 621-630.
- Cakar ZP, Alkim C, Turanli B, Tokman N, Akman S, Sarikaya M, Tamerler C, Benbadis L, François JM. 2009. Isolation of cobalt hyper-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* by in vivo evolutionary engineering approach. *Journal of Biotechnology* **143**: 130-138.
- Calabrese EJ, Blain R. 2005. The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. *Toxicology and Applied Pharmacology* **202**: 289-301.
- Cambrolle J, Mateos-Naranjo E, Redondo-Gomez S, Luque T, Figueroa ME. 2011. The role of two *Spartina* species in phytostabilization and bioaccumulation of Co, Cr, and Ni in the Tinto-Odiel estuary (SW Spain). *Hydrobiologia* **671**: 95-103.
- Carrasco L, Azcon R, Kohler J, Roldan A, Caravaca F. 2011. Comparative effects of native filamentous and arbuscular mycorrhizal fungi in the establishment of an autochthonous, leguminous shrub growing in a metal-contaminated soil. *Science of the Total Environment* **409**: 1205-1209.
- Carvalho LM, Cacador I, Martins-Loucao MA. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance root cadmium and copper accumulation in the roots of the salt marsh plant *Aster tripolium* L. *Plant and Soil* **285**: 161-169.

- Ceccaroli P, Saltarelli R, Cesari P, Zambonelli A, Stocchi V. 2001.** Effects of different carbohydrate sources on the growth of *Tuber borchii* Vittad. mycelium strains in pure culture. *Molecular and Cellular Biochemistry* **218**: 65-70.
- Chaerun SK, Pangesti NPD, Toyota K, Whitman WB. 2011.** Changes in microbial functional diversity and activity in paddy soils irrigated with industrial wastewaters in Bandung, West Java Province, Indonesia. *Water Air and Soil Pollution* **217**: 491-502.
- Chaffai R, Elhammadi MA, Seybou TN, Tekitek A, Marzouk B, El Ferjani E. 2007.** Altered fatty acid profile of polar lipids in maize seedlings in response to excess copper. *Journal of Agronomy and Crop Science* **193**: 207-217.
- Chalot M, Blaudez D, Rogaume Y, Provent AS, Pascual C. 2012.** Fate of trace elements during the combustion of phytoremediation wood. *Environmental Science & Technology* **46**: 13361-13369.
- Chen BD, Jakobsen I, Roos P, Zhu YG. 2005a.** Effects of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on uranium uptake and accumulation by *Medicago truncatula* L. from uranium-contaminated soil. *Plant and Soil* **275**: 349-359.
- Chen BD, Liu Y, Shen H, Li XL, Christie P. 2004.** Uptake of cadmium from an experimentally contaminated calcareous soil by arbuscular mycorrhizal maize (*Zea mays* L.). *Mycorrhiza* **14**: 347-354.
- Chen BD, Roos P, Borggaard OK, Zhu YG, Jakobsen I. 2005b.** Mycorrhiza and root hairs in barley enhance acquisition of phosphorus and uranium from phosphate rock but mycorrhiza decreases root to shoot uranium transfer. *New Phytologist* **165**: 591-598.
- Chen BD, Roos P, Zhu YG, Jakobsen I. 2008.** Arbuscular mycorrhizas contribute to phytostabilization of uranium in uranium mining tailings. *Journal of Environmental Radioactivity* **99**: 801-810.
- Chen BD, Zhu YG, Zhang XH, Jakobsen I. 2005c.** The influence of mycorrhiza on uranium and phosphorus uptake by barley plants from a field-contaminated soil. *Environmental science and pollution research* **12**: 325-331.
- Chen J, Wang H, Guo SX. 2012.** Isolation and identification of endophytic and mycorrhizal fungi from seeds and roots of *Dendrobium* (Orchidaceae). *Mycorrhiza* **22**: 297-307.
- Cheng YJ, Holman HY, Lin Z. 2012.** Remediation of chromium and uranium contamination by microbial activity. *Elements* **8**: 107-112.
- Chiffot V, Rivest D, Olivier A, Cogliastro A, Khasa D. 2009.** Molecular analysis of arbuscular mycorrhizal community structure and spores distribution in tree-based intercropping and forest systems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **131**: 32-39.
- Choudhury S, Panda SK. 2005.** Toxic effects, oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under chromium and lead phytotoxicity. *Water Air and Soil Pollution* **167**: 73-90.
- Christie P, Li X, Chen B. 2004.** Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. *Plant and Soil* **261**: 209-217.
- Cicatelli A, Lingua G, Todeschini V, Biondi S, Torrigiani P, Castiglione S. 2010.** Arbuscular mycorrhizal fungi restore normal growth in a white poplar clone grown on heavy metal-contaminated soil, and this is associated with upregulation of foliar metallothionein and polyamine biosynthetic gene expression. *Annals of Botany* **106**: 791-802.
- Citeau L, Bispo A, Bardy M, King D, coordinateurs. 2008.** *Gestion durable des sols*. Versailles: Quae.
- Clemens S, Bloss T, Vess C, Neumann D, Nies DH, Zur Nieden U. 2002.** A transporter in the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe* cells mediates zinc storage and differentially affects transition metal tolerance. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 18215-18221.
- Clemens S, Simm C. 2003.** *Schizosaccharomyces pombe* as a model for metal homeostasis in plant cells: the phytochelatin-dependent pathway is the main cadmium detoxification mechanism. *New Phytologist* **159**: 323-330.
- Collin-Hansen C, Pedersen SA, Andersen RA, Steinnes E. 2007.** First report of phytochelatin in a mushroom: induction of phytochelatin by metal exposure in *Boletus edulis*. *Mycologia* **99**: 161-174.
- Colpaert JV, Adriaensen K, Muller LAH, Lambaerts M, Faes C, Carleer R, Vangronsveld J. 2005.** Element profiles and growth in Zn-sensitive and Zn-resistant Suilloid fungi. *Mycorrhiza* **15**: 628-634.

- Colpaert JV, Muller LAH, Lambaerts M, Adriaensen K, Vangronsveld J. 2004. Evolutionary adaptation to Zn toxicity in populations of Suilloid fungi. *New Phytologist* **162**: 549-559.
- Colpaert JV, Van Assche JA. 1992. Zinc toxicity in ectomycorrhizal *Pinus sylvestris*. *Plant and Soil* **143**: 201-211.
- Colpaert JV, Van Assche JA. 1993. The effects of cadmium on ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* L. *New Phytologist* **123**: 325-333.
- Colpaert JV, Vandenkoornhuyse P, Adriaensen K, Vangronsveld J. 2000. Genetic variation and heavy metal tolerance in the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus luteus*. *New Phytologist* **147**: 367-379.
- Colpaert JV, Wevers JHL, Krznaric E, Adriaensen K. 2011. How metal-tolerant ecotypes of ectomycorrhizal fungi protect plants from heavy metal pollution. *Annals of Forest Science* **68**: 17-24.
- Conklin DS, McMaster JA, Culbertson MR, Kung C. 1992. *COT1*, a gene involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **12**: 3678-3688.
- Cornejo P, Meiera S, Borie G, Rillig MC, Borie F. 2008. Glomalin-related soil protein in a Mediterranean ecosystem affected by a copper smelter and its contribution to Cu and Zn sequestration. *Science of the Total Environment* **406**: 154-160.
- Courbot M, Diez L, Ruotolo R, Chalot M, Leroy P. 2004. Cadmium-responsive thiols in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 7413-7417.
- Dainty SJ, Kennedy CA, Watt S, Bahler J, Whitehall SK. 2008. Response of *Schizosaccharomyces pombe* to zinc deficiency. *Eukaryotic Cell* **7**: 454-464.
- Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW. 2001. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. *FEMS Microbiology Ecology* **36**: 203-209.
- Del Val C, Barea JM, Azcon-Aguilar C. 1999. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 718-723.
- Delhaize E, Kataoka T, Hebb DM, White RG, Ryan PR. 2003. Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance. *Plant Cell* **15**: 1131-1142.
- Delplanque M, Collet S, Del Gratta F, Schnuriger B, Gaucher R, Robinson B, Bert V. 2013. Combustion of *Salix* used for phytoextraction: The fate of metals and viability of the processes. *Biomass and Bioenergy* **49**: 160-170.
- Deneux-Mustin S, Roussel-Debet S, Mustin C, Henner P, Munier-Lamy C, Colle C, Berthelin J, Garnier-Laplace J, Leyval C. 2003. *Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces : influence des micro-organismes du sol*. Paris: Tec et Doc.
- Dère C, Lamy I, Jaulin A, Cornu S. 2007. Long-term fate of exogenous metals in a sandy Luvisol subjected to intensive irrigation with raw wastewater. *Environmental Pollution* **145**: 31-40.
- Dermont G, Bergeron M, Mercier G, Richer-Lafleche M. 2008. Soil washing for metal removal: A review of physical/chemical technologies and field applications. *Journal of Hazardous Materials* **152**: 1-31.
- Dhillon SS. 1994. Ectomycorrhizae, arbuscular mycorrhizae, and *Rhizoctonia* sp of alpine and boreal *Salix* spp in Norway. *Arctic and Alpine Research* **26**: 304-307.
- Di Baccio D, Tognetti R, Sebastiani L, Vitagliano C. 2003. Responses of *Populus deltoides* x *Populus nigra* (*Populus* x *euramericana*) clone I-214 to high zinc concentrations. *New Phytologist* **159**: 443-452.
- Di Battista C, Selosse MA, Bouchard D, Stenstrom E, LeTacon F. 1996. Variations in symbiotic efficiency, phenotypic characters and ploidy level among different isolates of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* strain S 238. *Mycological Research* **100**: 1315-1324.
- Diss L, Blaudez D, Gelhaye E, Chalot M. 2011. Genome-wide analysis of fungal manganese transporters, with an emphasis on *Phanerochaete chrysosporium*. *Environmental Microbiology Reports* **3**: 367-382.
- Djied L. 2010. *Rapport de M1 : Test de tolérance aux métaux lourds de Paxillus involutus et identification moléculaire de champignons en interaction avec les racines de peuplier dans un sol pollué*. Université de Lorraine. Vandoeuvre-lès-Nancy.
- Doidy J, Grace E, Kuhn C, Simon-Plas F, Casieri L, Wipf D. 2012. Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. *Trends in Plant Science* **17**: 413-422.
- Doillon D. 2010. *thèse : Déterminants moléculaires de la tolérance au zinc des microorganismes eucaryotes*. Université de Lorraine. Vandoeuvre-lès-Nancy.

- Dominguez MT, Madrid F, Maranon T, Murillo JM. 2009.** Cadmium availability in soil and retention in oak roots: Potential for phytostabilization. *Chemosphere* **76**: 480-486.
- Dominguez MT, Maranon T, Murillo JM, Redondo-Gomez S. 2011.** Response of Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota*) and mastic shrub (*Pistacia lentiscus* L.) seedlings to high concentrations of Cd and Tl in the rhizosphere. *Chemosphere* **83**: 1166-1174.
- Douay F, Pruvot C, Waterlot C, Fritsch C, Fourrier H, Loriette A, Bidar G, Grand C, de Vaufleury A, Scheifler R. 2009.** Contamination of woody habitat soils around a former lead smelter in the North of France. *Science of the Total Environment* **407**: 5564-5577.
- Driver JD, Holben WE, Rillig MC. 2005.** Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry* **37**: 101-106.
- Duckett JG, Read DJ. 1995.** Ericoid mycorrhizas and rhizoid-ascomycete associations in liverworts share the same mycobiont - Isolation of the partners and resynthesis of the associations in-vitro. *New Phytologist* **129**: 439-477.
- Echevarria G, Morel JL, Fardeau JC, Leclerc-Cessac E. 1998.** Assessment of phytoavailability of nickel in soils. *Journal of Environmental Quality* **27**: 1064-1070.
- Egli S. 2011.** Mycorrhizal mushroom diversity and productivity-an indicator of forest health? *Annals of Forest Science* **68**: 81-88.
- Ehsan M, Santamaria-Delgado K, Vázquez-Alarcon A, Alderete-Chavez A, de la cruz-Landero N, Jaen-Contreras D, Augustine Molumeli P. 2009.** Phytostabilization of cadmium contaminated soils by *Lupinus uncinatus* Schldl. *Spanish Journal Of Agricultural Research* **7**: 390-397.
- Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot ML. 1996.** A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 5624-5628.
- Eide DJ. 2003.** Multiple regulatory mechanisms maintain zinc homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Nutrition* **133**: 1532S-1535S.
- Eide DJ. 2006.** Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1763**: 711-722.
- Eide DJ. 2009.** Homeostatic and adaptive responses to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 18565-18569.
- El Aafi N, Brhada F, Dary M, Maltouf AF, Pajuelo E. 2012.** Rhizostabilization of metals in soils using *Lupinus luteus* inoculated with the metal resistant rhizobacterium *Serratia* sp. MSMC541. *International Journal of Phytoremediation* **14**: 261-274.
- El Kassis E, Cathala N, Rouached H, Fourcroy P, Berthomieu P, Terry N, Davidian JC. 2007.** Characterization of a selenate-resistant *Arabidopsis* mutant. Root growth as a potential target for selenate toxicity. *Plant Physiology* **143**: 1231-1241.
- Ellis CD, MacDiarmid CW, Eide DJ. 2005.** Heteromeric protein complexes mediate zinc transport into the secretory pathway of eukaryotic cells. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 28811-28818.
- Errard A. 2010.** Rapport de M1 : Identification moléculaire et tests de tolérance de champignons mycorrhiziens en interaction avec les racines de peuplier issus d'un sol pollué aux métaux lourds. Université de Lorraine. Vandoeuvre-lès-Nancy.
- Fernandez-Calvino D, Arias-Estevez M, Diaz-Ravina M, Baath E. 2011.** Bacterial pollution induced community tolerance (PICT) to Cu and interactions with pH in long-term polluted vineyard soils. *Soil Biology & Biochemistry* **43**: 2324-2331.
- Ferrol N, Gonzalez-Guerrero M, Valderas A, Benabdellah K, Azcon-Aguilar C. 2009.** Survival strategies of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. *Phytochemistry Reviews* **8**: 551-559.
- Fomina MA, Alexander IJ, Colpaert JV, Gadd GM. 2005.** Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry* **37**: 851-866.
- Fransson PMA, Anderson IC, Alexander IJ. 2007.** Ectomycorrhizal fungi in culture respond differently to increased carbon availability. *FEMS Microbiology Ecology* **61**: 246-257.
- Frey-Klett P, Garbaye J, Tarkka M. 2007.** The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist* **176**: 22-36.

- Frey AG, Eide DJ. 2011.** Roles of two activation domains in Zap1 in the response to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 6844-6854.
- Fritsch C, Coeurdassier M, Giraudoux P, Raoul F, Douay F, Rieffel D, de Vaufléury A, Scheiffler R. 2011.** Spatially explicit analysis of metal transfer to biota: influence of soil contamination and landscape. *Plos One* **6**.
- Fukunaka A, Suzuki T, Kurokawa Y, Yamazaki T, Fujiwara N, Ishihara K, Migaki H, Okumura K, Masuda S, Yamaguchi-Iwai Y, Nagao M, Kambe T. 2009.** Demonstration and characterization of the heterodimerization of ZnT5 and ZnT6 in the early secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 30798-30806.
- Gadd GM. 1993.** Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist* **124**: 25-60.
- Gadd GM, Rhee YJ, Stephenson K, Wei Z. 2012.** Geomycology: metals, actinides and biominerals. *Environmental Microbiology Reports* **4**: 270-296.
- Gaither LA, Eide DJ. 2001.** Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *BioMetals* **14**: 251-270.
- Galanis A, Karapetsas A, Sandaltzopoulos R. 2009.** Metal-induced carcinogenesis, oxidative stress and hypoxia signalling. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **674**: 31-35.
- Gardes M, Bruns TD. 1993.** ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* **2**: 113-118.
- Garg N, Aggarwal N. 2012.** Effect of mycorrhizal inoculations on heavy metal uptake and stress alleviation of *Cajanus cajan* (L.) Millsp genotypes grown in cadmium and lead contaminated soils. *Plant Growth Regulation* **66**: 9-26.
- Gaur A, Adholeya A. 2004.** Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Science* **86**: 528-534.
- Gay G. 1990.** Effect of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma hiemale* on adventitious root formation in derooted *Pinus halepensis* shoot hypocotyls. *Canadian Journal of Botany* **68**: 1265-1270.
- Gehring CA, Mueller RC, Whitham TG. 2006.** Environmental and genetic effects on the formation of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal associations in cottonwoods. *Oecologia* **149**: 158-164.
- Gianinazzi S, Gollotte A, Binet MN, van Tuinen D, Redecker D, Wipf D. 2010.** Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* **20**: 519-530.
- Gibson BR, Mitchell DT. 2004.** Nutritional influences on the solubilization of metal phosphate by ericoid mycorrhizal fungi. *Mycological Research* **108**: 947-954.
- Gibson BR, Mitchell DT. 2005.** Influence of pH on copper and zinc sensitivity of ericoid mycobionts in vitro. *Mycorrhiza* **15**: 231-234.
- Gietz D, Stjean A, Woods RA, Schiestl RH. 1992.** Improved method for high-efficiency transformation of intact yeast-cells. *Nucleic Acids Research* **20**: 1425-1425.
- Gilbert GS, Ferrer A, Carranza J. 2002.** Polypore fungal diversity and host density in a moist tropical forest. *Biodiversity and Conservation* **11**: 947-957.
- Giller KE, Witter E, McGrath SP. 1998.** Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. *Soil Biology and Biochemistry* **30**: 1389-1414.
- Gitan RS, Eide DJ. 2000.** Zinc-regulated ubiquitin conjugation signals endocytosis of the yeast ZRT1 zinc transporter. *Biochemical Journal* **346**: 329-336.
- Gitan RS, Luo H, Rodgers J, Broderius M, Eide D. 1998.** Zinc-induced inactivation of the yeast ZRT1 zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 28617-28624.
- Gitan RS, Shababi M, Kramer M, Eide DJ. 2003.** A cytosolic domain of the yeast ZRT1 zinc transporter is required for its post-translational inactivation in response to zinc and cadmium. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 39558-39564.
- Godin PM, Feinberg MH, Ducauze CJ. 1985.** Modelling of soil contamination by airborne lead and cadmium around several emission sources. *Environmental Pollution Series B: Chemical and Physical* **10**: 97-114.

- Göhre V, Paszkowski U. 2006.** Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* **223**: 1115-1122.
- Goncalves SC, Martins-Loucao MA, Freitas H. 2009.** Evidence of adaptive tolerance to nickel in isolates of *Cenococcum geophilum* from serpentine soils. *Mycorrhiza* **19**: 221-230.
- Gonzalez-Chavez C, D'Haen J, Vangronsveld J, Dodd JC. 2002.** Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. *Plant and Soil* **240**: 287-297.
- Gonzalez-Guerrero M, Azcon-Aguilar C, Mooney M, Valderas A, MacDiarmid CW, Eide DJ, Ferrol N. 2005.** Characterization of a *Glomus intraradices* gene encoding a putative Zn transporter of the cation diffusion facilitator family. *Fungal Genetics and Biology* **42**: 130-140.
- Gonzalez-Guerrero M, Cano C, Azcon-Aguilar C, Ferrol N. 2007.** GintMT1 encodes a functional metallothionein in *Glomus intraradices* that responds to oxidative stress. *Mycorrhiza* **17**: 327-335.
- Grignet A. 2012.** Rapport de M2 : Phytostabilisation de sols pollués par des métaux lourds assistée par des champignons mycorrhiziens et le biochar. Université de Lorraine. Vandoeuvre-lès-Nancy.
- Grison C, Escarré J. 2012.** Plantes hyperaccumulatrices de manganèse, sources de catalyseurs et réactifs de synthèse organique. **Brevet n° 1000157898**: déposé le 21 juillet 2012.
- Grison C, Escarre J, Losfeld G. 2012.** Utilisation de certaines plantes accumulatrices de métaux pour la mise en œuvre de réactions chimiques. **Brevet n° 1000142593**: déposé le 6 mars 2012
- Guedry O, Lazard M, Delort F, Dauplais M, Grigoras I, Blanquet S, Plateau P. 2003.** Ycf1p-dependent Hg(II) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* **270**: 2486-2496.
- Guerinot ML. 2000.** The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1465**: 190-198.
- Guidot A, Debaud JC, Marmeisse R. 2001.** Correspondence between genet diversity and spatial distribution of above- and below-ground populations of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Molecular Ecology* **10**: 1121-1131.
- Guidot A, Verner MC, Debaud JC, Marmeisse R. 2005.** Intraspecific variation in use of different organic nitrogen sources by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Mycorrhiza* **15**: 167-177.
- Gunawardana B, Singhal N, Johnson A. 2010.** Amendments and their combined application for enhanced copper, cadmium, lead uptake by *Lolium perenne*. *Plant and Soil* **329**: 283-294.
- Guney M, Zagury GJ, Dogan N, Onay TT. 2010.** Exposure assessment and risk characterization from trace elements following soil ingestion by children exposed to playgrounds, parks and picnic areas. *Journal of Hazardous Materials* **182**: 656-664.
- Guo GL, Zhou QX, Ma LQ. 2006.** Availability and assessment of fixing additives for the in situ remediation of heavy metal contaminated soils: A review. *Environmental Monitoring and Assessment* **116**: 513-528.
- Guo JB, Dai XJ, Xu WZ, Ma M. 2008.** Overexpressing *GSH1* and *AsPCS1* simultaneously increases the tolerance and accumulation of cadmium and arsenic in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere* **72**: 1020-1026.
- Hall JL. 2002.** Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1-11.
- Hall JL, Williams LE. 2003.** Transition metal transporters in plants. *Journal of Experimental Botany* **54**: 2601-2613.
- Hamzeh M, Dayanandan S. 2004.** Phylogeny of *Populus* (Salicaceae) based on nucleotide sequences of chloroplast TRNT-TRNF region and nuclear rDNA. *American Journal of Botany* **91**: 1398-1408.
- Harris AT, Naidoo K, Nokes J, Walker T, Orton F. 2009.** Indicative assessment of the feasibility of Ni and Au phytomining in Australia. *Journal of Cleaner Production* **17**: 194-200.
- Hassan SED, Boon E, St-Arnaud M, Hijri M. 2011.** Molecular biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trace metal-polluted soils. *Molecular Ecology* **20**: 3469-3483.
- Hegedus N, Emri T, Szilagyi J, Karanyi Z, Nagy I, Penninckx MJ, Pocsí I. 2007.** Effect of heavy metals on the glutathione status in different ectomycorrhizal *Paxillus involutus* strains. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **23**: 1339-1343.

- Homer FA, Morrison RS, Brooks RR, Clemens J, Reeves RD. 1991. Comparative studies of nickel, cobalt, and copper uptake by some nickel hyperaccumulators of the genus *Alyssum*. *Plant and Soil* **138**: 195-205.
- Hostynek JJ. 2003. Factors determining percutaneous metal absorption. *Food and Chemical Toxicology* **41**: 327-345.
- Houba VJG, Lexmond TM, Novozamsky I, vanderLee JJ. 1996. State of the art and future developments in soil analysis for bioavailability assessment. *Science of the Total Environment* **178**: 21-28.
- Hryniewicz K, Baum C, Leinweber P, Weih M, Dimitriou I. 2010. The significance of rotation periods for mycorrhiza formation in Short Rotation Coppice. *Forest Ecology and Management* **260**: 1943-1949.
- Hryniewicz K, Dabrowska G, Baum C, Niedojadlo K, Leinweber P. 2012. Interactive and single effects of ectomycorrhiza formation and *Bacillus cereus* on metallothionein MT1 expression and phytoextraction of Cd and Zn by willows. *Water Air and Soil Pollution* **223**: 957-968.
- Huang YT, Hseu ZY, Hsi HC. 2011. Influences of thermal decontamination on mercury removal, soil properties, and repartitioning of coexisting heavy metals. *Chemosphere* **84**: 1244-1249.
- Hughes E, Mitchell DT. 1995. Utilization of sucrose by *Hymenoscyphus ericae* (an ericoid endomycorrhizal fungus) and ectomycorrhizal fungi. *Mycological Research* **99**: 1233-1238.
- Hussein S, Ruiz ON, Terry N, Daniell H. 2007. Phytoremediation of mercury and organomercurials in chloroplast transgenic plants: Enhanced root uptake, translocation to shoots, and volatilization. *Environmental Science & Technology* **41**: 8439-8446.
- Jacob C, Courbot M, Brun A, Steinman HM, Jacquot JP, Botton B, Chalot M. 2001. Molecular cloning, characterization and regulation by cadmium of a superoxide dismutase from the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *European Journal of Biochemistry* **268**: 3223-3232.
- Jacob C, Courbot ML, Martin F, Brun A, Chalot M. 2004. Transcriptomic responses to cadmium in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Febs Letters* **576**: 423-427.
- Jean-Philippe SR, Franklin JA, Buckley DS, Hughes K. 2011. The effect of mercury on trees and their mycorrhizal fungi. *Environmental Pollution* **159**: 2733-2739.
- Jentschke G, Winter S, Godbold DL. 1999. Ectomycorrhizas and cadmium toxicity in Norway spruce seedlings. *Tree Physiology* **19**: 23-30.
- Johansson EM, Fransson PMA, Finlay RD, van Hees PAW. 2008. Quantitative analysis of root and ectomycorrhizal exudates as a response to Pb, Cd and As stress. *Plant and Soil* **313**: 39-54.
- Jomova K, Baros S, Valko M. 2012. Redox active metal-induced oxidative stress in biological systems. *Transition Metal Chemistry* **37**: 127-134.
- Joner EJ, Briones R, Leyval C. 2000. Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant and Soil* **226**: 227-234.
- Jourand P, Ducouso M, Loulergue-Majorel C, Hannibal L, Santoni S, Prin Y, Lebrun M. 2010a. Ultramafic soils from New Caledonia structure *Pisolithus albus* in ecotype. *FEMS Microbiology Ecology* **72**: 238-249.
- Jourand P, Ducouso M, Reid R, Majorel C, Richert C, Riss J, Lebrun M. 2010b. Nickel-tolerant ectomycorrhizal *Pisolithus albus* ultramafic ecotype isolated from nickel mines in New Caledonia strongly enhance growth of the host plant *Eucalyptus globulus* at toxic nickel concentrations. *Tree Physiology* **30**: 1311-1319.
- Jumpponen A. 2001. Dark septate endophytes - are they mycorrhizal? *Mycorrhiza* **11**: 207-211.
- Kachout SS, Ben Mansoura A, Mechergui R, Leclerc JC, Rejeb MN, Ouerghi Z. 2012. Accumulation of Cu, Pb, Ni and Zn in the halophyte plant *Atriplex* grown on polluted soil. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **92**: 336-342.
- Kalac P. 2010. Trace element contents in European species of wild growing edible mushrooms: A review for the period 2000-2009. *Food Chemistry* **122**: 2-15.
- Kaldorf M, Renker C, Fladung M, Buscot F. 2004. Characterization and spatial distribution of ectomycorrhizas colonizing aspen clones released in an experimental field. *Mycorrhiza* **14**: 295-306.
- Kambe T, Narita H, Yamaguchi-Iwai Y, Hirose J, Amano T, Sugiura N, Sasaki R, Mori K, Iwanaga T, Nagao M. 2002. Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, zinc transporter 5, abundantly expressed in pancreatic beta cells. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 19049-19055.

- Kamizono A, Nishizawa M, Teranishi Y, Murata K, Kimura A. 1989. Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & General Genetics* **219**: 161-167.
- Kandeler E, Kampichler C, Horak O. 1996. Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biology and Fertility of Soils* **23**: 299-306.
- Kaplan O, Yildirim NC, Yildirim N, Cimen M. 2011. Toxic elements in animal products and environmental health. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* **6**: 228-232.
- Karlinski L, Rudawska M, Kieliszewska-Rokicka B, Leski T. 2010. Relationship between genotype and soil environment during colonization of poplar roots by mycorrhizal and endophytic fungi. *Mycorrhiza* **20**: 315-324.
- Kerkeb L, Mukherjee I, Chatterjee I, Lahner B, Salt DE, Connolly EL. 2008. Iron-induced turnover of the *Arabidopsis* IRON- REGULATED TRANSPORTER1 metal transporter requires lysine residues. *Plant Physiology* **146**: 1964-1973.
- Khasa PD, Chakravarty P, Robertson A, Thomas BR, Dancik BP. 2002. The mycorrhizal status of selected poplar clones introduced in Alberta. *Biomass and Bioenergy* **22**: 99-104.
- Khouja HR, Abbã S, Lacercat-Didier L, Daghino S, Doillon D, Richaud P, Martino E, Vallino M, Perotto S, Chalot M, Blaudez D. 2013. OmZnT1 and OmFET, two metal transporters from the metal-tolerant strain Zn of the ericoid mycorrhizal fungus *Oidiodendron maius*, confer zinc tolerance in yeast. *Fungal Genetics and Biology* **52**: 53-64.
- Kidd P, Barcelo J, Bernal MP, Navari-Izzo F, Poschenrieder C, Shilev S, Clemente R, Monterroso C. 2009. Trace element behaviour at the root-soil interface: Implications in phytoremediation. *Environmental and Experimental Botany* **67**: 243-259.
- Kiffer E, Morelet M. 1997. *Les Deutéromycètes : classification et clés d'indentification générique*. Paris: Inra.
- King DJ, Doronila AI, Feenstra C, Baker AJM, Woodrow IE. 2008. Phytostabilisation of arsenical gold mine tailings using four *Eucalyptus* species: Growth, arsenic uptake and availability after five years. *Science of the Total Environment* **406**: 35-42.
- Kiranmayi P, Tiwari A, Sagar KP, Haritha A, Mohan PM. 2009. Functional characterization of Tzn1 and Tzn2-zinc transporter genes in *Neurospora crassa*. *BioMetals* **22**: 411-420.
- Kjoller R, Olsrud M, Michelsen A. 2010. Co-existing ericaceous plant species in a subarctic mire community share fungal root endophytes. *Fungal Ecology* **3**: 205-214.
- Klugh KR, Cumming JR. 2007. Variations in organic acid exudation and aluminum resistance among arbuscular mycorrhizal species colonizing *Liriodendron tulipifera*. *Tree Physiology* **27**: 1103-1112.
- Koedrith P, Seo YR. 2011. Advances in carcinogenic metal toxicity and potential molecular markers. *International Journal of Molecular Sciences* **12**: 9576-9595.
- Koide RT, Fernandez C, Petprakob K. 2011. General principles in the community ecology of ectomycorrhizal fungi. *Annals of Forest Science* **68**: 45-55.
- Korshunova YO, Eide D, Clark WG, Guerinot ML, Pakrasi HB. 1999. The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Molecular Biology* **40**: 37-44.
- Koster M, Reijnders L, van Oost NR, Peijnenburg W. 2005. Comparison of the method of diffusive gels in thin films with conventional extraction techniques for evaluating zinc accumulation in plants and isopods. *Environmental Pollution* **133**: 103-116.
- Kozdroj J, Piotrowska-Seget Z, Krupa P. 2007. Mycorrhizal fungi and ectomycorrhiza associated bacteria isolated from an industrial desert soil protect pine seedlings against Cd(II) impact. *Ecotoxicology* **16**: 449-456.
- Krpata D, Peintner U, Langer I, Fitz WJ, Schweiger P. 2008. Ectomycorrhizal communities associated with *Populus tremula* growing on a heavy metal contaminated site. *Mycological Research* **112**: 1069-1079.
- Krupa P, Kozdroj J. 2007. Ectomycorrhizal fungi and associated bacteria provide protection against heavy metals in inoculated pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Water, Air, and Soil Pollution* **182**: 83-90.
- Krznaric E, Verbruggen N, Wevers JHL, Carleer R, Vangronsveld J, Colpaert JV. 2009. Cd-tolerant *Suillus luteus*: A fungal insurance for pines exposed to Cd. *Environmental Pollution* **157**: 1581-1588.

- Krznaric E, Wevers JHL, Cloquet C, Vangronsveld J, Vanhaecke F, Colpaert JV. 2010. Zn pollution counteracts Cd toxicity in metal-tolerant ectomycorrhizal fungi and their host plant, *Pinus sylvestris*. *Environmental Microbiology* **12**: 2133-2141.
- Kumànovics A, Poruk KE, Osborn KA, Ward DM, Kaplan J. 2006. YKE4 (YIL023C) encodes a bidirectional zinc transporter in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 22566-22574.
- Kuperman RG, Carreiro MM. 1997. Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry* **29**: 179-190.
- Kwasna H, Bateman GL, Ward E. 2008. Determining species diversity of microfungial communities in forest tree roots by pure-culture isolation and DNA sequencing. *Applied Soil Ecology* **40**: 44-56.
- Laczko E, Boller T, Wiemken V. 2004. Lipids in roots of *Pinus sylvestris* seedlings and in mycelia of *Pisolithus tinctorius* during ectomycorrhiza formation: changes in fatty acid and sterol composition. *Plant Cell and Environment* **27**: 27-40.
- Lamy I, Denaix L, Chaussod R, Schwartz C, Baize D, Bermont A 2004. Projet EPANDAGRI : Etude d'un secteur agricole pollué par des épandages d'eaux usées : Bilan environnemental et possibilités de reconversion végétales. In. Versailles: INRA.
- Langer I, Krpata D, Peintner U, Wenzel WW, Schweiger P. 2008. Media formulation influences in vitro ectomycorrhizal synthesis on the European aspen *Populus tremula* L. *Mycorrhiza* **18**: 297-307.
- Langer I, Santner J, Krpata D, Fitz WJ, Wenzel WW, Schweiger PF. 2012. Ectomycorrhizal impact on Zn accumulation of *Populus tremula* L. grown in metalliferous soil with increasing levels of Zn concentration. *Plant and Soil* **355**: 283-297.
- Lecomte P. 1998. *Les sites pollués : Traitement des sols et des eaux souterraines*. Paris: Tec & doc.
- Lee J, Lee S, Young JPW. 2008. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology* **65**: 339-349.
- Lefebvre A. 2012. *Rapport de M1 : Phytostabilisation de sols pollués par des métaux lourds assistée par des champignons mycorrhiziens : quantification et identification de champignons bénéfiques à la phytostabilisation*. Université de Lorraine. Vandoeuvre-lès-Nancy.
- Lefevre I, Marchal G, Correal E, Zanuzzi A, Lutts S. 2009. Variation in response to heavy metals during vegetative growth in *Dorycnium pentaphyllum* Scop. *Plant Growth Regulation* **59**: 1-11.
- Legrand L, Tap J, Gauthey C, Doré J, Caron C, Leclerc M 2008. RapidOTU: A fast pipeline to analyze 16S rDNA sequences by alignment or tetranucleotide frequency. In. *Gut Microbiome Symposium 2008. 6th congress INRA Rowett Research Institut*. Clermont-Ferrand.
- Leonard SS, Harris GK, Shi XL. 2004. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine* **37**: 1921-1942.
- Lesà B, Aneggi E, Rossi G, Comuzzi C, Goi D. 2009. Bench-scale tests on ultrasound-assisted acid washing and thermal desorption of mercury from dredging sludge and other solid matrices. *Journal of Hazardous Materials* **171**: 647-653.
- Lestan D, Luo CL, Li XD. 2008. The use of chelating agents in the remediation of metal-contaminated soils: A review. *Environmental Pollution* **153**: 3-13.
- Leyval C, Turnau K, Haselwandter K. 1997. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: Physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* **7**: 139-153.
- Li L, Kaplan J. 1997. Characterization of two homologous yeast genes that encode mitochondrial iron transporters. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 28485-28493.
- Li L, Kaplan J. 2001. The yeast gene *MSC2*, a member of the Cation Diffusion Facilitator family, affects the cellular distribution of zinc. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 5036-5043.
- Li T, Liu MJ, Zhang XT, Zhang HB, Sha T, Zhao ZW. 2011. Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*. *Science of the Total Environment* **409**: 1069-1074.
- Li ZS, Lu YP, Zhen RG, Szczypka M, Thiele DJ, Rea PA. 1997. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 42-47.

- Liang CC, Li T, Xiao YP, Liu MJ, Zhang HB, Zhao ZW. 2009.** Effects of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi on maize grown in multi-metal contaminated soils. *International Journal of Phytoremediation* **11**: 692-703.
- Likar M, Regvar M. 2009.** Application of temporal temperature gradient gel electrophoresis for characterisation of fungal endophyte communities of *Salix caprea* L. in a heavy metal polluted soil. *Science of the Total Environment* **407**: 6179-6187.
- Lin SJ, Culotta VC. 1996.** Suppression of oxidative damage by *Saccharomyces cerevisiae* ATX2, which encodes a manganese-trafficking protein that localizes to Golgi-like vesicles. *Molecular and Cellular Biology* **16**: 6303-6312.
- Lindsay WL, Norvell WA. 1978.** Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. *Soil Science Society of America* **42**: 421-428.
- Lingua G, Franchin C, Todeschini V, Castiglione S, Biondi S, Burlando B, Parravicini V, Torrigiani P, Berta G. 2008.** Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect the response to high zinc concentrations of two registered poplar clones. *Environmental Pollution* **153**: 137-147.
- Liu Y, Zhu YG, Chen BD, Christie P, Li XL. 2005.** Yield and arsenate uptake of arbuscular mycorrhizal tomato colonized by *Glomus mosseae* BEG167 in As spiked soil under glasshouse conditions. *Environment International* **31**: 867-873.
- Long LK, Yao Q, Guo J, Yang RH, Huang YH, Zhu HH. 2010.** Molecular community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with five selected plant species from heavy metal polluted soils. *European Journal of Soil Biology* **46**: 288-294.
- Lopareva-Pohu A, Pourrut B, Waterlot C, Garcon G, Bidar G, Pruvot C, Shirali P, Douay F. 2011.** Assessment of fly ash-aided phytostabilisation of highly contaminated soils after an 8-year field trial Part 1. Influence on soil parameters and metal extractability. *Science of the Total Environment* **409**: 647-654.
- Lopez-Luna J, Gonzalez-Chavez MC, Esparza-Garcia FJ, Rodriguez-Vazquez R. 2009.** Toxicity assessment of soil amended with tannery sludge, trivalent chromium and hexavalent chromium, using wheat, oat and sorghum plants. *Journal of Hazardous Materials* **163**: 829-834.
- Lopez-Luna J, Gonzalez-Chavez MC, Esparza-Garcia FJ, Rodriguez-Vazquez R. 2012.** Fractionation and availability of heavy metals in tannery sludge-amended soil and toxicity assessment on the fully-grown *Phaseolus vulgaris* cultivars. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* **47**: 405-419.
- Lovley DR. 1993.** Dissimilatory Metal Reduction. *Annual Review of Microbiology* **47**: 263-290.
- Lyyra S, Meagher RB, Kim T, Heaton A, Montello P, Balish RS, Merkle SA. 2007.** Coupling two mercury resistance genes in Eastern cottonwood enhances the processing of organomercury. *Plant Biotechnology Journal* **5**: 254-262.
- Ma Y, Prasad MNV, Rajkumar M, Freitas H. 2011.** Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances* **29**: 248-258.
- MacDiarmid CW, Gaither LA, Eide D. 2000.** Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal* **19**: 2845-2855.
- MacDiarmid CW, Milanick MA, Eide DJ. 2002.** Biochemical properties of vacuolar zinc transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 39187-39194.
- Madejon P, Maranon T, Murillo JM, Robinson B. 2004.** White poplar (*Populus alba*) as a biomonitor of trace elements in contaminated riparian forests. *Environmental Pollution* **132**: 145-155.
- Maestri E, Marmioli N. 2011.** Transgenic plants for phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation* **13**: 264-279.
- Mains D, Craw D, Rufaut CG, Smith CMS. 2006.** Phytostabilization of gold mine tailings from New Zealand. Part 2: Experimental evaluation of arsenic mobilization during revegetation. *International Journal of Phytoremediation* **8**: 163-183.
- Mandyam K, Jumpponen A. 2005.** Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Studies in Mycology*: 173-189.

- Manousaki E, Kalogerakis N. 2011.** Halophytes-an emerging trend in phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation* **13**: 959-969.
- Margoshes M, Vallee BL. 1957.** A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of American Chemical Society* **79**: 4813-4814.
- Marques APGC, Oliveira RS, Samardjieva KA, Pissarra J, Rangel AOSS, Castro PML. 2007.** *Solanum nigrum* grown in contaminated soil: Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on zinc accumulation and histolocalisation. *Environmental Pollution* **145**: 691-699.
- Martin F, Aerts A, Ahrén D, Brun A, Danchin EGJ, Duchaussoy F, Gibon J, Kohler A, Lindquist E, Pereda V, Salamov A, Shapiro HJ, Wuyts J, Blaudez D, Buée M, Brokstein P, Canback B, Cohen D, Courty PE, Coutinho PM, Delaruelle C, Detter JC, Deveau A, DiFazio S, Duplessis S, Fraissinet-Tachet L, Lucic E, Frey-Klett P, Fourrey C, Feussner I, Gay G, Grimwood J, Hoegger PJ, Jain P, Kilaru S, Labbé J, Lin YC, Legué V, Le Tacon F, Marmeisse R, Melayah D, Montanini B, Muratet M, Nehls U, Niculita-Hirzel H, Secq MPOL, Peter M, Quesneville H, Rajashekar B, Reich M, Rouhier N, Schmutz J, Yin T, Chalot M, Henrissat B, Kües U, Lucas S, Van De Peer Y, Podila GK, Polle A, Pukkila PJ, Richardson PM, Rouzé P, Sanders IR, Stajich JE, Tunlid A, Tuskan G, Grigoriev IV. 2008.** The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* **452**: 88-92.
- Martin F, Kohler A, Duplessis S. 2007.** Living in harmony in the wood underground: ectomycorrhizal genomics. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 204-210.
- Martinez-Fernandez D, Walker DJ. 2012.** The effects of soil amendments on the growth of *Atriplex halimus* and *Bituminaria bituminosa* in heavy metal-contaminated soils. *Water Air and Soil Pollution* **223**: 63-72.
- Martino E, Perotto S, Parsons R, Gadd GM. 2003.** Solubilization of insoluble inorganic zinc compounds by ericoid mycorrhizal fungi derived from heavy metal polluted sites. *Soil Biology & Biochemistry* **35**: 133-141.
- Martino E, Turnau K, Girlanda M, Bonfante P, Perotto S. 2000.** Ericoid mycorrhizal fungi from heavy metal polluted soils: their identification and growth in the presence of zinc ions. *Mycological Research* **104**: 338-344.
- Meers E, Samson R, Tack FMG, Ruttens A, Vandegehuchte M, Vangronsveld J, Verloo MG. 2007a.** Phytoavailability assessment of heavy metals in soils by single extractions and accumulation by *Phaseolus vulgaris*. *Environmental and Experimental Botany* **60**: 385-396.
- Meers E, Vandecasteele B, Ruttens A, Vangronsveld J, Tack FMG. 2007b.** Potential of five willow species (*Salix* spp.) for phytoextraction of heavy metals. *Environmental and Experimental Botany* **60**: 57-68.
- Meier S, Alvear M, Borie F, Aguilera P, Ginocchio R, Cornejo P. 2012.** Influence of copper on root exudate patterns in some metallophytes and agricultural plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **75**: 8-15.
- Mench M, Lepp N, Bert V, Schwitzguebel JP, Gawronski SW, Schroder P, Vangronsveld J. 2010.** Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *Journal of Soils and Sediments* **10**: 1039-1070.
- Mendez MO, Maier RM. 2008a.** Phytoremediation of mine tailings in temperate and arid environments. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **7**: 47-59.
- Mendez MO, Maier RM. 2008b.** Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments - An emerging remediation technology. *Environmental Health Perspectives* **116**: 278-283.
- Menkis A, Vasaitis R. 2011.** Fungi in roots of nursery grown *Pinus sylvestris*: Ectomycorrhizal colonisation, genetic diversity and spatial distribution. *Microbial Ecology* **61**: 52-63.
- Menkis A, Vasiliauskas R, Taylor AFS, Stenlid J, Finlay R. 2005.** Fungal communities in mycorrhizal roots of conifer seedlings in forest nurseries under different cultivation systems, assessed by morphotyping, direct sequencing and mycelial isolation. *Mycorrhiza* **16**: 33-41.
- Mertens J, Van Nevel L, De Schrijver A, Piesschaert F, Oosterbaan A, Tack FMG, Verheyen K. 2007.** Tree species effect on the redistribution of soil metals. *Environmental Pollution* **149**: 173-181.
- Migeon A. 2009.** Thèse : Etude de la variabilité naturelle dans la réponse du peuplier aux métaux : bases physiologiques et exploitation en phytoremédiation. Université de Lorraine. Vandoeuvre-lès-Nancy.

- Migeon A, Richaud P, Guinet F, Blaudez D, Chalot M. 2012.** Hydroponic screening of poplar for trace element tolerance and accumulation. *International Journal of Phytoremediation* **14**: 350-361.
- Migeon A, Richaud P, Guinet F, Chalot M, Blaudez D. 2009.** Metal accumulation by woody species on contaminated sites in the north of France. *Water, Air, and Soil Pollution* **204**: 89-101.
- Minet M, Dufour ME, Lacroute F. 1992.** Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. *Plant Journal* **2**: 417-422.
- Mingorance MD, Leidi EO, Valdes B, Oliva SR. 2012.** Evaluation of lead toxicity in *Erica andevalensis* as an alternative species for revegetation of contaminated soils. *International Journal of Phytoremediation* **14**: 174-185.
- Miyabe S, Izawa S, Inoue Y. 2000.** Expression of ZRC1 coding for suppressor of zinc toxicity is induced by zinc-starvation stress in Zap1-dependent fashion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **276**: 879-884.
- Molins H. 2007.** rapport de M2 : Homéostasie et tolérance au zinc chez *Laccaria bicolor*. Université de Lorraine. Vandoeuvre-lès-Nancy.
- Monnet F, Vaillant N, Hitmi A, Coudret A, Sallanon H. 2001.** Endophytic *Neotyphodium lolii* induced tolerance to Zn stress in *Lolium perenne*. *Physiologia Plantarum* **113**: 557-563.
- Montanini B, Blaudez D, Jeandroz S, Sanders D, Chalot M. 2007.** Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: Improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC Genomics* **8**.
- Moreno FN, Anderson CWN, Stewart RB, Robinson BH. 2005.** Mercury volatilisation and phytoextraction from base-metal mine tailings. *Environmental Pollution* **136**: 341-352.
- Moreno FN, Anderson CWN, Stewart RB, Robinson BH. 2008.** Phytofiltration of mercury-contaminated water: Volatilisation and plant-accumulation aspects. *Environmental and Experimental Botany* **62**: 78-85.
- Moreno MA, Ibrahim-Granet O, Vicentefranqueira R, Amich J, Ave P, Leal F, Latge JP, Calera JA. 2007.** The regulation of zinc homeostasis by the ZafA transcriptional activator is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *Molecular Microbiology* **64**: 1182-1197.
- Mrnka L, Kuchar M, Cieslarova Z, Matejka P, Szakova J, Tlustos P, Vosatka M. 2011.** Effects of endo- and ectomycorrhizal fungi on physiological parameters and heavy metals accumulation of two species from the family Salicaceae. *Water Air and Soil Pollution* **223**: 399-410.
- Müller T, Avolio M, Olivi M, Benjdia M, Rikirsch E, Kasaras A, Fitz M, Chalot M, Wipf D. 2007.** Nitrogen transport in the ectomycorrhiza association: The *Hebeloma cylindrosporum-Pinus pinaster* model. *Phytochemistry* **68**: 41-51.
- Murashige T, Skoog F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497.
- Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM. 2010.** Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters* **8**: 199-216.
- Nara K, Nakaya H, Wu BY, Zhou ZH, Hogetsu T. 2003.** Underground primary succession of ectomycorrhizal fungi in a volcanic desert on Mount Fuji. *New Phytologist* **159**: 743-756.
- Nedjimi B, Daoud Y. 2009.** Cadmium accumulation in *Atriplex halimus* subsp *schweinfurthii* and its influence on growth, proline, root hydraulic conductivity and nutrient uptake. *Flora* **204**: 316-324.
- Nehls U, Gohringer F, Wittulsky S, Dietz S. 2010.** Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review. *Plant Biology* **12**: 292-301.
- Nies DH, Silver S. 1995.** Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *Journal of Industrial Microbiology* **14**: 186-199.
- Öpik M, Moora M, Liira J, Zobel M. 2006.** Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology* **94**: 778-790.
- Orlowska E, Przybylowicz W, Orlowski D, Turnau K, Mesjasz-Przybylowicz J. 2011.** The effect of mycorrhiza on the growth and elemental composition of Ni-hyperaccumulating plant *Berkheya coddii* Roessler. *Environmental Pollution* **159**: 3730-3738.

- Ortega R, Bresson C, Fraysse A, Sandre C, Deves G, Gombert C, Tabarant M, Bleuët P, Seznec H, Simionovici A, Moretto P, Moulin C. 2009. Cobalt distribution in keratinocyte cells indicates nuclear and perinuclear accumulation and interaction with magnesium and zinc homeostasis. *Toxicology Letters* **188**: 26-32.
- Ortiz DF, Kreppel L, Speiser DM, Scheel G, McDonald G, Ow DW. 1992. Heavy-metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *EMBO Journal* **11**: 3491-3499.
- Osobova M, Urban V, Jedelsky PL, Borovicka J, Gryndler M, Ruml T, Kotrba P. 2011. Three metallothionein isoforms and sequestration of intracellular silver in the hyperaccumulator *Amanita strobiliformis*. *New Phytologist* **190**: 916-926.
- Pachlewski R, Pachlewska J. 1974. *Studies on symbiotic properties of mycorrhizal fungi of pine (Pinus Silvestris L.) with the aid of the method of mycorrhizal synthesis in pure cultures on agar*. Warsaw: Forest Research Institute.
- Padmavathiamma PK, Li LY. 2007. Phytoremediation technology: Hyper-accumulation metals in plants. *Water Air and Soil Pollution* **184**: 105-126.
- Pal R, Rai JPN. 2010. Phytochelators: peptides involved in heavy metal detoxification. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **160**: 945-963.
- Park JH, Bolan N, Megharaj M, Naidu R. 2012. Relative value of phosphate compounds in reducing the bioavailability and toxicity of lead in contaminated soils. *Water Air and Soil Pollution* **223**: 599-608.
- Park JK, Lee JW, Jung JY. 2003. Cadmium uptake capacity of two strains of *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Enzyme and Microbial Technology* **33**: 371-378.
- Parlade J, Hortal S, de la Varga H, Pera J. 2011. Intraspecific variability of *Lactarius deliciosus* isolates: colonization ability and survival after cold storage. *Mycorrhiza* **21**: 393-401.
- Peiter E, Montanini B, Gobert A, Pendas P, Husted S, Maathuis FJM, Blaudez D, Chalot M, Sanders D. 2007. A secretory pathway-localized cation diffusion facilitator confers plant manganese tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 8532-8537.
- Pekin BK, Boer MM, Wittkuhn RS, Macfarlane C, Grierson PF. 2012. Plant diversity is linked to nutrient limitation of dominant species in a world biodiversity hotspot. *Journal of Vegetation Science* **23**: 745-754.
- Pelfrene A, Waterlot C, Mazzuca M, Nisse C, Bidar G, Douay F. 2011. Assessing Cd, Pb, Zn human bioaccessibility in smelter-contaminated agricultural topsoils (northern France). *Environmental Geochemistry and Health* **33**: 477-493.
- Pelfrene A, Waterlot C, Mazzuca M, Nisse C, Cuny D, Richard A, Denys S, Heyman C, Roussel H, Bidar G, Douay F. 2012. Bioaccessibility of trace elements as affected by soil parameters in smelter-contaminated agricultural soils: A statistical modeling approach. *Environmental Pollution* **160**: 130-138.
- Pereira E, Coelho V, Tavares RM, Lino-Neto T, Baptista P. 2012. Effect of competitive interactions between ectomycorrhizal and saprotrophic fungi on *Castanea sativa* performance. *Mycorrhiza* **22**: 41-49.
- Persans MW, Nieman K, Salt DE. 2001. Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 9995-10000.
- Peterson RL, Wagg C, Pautler M. 2008. Associations between microfungi endophytes and roots: do structural features indicate function? *Botany-Botanique* **86**: 445-456.
- Pocsi I, Prade RA, Penninckx MJ. 2004. Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Advances in Microbial Physiology*, Vol. 49 **49**: 1-76.
- Pruvot C, Douay F, Herve F, Waterlot C. 2006. Heavy metals in soil, crops and grass as a source of human exposure in the former mining areas. *Journal of Soils and Sediments* **6**: 215-220.
- Purin S, Rillig MC. 2008. Immuno-cytolocalization of glomalin in the mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Soil Biology & Biochemistry* **40**: 1000-1003.

- Qu JJ, Ren GM, Chen B, Fan JH, E Y. 2011. Effects of lead and zinc mining contamination on bacterial community diversity and enzyme activities of vicinal cropland. *Environmental Monitoring and Assessment* **182**: 597-606.
- Ramesh G, Podila GK, Gay G, Marmeisse R, Reddy MS. 2009. Different patterns of regulation for the copper and cadmium metallothioneins of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 2266-2274.
- Rawlings DE. 2002. Heavy metal mining using microbes. *Annual Review of Microbiology* **56**: 65-91.
- Ray P, Tiwari R, Reddy UG, Adholeya A. 2005. Detecting the heavy metal tolerance level in ectomycorrhizal fungi in vitro. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **21**: 309-315.
- Reddy KR, Cameselle C, Ala P. 2010. Integrated electrokinetic-soil flushing to remove mixed organic and metal contaminants. *Journal of Applied Electrochemistry* **40**: 1269-1279.
- Redon PO, Beguiristain T, Leyval C. 2009. Differential effects of AM fungal isolates on *Medicago truncatula* growth and metal uptake in a multimetallic (Cd, Zn, Pb) contaminated agricultural soil. *Mycorrhiza* **19**: 187-195.
- Regvar M, Likar M, Piltaver A, Kugoni N, Smith JE. 2010. Fungal community structure under goat willows (*Salix caprea* L.) growing at metal polluted site: the potential of screening in a model phytostabilisation study. *Plant and Soil* **330**: 345-356.
- Ren AZ, Li CA, Gao YB. 2011. Endophytic fungus improves growth and metal uptake of *Lolium arundinaceum* Darbyshire Ex. Schreb. *International Journal of Phytoremediation* **13**: 233-243.
- Renella G, Mench M, Van der Lelie D, Pietramellara G, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Nannipieri P. 2004. Hydrolase activity, microbial biomass and community structure in long-term Cd-contaminated soils. *Soil Biology & Biochemistry* **36**: 443-451.
- Rillig MC. 2004. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Canadian Journal of Soil Science* **84**: 355-363.
- Robinson BH, Banuelos G, Conesa HM, Evangelou MWH, Schulin R. 2009. The phytomanagement of trace elements in soil. *Critical Reviews in Plant Sciences* **28**: 240-266.
- Rodriguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Pazmino DM, Testillano PS, Risueno MC, del Rio LA, Sandalio LM. 2009. Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: Cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant Physiology* **150**: 229-243.
- Roos P, Jakobsen I. 2008. Arbuscular mycorrhiza reduces phytoextraction of uranium, thorium and other elements from phosphate rock. *Journal of Environmental Radioactivity* **99**: 811-819.
- Roy S, Khasa DP, Greer CW. 2007. Combining alders, frankiae, and mycorrhizae for the revegetation and remediation of contaminated ecosystems. *Canadian Journal of Botany* **85**: 237-251.
- Rufyikiri G, Huysmans L, Wannijn J, Van Hees M, Leyval C, Jakobsen I. 2004. Arbuscular mycorrhizal fungi can decrease the uptake of uranium by subterranean clover grown at high levels of uranium in soil. *Environmental Pollution* **130**: 427-436.
- Rutherford JC, Bird AJ. 2004. Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryotic Cell* **3**: 1-13.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230 (4732)**: 1350-1354.
- Saltarelli R, Ceccaroli P, Polidori E, Citterio B, Vallorani L, Stocchi V. 2003. A high concentration of glucose inhibits *Tuber borchii* mycelium growth: a biochemical investigation. *Mycological Research* **107**: 72-76.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santibanez C, Verdugo C, Ginocchio R. 2008. Phytostabilization of copper mine tailings with biosolids: Implications for metal uptake and productivity of *Lolium perenne*. *Science of the Total Environment* **395**: 1-10.
- Santos JC, Finlay RD, Tehler A. 2006. Molecular analysis of arbuscular mycorrhizal fungi colonising a semi-natural grassland along a fertilisation gradient. *New Phytologist* **172**: 159-168.

- Sanz A, Llamas A, Ullrich CI. 2009.** Distinctive phytotoxic effects of Cd and Ni on membrane functionality. *Plant Signal Behavior* **4**: 980-982.
- Schmidt U. 2003.** Enhancing phytoextraction: The effect of chemical soil manipulation on mobility, plant accumulation, and leaching of heavy metals. *Journal of Environmental Quality* **32**: 1939-1954.
- Sell J, Kayser A, Schulin R, Brunner I. 2005.** Contribution of ectomycorrhizal fungi to cadmium uptake of poplars and willows from a heavily polluted soil. *Plant and Soil* **277**: 245-253.
- Selosse MA, Le Tacon F. 1998.** The land flora: A phototroph-fungus partnership? *Trends in Ecology and Evolution* **13**: 15-25.
- Sen R, Hietala AM, Zelmer CD. 1999.** Common anastomosis and internal transcribed spacer RFLP groupings in binucleate *Rhizoctonia* isolates representing root endophytes of *Pinus sylvestris*, *Ceratophyllum* spp. from orchid mycorrhizas and a phytopathogenic anastomosis group. *New Phytologist* **144**: 331-341.
- Shahabivand S, Maivan HZ, Goltapeh EM, Sharifi M, Aliloo AA. 2012.** The effects of root endophyte and arbuscular mycorrhizal fungi on growth and cadmium accumulation in wheat under cadmium toxicity. *Plant Physiology and Biochemistry* **60**: 53-58.
- Shahzad Z, Gosti F, Berthomieu P. 2012.** Interaction between AhMTP1s, potential candidate for zinc biofortification of cereals, for their functioning. *International Journal of Agriculture and Biology* **14**: 668-670.
- Shen H, Christie P, Li X. 2006.** Uptake of zinc, cadmium and phosphorus by arbuscular mycorrhizal maize (*Zea mays* L.) from a low available phosphorus calcareous soil spiked with zinc and cadmium. *Environmental Geochemistry and Health* **28**: 111-119.
- Sheoran V, Sheoran AS, Poonia P. 2009.** Phytomining: A review. *Minerals Engineering* **22**: 1007-1019.
- Sheoran V, Sheoran AS, Poonia P. 2011.** Role of hyperaccumulators in phytoextraction of metals from contaminated mining sites: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **41**: 168-214.
- Silvani VA, Fracchia S, Fernandez L, Pergola M, Godeas A. 2008.** A simple method to obtain endophytic microorganisms from field-collected roots. *Soil Biology & Biochemistry* **40**: 1259-1263.
- Silvera SAN, Rohan TE. 2007.** Trace elements and cancer risk: a review of the epidemiologic evidence. *Cancer Causes & Control* **18**: 7-27.
- Simon L. 2005.** Stabilization of metals in acidic mine spoil with amendments and red fescue (*Festuca rubra* L.) growth. *Environmental Geochemistry and Health* **27**: 289-300.
- Smith SE, Read DJ. 2008.** *Mycorrhizal Symbiosis*. London: Academic Press.
- Sogreah 2007.** Bilan des flux de contaminants entrant sur les sols agricoles de France métropolitaine. In: *rapport final contrat Ademe n°0375C0004*: Ademe. 281.
- Sokolski S, Dalpe Y, Piche Y. 2011.** Phosphate transporter genes as reliable gene markers for the identification and discrimination of arbuscular mycorrhizal fungi in the genus *Glomus* *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 1888-1891.
- Soleimani M, Hajabbasi MA, Afyuni M, Mirlohi A, Borggaard OK, Holm PE. 2010.** Effect of endophytic fungi on cadmium tolerance and bioaccumulation by *Festuca arundinacea* and *Festuca pratensis*. *International Journal of Phytoremediation* **12**: 535-549.
- Sousa NR, Ramos MA, Marques A, Castro PML. 2012.** The effect of ectomycorrhizal fungi forming symbiosis with *Pinus pinaster* seedlings exposed to cadmium. *Science of the Total Environment* **414**: 63-67.
- Stefani FOP, Moncalvo JM, Seguin A, Berube JA, Hamelin RC. 2009.** Impact of an 8-year-old transgenic poplar plantation on the ectomycorrhizal fungal community. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 7527-7536.
- Sterckeman T, Douay F, Proix N, Fourrier H, Perdrix E. 2002.** Assessment of the contamination of cultivated soils by eighteen trace elements around smelters in the North of France. *Water Air and Soil Pollution* **135**: 173-194.
- Stevanovic B, Drazic G, Tomovic G, Sinzar-Sekulic J, Melovski L, Novovic I, Markovic DM. 2010.** Accumulation of arsenic and heavy metals in some *Viola* species from an abandoned mine, Alchar, Republic of Macedonia (FYROM). *Plant Biosystems* **144**: 644-655.

- Tagmount A, Berken A, Terry N. 2002.** An essential role of S-adenosyl-L-methionine : L-methionine S-methyltransferase in selenium volatilization by plants. Methylation of selenomethionine to selenium-methyl-L-selenium-methionine, the precursor of volatile selenium. *Plant Physiology* **130**: 847-856.
- Tagu D, Rampant PF, Lapeyrie F, Frey-Klett P, Vion P, Villar M. 2001.** Variation in the ability to form ectomycorrhizas in the F1 progeny of an interspecific poplar (*Populus* spp.) cross. *Mycorrhiza* **10**: 237-240.
- Tahara K, Norisada M, Tange T, Yagi H, Kojima K. 2005.** Ectomycorrhizal association enhances Al tolerance by inducing citrate secretion in *Pinus densiflora*. *Soil Science and Plant Nutrition* **51**: 397-403.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007.** MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596-1599.
- Tan XM, Chen XM, Wang CL, Jin XH, Cui JL, Chen J, Guo SX, Zhao LF. 2012.** Isolation and identification of endophytic fungi in roots of nine *Holcoglossum* plants (orchidaceae) collected from Yunnan, Guangxi, and Hainan provinces of China. *Current Microbiology* **64**: 140-147.
- Terry N, Zayed AM, de Souza MP, Tarun AS. 2000.** Selenium in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 401-432.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994.** CLUSTAL-W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673-4680.
- Tiwari S, Kumari B, Singh SN. 2008.** Microbe-induced changes in metal extractability from fly ash. *Chemosphere* **71**: 1284-1294.
- Todeschini V, Franchin C, Castiglione S, Burlando B, Biondi S, Torrigiani P, Berta G, Lingua G. 2007.** Responses to copper of two registered poplar clones inoculated or not with arbuscular mycorrhizal fungi. *Caryologia* **60**: 146-155.
- Toler HD, Morton JB, Cumming JR. 2005.** Growth and metal accumulation of mycorrhizal sorghum exposed to elevated copper and zinc. *Water, Air, and Soil Pollution* **164**: 155-172.
- Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V. 1986.** Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherches et méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. *Aspects physiologiques et génétiques des mycorrhizes*, Dijon, INRA: 217-221.
- Truog E. 1947.** *The liming of soils*. Washington: USDA.
- Turnau K, Mesjasz-Przybyłowicz J. 2003.** Arbuscular mycorrhiza of *Berkheya coddii* and other Ni-hyperaccumulating members of Asteraceae from ultramafic soils in South Africa. *Mycorrhiza* **13**: 185-190.
- Turnau K, Mleczko P, Blaudez D, Chalot M, Botton B. 2002.** Heavy metal binding properties of *Pinus Sylvestris* mycorrhizas from industrial wastes. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **71**: 253-261.
- Turnau K, Przybyłowicz WJ, Mesjasz-Przybyłowicz J. 2001.** Heavy metal distribution in *Suillus luteus* mycorrhizas - As revealed by micro-PIXE analysis. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **181**: 649-658.
- Ulriksen C, Ginocchio R, Mench M, Neaman A. 2012.** Lime and compost promote plant re-colonization of metal-polluted, acidic soils. *International Journal of Phytoremediation* **14**: 820-833.
- Valko M, Morris H, Cronin MTD. 2005.** Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* **12**: 1161-1208.
- Vallino M, Martino E, Boella F, Murat C, Chiapello M, Perotto S. 2009.** Cu, Zn superoxide dismutase and zinc stress in the metal-tolerant ericoid mycorrhizal fungus *Oidiodendron maius* Zn. *Fems Microbiology Letters* **293**: 48-57.
- Vallino M, Massa N, Lumini E, Bianciotto V, Berta G, Bonfante P. 2006.** Assessment of arbuscular mycorrhizal fungal diversity in roots of *Solidago gigantea* growing in a polluted soil in Northern Italy. *Environmental Microbiology* **8**: 971-983.
- Vamerali T, Bandiera M, Mosca G. 2010.** Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review. *Environmental Chemistry Letters* **8**: 1-17.

- Van Nevel L, Mertens J, Staelens J, De Schrijver A, Tack FMG, De Neve S, Meers E, Verheyen K. 2011. Elevated Cd and Zn uptake by aspen limits the phytostabilization potential compared to five other tree species. *Ecological Engineering* **37**: 1072-1080.
- Van Tichelen KK, Colpaert JV, Vangronsveld J. 2001. Ectomycorrhizal protection of *Pinus sylvestris* against copper toxicity. *New Phytologist* **150**: 203-213.
- Varun M, D'Souza R, Pratas J, Paul MS. 2012. Metal contamination of soils and plants associated with the glass industry in North Central India: prospects of phytoremediation. *Environmental science and pollution research* **19**: 269-281.
- Vázquez S, Agha R, Granado A, Sarro MJ, Esteban E, Penalosa JM, Carpena RO. 2006. Use of white lupin plant for phytostabilization of Cd and as polluted acid soil. *Water, Air, and Soil Pollution* **177**: 349-365.
- Vicentefranqueira R, Moreno MA, Leal F, Calera JA. 2005. The ZrfA and ZrfB genes of *Aspergillus fumigatus* encode the zinc transporter proteins of a zinc uptake system induced in an acid, zinc-depleted environment. *Eukaryotic Cell* **4**: 837-848.
- Vivas A, Biro B, Ruiz-Lozano JM, Barea JM, Azcon R. 2006. Two bacterial strains isolated from a Zn-polluted soil enhance plant growth and mycorrhizal efficiency under Zn-toxicity. *Chemosphere* **62**: 1523-1533.
- Waldron KJ, Rutherford JC, Ford D, Robinson NJ. 2009. Metalloproteins and metal sensing. *Nature* **460**: 823-830.
- Walter I, Cuevas G. 1999. Chemical fractionation of heavy metals in a soil amended with repeated sewage sludge application. *Science of the Total Environment* **226**: 113-119.
- Wang B, Qiu YL. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* **16**: 299-363.
- Wang FY, Lin XG, Yin R. 2007. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora mellea* decreases Cu phytoextraction by maize from Cu-contaminated soil. *Pedobiologia* **51**: 99-109.
- Wang JL, Chen C. 2006. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Biotechnology Advances* **24**: 427-451.
- Waschke A, Sieh D, Tamasloukht M, Fischer K, Mann P, Franken P. 2006. Identification of heavy metal-induced genes encoding glutathione S-transferases in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza* **17**: 1-10.
- Wei SH, Li YM, Zhou QX, Srivastava M, Chiu SW, Zhan J, Wu ZJ, Sun TH. 2011. Effect of fertilizer amendments on phytoremediation of Cd-contaminated soil by a newly discovered hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Journal of Hazardous Materials* **176**: 269-273.
- White T, Bruns T, Lee S, J T, eds. 1990. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. PCR Protocols: a guide to methods and applications. New York: Academic press
- Wilson-Corral V, Anderson C, Rodriguez-Lopez M, Arenas-Vargas M, Lopez-Perez J. 2011. Phytoextraction of gold and copper from mine tailings with *Helianthus annuus* L. and *Kalanchoe serrata* L. *Minerals Engineering* **24**: 1488-1494.
- Wright SF, Franke-Snyder M, Morton JB, Upadhyaya A. 1996. Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. *Plant and Soil* **181**: 193-203.
- Wu BY, Nara K, Hogetsu T. 2002. Spatiotemporal transfer of carbon-14-labelled photosynthate from ectomycorrhizal *Pinus densiflora* seedlings to extraradical mycelia. *Mycorrhiza* **12**: 83-88.
- Wu CY, Bird AJ, Chung LM, Newton MA, Winge DR, Eide DJ. 2008. Differential control of Zap1-regulated genes in response to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* **9**.
- Wubet T, Kottke I, Teketay D, Oberwinkler F. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungal community structures differ between co-occurring tree species of dry Afrotropical forest, and their seedlings exhibit potential to trap isolates suited for reforestation. *Mycological Progress* **8**: 317-328.
- Xia YS, Chen BD, Christie P, Smith FA, Wang YS, Li XL. 2007. Arsenic uptake by arbuscular mycorrhizal maize (*Zea mays* L.) grown in an arsenic-contaminated soil with added phosphorus. *Journal of Environmental Sciences-China* **19**: 1245-1251.

- Yadav R, Arora P, Kumar S, Chaudhury A. 2010.** Perspectives for genetic engineering of poplars for enhanced phytoremediation abilities. *Ecotoxicology* **19**: 1574-1588.
- Yadav SK. 2010.** Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany* **76**: 167-179.
- Yamada A, Katsuya K. 2001.** The disparity between the number of ectomycorrhizal fungi and those producing fruit bodies in a *Pinus densiflora* stand. *Mycological Research* **105**: 957-965.
- Yoon J, Cao XD, Zhou QX, Ma LQ. 2006.** Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of the Total Environment* **368**: 456-464.
- Yu XZ, Gu JD. 2008.** Differences in uptake and translocation of selenate and selenite by the weeping willow and hybrid willow. *Environmental science and pollution research* **15**: 499-508.
- Zarei M, Hempel S, Wubet T, Schäfer T, Savaghebi G, Jouzani GS, Nekouei MK, Buscot F. 2010.** Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil chemical properties and heavy metal contamination. *Environmental Pollution*.
- Zarei M, König S, Hempel S, Nekouei MK, Savaghebi G, Buscot F. 2008a.** Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated to *Veronica rechingeri* at the Anguran zinc and lead mining region. *Environmental Pollution* **156**: 1277-1283.
- Zarei M, Saleh-Rastin N, Jouzani GS, Savaghebi G, Buscot F. 2008b.** Arbuscular mycorrhizal abundance in contaminated soils around a zinc and lead deposit. *European Journal of Soil Biology* **44**: 381-391.
- Zhang XH, Lin AJ, Gao YL, Reid RJ, Wong MH, Zhu YG. 2009.** Arbuscular mycorrhizal colonisation increases copper binding capacity of root cell walls of *Oryza sativa* L. and reduces copper uptake. *Soil Biology and Biochemistry* **41**: 930-935.
- Zhang YJ, Zhang Y, Liu MJ, Shi XD, Zhao ZW. 2008.** Dark septate endophyte (DSE) fungi isolated from metal polluted soils: their taxonomic position, tolerance, and accumulation of heavy metals *in vitro*. *Journal of Microbiology* **46**: 624-632.
- Zhao H, Butler E, Rodgers J, Spizzo T, Duesterhoeft S, Eide D. 1998.** Regulation of zinc homeostasis in yeast by binding of the ZAP1 transcriptional activator to zinc-responsive promoter elements. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 28713-28720.
- Zhao H, Eide D. 1996a.** The yeast *ZRT1* gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 2454-2458.
- Zhao H, Eide D. 1996b.** The *ZRT2* gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 23203-23210.
- Zhao H, Eide DJ. 1997.** Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **17**: 5044-5052.
- Zhou JM, Goldsbrough PB. 1994.** Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *Plant Cell* **6**: 875-884.

La phytostabilisation est une méthode de gestion de sites pollués par des éléments traces métalliques (ETM) grâce à une approche « verte ». Les champignons mycorhiziens, associés aux racines, peuvent contribuer au potentiel de phytostabilisation d'espèces ligneuses en réduisant notamment le transfert des ETM vers les parties aériennes de la plante.

Dans le cadre du projet BIOFILTREE, plusieurs approches ont été mises en œuvre afin de sélectionner des espèces fongiques performantes en phytostabilisation. Dans un premier temps, afin de cibler des espèces d'intérêt, les communautés fongiques associées aux racines de plusieurs clones de peupliers sur un site pollué par des ETM ont été analysées. Tous les peupliers étaient colonisés par des champignons ecto-, endomycorhiziens et endophytes. En revanche, des spécificités d'hôtes ont été observées parmi ces communautés, avec par exemple un champignon majoritaire du genre *Hebeloma*, mais ne s'associant pas avec tous les génotypes de peuplier. Dans un deuxième temps, plusieurs campagnes de prélèvements de champignons sur divers sites pollués ont permis d'isoler des souches fongiques particulièrement tolérantes aux ETM. De très fortes variations intra- et interspécifiques ont été observées lors de ces tests. Un test préliminaire en conditions contrôlées a également mis en évidence une légère modification de la répartition des ETM dans la biomasse du peuplier par un inoculum fongique.

En parallèle, des approches ciblées de caractérisation fonctionnelle (complémentation de levures, localisation subcellulaire de protéines chimériques avec la GFP, régulation transcriptionnelle, contenu métallique des cellules) de gènes impliqués dans l'homéostasie et la tolérance au zinc ont été mises en œuvre chez *Laccaria bicolor*, un champignon ectomycorhizien modèle. L'homéostasie et la tolérance aux ETM sont liées entre autres à l'activité des transporteurs des familles ZIP (*Zrt*-, *Irt*- related Protein) et CDF (*Cation Diffusion Facilitator*). L'étude des membres appartenant à ces deux familles a permis d'affiner la compréhension des mécanismes d'absorption et de séquestration des ETM dans les hyphes des champignons ectomycorhiziens.

Mots clés : phytostabilisation, éléments traces métalliques, champignons mycorhiziens, pollution, tolérance, *Laccaria bicolor*, zinc

Abstract

Phytostabilization is a gentle management option for sites polluted by trace elements (TE). Mycorrhizal fungi could assist plants in stabilizing pollutants by increasing the soil-prospected volume and by immobilizing MTE in their hyphae.

Within the BIOFILTREE project, several approaches were used to select fungal strains that could be used for enhancing the phytostabilization process. Firstly, the mycorrhizal status of roots of three poplar clones from a TE-polluted site and the fungi associated with the roots were analyzed. The roots were colonized by endomycorrhizal, ectomycorrhizal, and endophytic fungi. Our data also revealed some specific trends, *i.e.* *Hebeloma* species was not associated with all poplar genotypes. Secondly, several fungal strains were isolated from polluted sites and their *in vitro* tolerance to TE was tested. There was a strong inter- and intra-specific variation in metal tolerance. In a greenhouse study, two poplar clones were inoculated with an endomycorrhizal inoculum and grown on a TE-polluted soil. A slight modification in TE accumulation in shoots was observed.

In parallel, the role of ZIP (*Zrt-Irt-like Proteins*) and CDF (*Cation Diffusion Facilitator*) proteins in TE homeostasis/tolerance was also studied in the ectomycorrhizal model fungus *Laccaria bicolor*. The corresponding proteins were functionally characterized by the use of different approaches (yeast complementation, GFP-chimeric proteins, transcript analyses, cell metal content analyses). This study allowed us to better understand the mechanisms underlying zinc uptake and compartmentation in the hyphae of this fungus.

Key-words: phytostabilization, trace elements, mycorrhizal fungi, pollution, tolerance, *Laccaria bicolor*, zinc