



## 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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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



Université de Lorraine  
Ecole Doctorale RP2E « Ressources, Procédés, Produits, Environnement »  
Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux  
UMR 7360 CNRS-Université de Lorraine

## Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

### Docteur de l'Université de Lorraine

Mention « Écotoxicologie, Biodiversité, Écosystèmes »

Par Charlotte Berthelot

### Les endophytes bruns septés dans les sols pollués aux éléments traces métalliques (ETM) : Caractérisation, effet sur les plantes et mécanismes de tolérance aux ETM

Soutenance publique le 14 février 2017

#### Membres du jury :

##### Rapporteurs :

|                     |                                                  |
|---------------------|--------------------------------------------------|
| Philipp FRANKEN     | Professeur, IGZ, Erfurt (Allemagne)              |
| Diederik Van TUINEN | Directeur de recherche INRA, Agroécologie, Dijon |

##### Examineurs :

|                |                                               |
|----------------|-----------------------------------------------|
| Marjana REGVAR | Professeure, Ljubljana (Slovénie)             |
| Michel CHALOT  | Professeur, Chrono-environnement, Montbéliard |

##### Directeurs de la Thèse :

|                |                                                                          |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Corinne LEYVAL | Directrice de recherche CNRS, LIEC, Nancy ( <i>directrice de thèse</i> ) |
| Damien BLAUDEZ | Maître de conférences, LIEC, Nancy ( <i>co-directeur de thèse</i> )      |



Projet cofinancé par l'Union Européenne.  
L'Europe s'engage avec le Fonds européen de développement régional.



La Région  
**Lorraine**





Université de Lorraine  
Ecole Doctorale RP2E « Ressources, Procédés, Produits, Environnement »  
Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux  
UMR 7360 CNRS-Université de Lorraine

## Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

### Docteur de l'Université de Lorraine

Mention « Écotoxicologie, Biodiversité, Écosystèmes »

Par Charlotte Berthelot

### Les endophytes bruns septés dans les sols pollués aux éléments traces métalliques (ETM): Caractérisation, effet sur les plantes et mécanismes de tolérance aux ETM

Soutenance publique le 14 février 2017

#### Membres du jury :

##### Rapporteurs :

|                     |                                                  |
|---------------------|--------------------------------------------------|
| Philipp FRANKEN     | Professeur, IGZ, Erfurt (Allemagne)              |
| Diederik Van TUINEN | Directeur de recherche INRA, Agroécologie, Dijon |

##### Examineurs :

|                |                                               |
|----------------|-----------------------------------------------|
| Marjana REGVAR | Professeure, Ljubljana (Slovénie)             |
| Michel CHALOT  | Professeur, Chrono-environnement, Montbéliard |

##### Directeurs de la Thèse :

|                |                                                                          |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Corinne LEYVAL | Directrice de recherche CNRS, LIEC, Nancy ( <i>directrice de thèse</i> ) |
| Damien BLAUDEZ | Maître de conférences, LIEC, Nancy ( <i>co-directeur de thèse</i> )      |



Projet cofinancé par l'Union Européenne.  
L'Europe s'engage avec le Fonds européen de développement régional.



La Région  
**Lorraine**







## Remerciements

En guise de prélude, je remercie très sincèrement les membres du jury. Merci à Phillip Franken et Diederik Van Tuinen d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse ainsi qu'à Marjana Regvar d'avoir accepté d'en être l'examinatrice malgré les quelques 1000 kilomètres qui sépare Nancy de Ljubljana. Merci beaucoup également à Michel Chalot d'avoir bien voulu présider ce jury de thèse. J'espère que le travail présenté a été à la hauteur de vos attentes.

Cette thèse n'aurait jamais vu le jour sans la contribution financière de la région Lorraine et du FEDER, financeurs du projet Lorver. Participer à ce projet a été pour moi une réelle fierté. Et, quelles aventures que de travailler sur les parcelles de Jendelaincourt ! Petites par la taille (125 m<sup>2</sup>) mais grandes par leur diversité ! De magnifiques piscines à partir de novembre, des desserts secs l'été, une végétation spontanée abondante, des déchets rocheux en tout genre... Un vrai paysage de carte postale ! Néanmoins la bonne ambiance émanant des journées terrains restera gravée bien longtemps dans ma mémoire ! Merci Catherine, Alain, Lucas, Thierry, Apolline, Quentin, Laurence, Marie, Yannick et tout les autres pour tous ces bons moments !!!

Merci également à Marie-Odile Simmonot, Jean Louis Morel et Sophie Guimont qui ont su orchestrer avec brillot les plénières du projet. Votre intérêt et vos questions m'ont permis de prendre du recul et d'évoluer pendant ces trois ans.

Mes deux encadrants ont également été des protagonistes indispensables à la naissance de ce travail. Ainsi, je tiens à remercier Corinne Leyval et Damien Blaudez pour m'avoir conseillé durant ces trois ans.

Damien, notamment, qui me supporte depuis maintenant cinq ans ! Merci d'avoir cru en moi depuis le début ! Quelle résistance ! Tu as survécu mes xxxxièmes questions inutiles, mes fautes d'orthographe répétitives et ma petite mémoire ! Tu as fait preuve d'une patience sans limite pour m'expliquer tous ces concepts et notions qui été bien compliqué pour mon cerveau ! Et enfin merci à ta bonne humeur et ton humour au quotidien !

Dans le même registre, je tiens à remercier Michel, sans être officiellement encadrant de la thèse, tu as suivi mes travaux depuis le début. Merci pour tous tes conseils et ta disponibilité.

Tous ces résultats n'auraient pu être obtenus sans l'aide des nombreuses petites mains qui sont intervenues dans mes expériences. Hervé, David, Christine et Loïc (Montbéliard) qui ont réalisé les nombreuses ICP, lames de microscopie et analyses physico-chimiques en tout genre ! Viens ensuite le tour de tous les stagiaires qui se sont succédé à mes côtés pour m'épauler, Clémence, Nicolas(s), Paul, Audrey, Aurianne, Yoan ... Leur efficacité et leur bonne humeur sont pour beaucoup dans ce manuscrit !

Quand on passe quasiment dix heures par jour sur son lieu de travail, l'ambiance est un point clef... Et de l'ambiance il y en a eu dans ces murs ! Les pauses café, les défis sportifs et culinaires, les week ends et soirées ont été tant de bons moments durant ces années !! Travailler avec vous n'est finalement pas du travail ! C'est du plaisir ! Merci à vous tous ! Thésards, chercheurs, personnels techniques et administratifs ! Alexis, Florian, Coralie, Patrick, Asfaw, JoJo, Marie, Cécile, Christine, Christian, Caroline, Quentinou, Fadi, Anne, Aurélie, Mélo, Chouchou, Fabrice, Sylvie, David, Géraldine, Nini, Cécile, Hervé, MaMax, Bérénice et tous les oubliés...

Un grand merci également aux teams Géoressources et LSE

Et puisque on garde toujours le meilleur pour la fin, je vais finir par un énorme et gigantesque MERCI à ma famille. Même à l'autre bout la France ils m'ont suivi et épaulé tout au long de cet exercice. A chaque instant, en toutes circonstances et sans aucune limite ils ont été ma béquille et mon énergie. Leur soutien sans faille est sans aucun doute la clef qui a permis à ce projet de voir le jour.

Merci tout particulièrement à Robin (alias *Dr. Dag* ou *Robinette*), toujours présent à mes côtés ! Chaque jour tu m'as supporté et tu m'as permis de me surpasser. Tu vas maintenant pouvoir souffler ! Fini les corrections d'oraux, d'écrits, les isoléments de DSE durant les vacances... Au final, tu mérites autant que moi ce diplôme !



La Région  
**Lorraine**

# Sommaire

|            |                                                                                  |           |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>I.</b>  | <b>État de l'Art</b>                                                             | <b>17</b> |
| 1.         | <b>La pollution métallique dans les sols</b>                                     | <b>19</b> |
| 1.1.       | Définition générale des éléments traces métalliques (ETM)                        | 19        |
| 1.2.       | Origine des éléments traces métalliques dans les sols                            | 20        |
| 1.3.       | Spéciation et biodisponibilité des ETM dans l'environnement                      | 23        |
| 1.4.       | Chiffres et réglementation française                                             | 24        |
| 2.         | <b>Effet des ETM sur les organismes terrestres</b>                               | <b>26</b> |
| 2.1.       | La notion d'éléments essentiels et d'éléments toxiques                           | 26        |
| 2.2.       | Effet des ETM sur les plantes                                                    | 28        |
| 2.3.       | Effet des ETM sur la santé humaine                                               | 30        |
| 2.4.       | Effets des ETM sur les microorganismes du sol                                    | 31        |
| 2.5.       | Conclusion                                                                       | 33        |
| 3.         | <b>Les techniques biologiques de remédiation des sols pollués par les ETM</b>    | <b>33</b> |
| 3.2.       | Rôle des micro-organismes dans la phytoremédiation des sols pollués aux ETM      | 37        |
| 4.         | <b>Les champignons colonisant les plantes dans les sols pollués aux ETM</b>      | <b>39</b> |
| 4.1.       | Les champignons mycorhiziens                                                     | 40        |
| 4.2.       | Les endophytes racinaires                                                        | 42        |
| 5.         | <b>Rôle des DSE dans les sols, en particulier les sols pollués aux ETM</b>       | <b>45</b> |
| 5.1.       | Le paradigme mutualisme-parasitisme des DSE                                      | 45        |
| 5.2.       | Effet des DSE sur la nutrition minérale des plantes                              | 48        |
| 5.3.       | Protection contre les stress biotiques                                           | 49        |
| 5.1.       | Protection des plantes contre les stress abiotiques                              | 51        |
| 6.         | <b>Les mécanismes de tolérance aux ETM chez les DSE</b>                          | <b>55</b> |
| 6.2.       | Réponses intracellulaires et transport des ETM                                   | 59        |
| 6.3.       | Autres mécanismes de tolérance aux ETM chez les DSE                              | 63        |
| 7.         | <b>Conclusion de l'état de l'art</b>                                             | <b>64</b> |
| 8.         | <b>Objectifs de la thèse</b>                                                     | <b>65</b> |
| <b>II.</b> | <b>Matériels et méthodes</b>                                                     | <b>69</b> |
| 1.         | <b>Les sites pollués étudiés</b>                                                 | <b>71</b> |
| 1.1.       | Caractéristiques physico-chimiques des sols                                      | 73        |
| 1.2.       | Préparations des sols pour les tests « en pots »                                 | 73        |
| 2.         | <b>Matériels biologiques</b>                                                     | <b>75</b> |
| 2.1.       | Microorganismes utilisés                                                         | 75        |
| 2.2.       | Plasmides utilisés                                                               | 79        |
| 2.3.       | Matériel végétal utilisé                                                         | 80        |
| 2.4.       | Culture des souches fongiques en présence de plantes                             | 81        |
| 3.         | <b>Méthodes et analyses</b>                                                      | <b>83</b> |
| 3.1.       | Méthodes microbiologiques                                                        | 83        |
| 3.2.       | Analyses chimiques                                                               | 86        |
| 3.3.       | Analyses de biologie moléculaire : extractions et analyses des acides nucléiques | 90        |
| 3.4.       | Techniques de clonage                                                            | 97        |
| 3.5.       | Analyses microscopiques                                                          | 105       |
| 3.6.       | Analyses statistiques                                                            | 106       |

|             |                                                                                                                                                                        |            |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>III.</b> | <b>Identification et caractérisation de souches fongiques DSE</b>                                                                                                      | <b>107</b> |
| 1.          | <b>Plant growth promotion, metabolite production and metal tolerance of dark septate endophytes isolated from metal-polluted poplar phytomanagement sites</b>          | <b>113</b> |
| 1.1.        | Introduction                                                                                                                                                           | 113        |
| 1.2.        | Materials and methods                                                                                                                                                  | 114        |
| 1.3.        | Results                                                                                                                                                                | 118        |
| 1.4.        | Discussion                                                                                                                                                             | 130        |
| 1.5.        | Conclusion                                                                                                                                                             | 133        |
| 2.          | <b>Identification of dark septate endophytes with synergistic effects on endophytic and ectomycorrhizal fungi and antagonistic effects on root phytopathogens</b>      | <b>135</b> |
| 2.1.        | Introduction                                                                                                                                                           | 135        |
| 2.2.        | Material and methods                                                                                                                                                   | 136        |
| 2.3.        | Results and discussion                                                                                                                                                 | 138        |
| 2.4.        | Conclusions                                                                                                                                                            | 143        |
| <b>IV.</b>  | <b>Effet de souches DSE sur la croissance de plantes hôtes dans des sols pollués aux ETM.</b>                                                                          | <b>145</b> |
| 1.          | <b>Dark septate endophytic fungi improve poplar and birch growth in two trace element-contaminated soils</b>                                                           | <b>150</b> |
| 1.1.        | Introduction                                                                                                                                                           | 150        |
| 1.2.        | Materials and methods                                                                                                                                                  | 152        |
| 1.3.        | Results                                                                                                                                                                | 155        |
| 1.4.        | Discussion                                                                                                                                                             | 161        |
| 2.          | <b>Co-inoculation of <i>Lolium perenne</i> with <i>Funneliformis mosseae</i> and the dark septate endophyte <i>Cadophora</i> sp. in a trace element polluted soil.</b> | <b>165</b> |
| 2.1.        | Introduction                                                                                                                                                           | 165        |
| 2.2.        | Materials and methods                                                                                                                                                  | 167        |
| 2.3.        | Results                                                                                                                                                                | 172        |
| 2.4.        | Discussion                                                                                                                                                             | 177        |
| <b>V.</b>   | <b>Étude des mécanismes contribuant à la tolérance aux ETM chez les DSE</b>                                                                                            | <b>183</b> |
| 1.          | <b>Melanization and ageing are not a drawbacks for successful agro-transformation of dark septate endophytes</b>                                                       | <b>189</b> |
| 1.1.        | Introduction                                                                                                                                                           | 189        |
| 1.2.        | Materials and methods                                                                                                                                                  | 191        |
| 1.3.        | Results                                                                                                                                                                | 194        |
| 1.4.        | Discussion                                                                                                                                                             | 201        |
| 2.          | <b>Phenotypic and molecular analyses of Zn-sensitive T-DNA insertional mutants, with a focus on the role of LpMNR2 on Zn tolerance</b>                                 | <b>206</b> |
| 2.1.        | Introduction                                                                                                                                                           | 206        |
| 2.2.        | Materials and methods                                                                                                                                                  | 208        |
| 2.3.        | Results and discussion                                                                                                                                                 | 213        |
| 3.          | <b>Unravelling the role of melanin in trace element tolerance and accumulation of three dark septate endophytic species.</b>                                           | <b>228</b> |
| 3.1.        | Introduction                                                                                                                                                           | 228        |
| 3.2.        | Materials and methods                                                                                                                                                  | 230        |
| 3.3.        | Results                                                                                                                                                                | 232        |
| 3.4.        | Discussion                                                                                                                                                             | 241        |
| <b>VI.</b>  | <b>Discussion générale et conclusions</b>                                                                                                                              | <b>247</b> |

|                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1. L'identification et la caractérisation métabolique de souches de DSE.                | 249 |
| 2. Impact des DSE sur la croissance de plantes hôtes en présence d'un stress métallique | 254 |
| 3. Mise en place d'une banque de mutants de <i>Leptodontidium</i> sp.                   | 258 |
| 4. Les mécanismes de tolérance aux métaux chez les DSE                                  | 259 |
| 5. Conclusion générale                                                                  | 265 |
| VII. Annexes                                                                            | 301 |



| Abréviations     | Nom complet                                                                                                |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ADN-T (T-DNA)    | ADN de transfert (Transferred-DNA)                                                                         |
| AIA              | Auxine                                                                                                     |
| ANCOVA           | Analyse de covariance                                                                                      |
| ANOVA            | Analyse de variance                                                                                        |
| BLAST            | Basic Local Alignement Tool                                                                                |
| CAT              | Catalase                                                                                                   |
| CMC              | Carboxy-méthyl cellulose                                                                                   |
| COV (VOC)        | Composés organiques volatiles (Volatile Organic Compounds)                                                 |
| DHN              | 1,8-dihydroxynaphtalène                                                                                    |
| DOPA             | L 1,3-dihydroxyphenylalanine                                                                               |
| DSE              | Dark Septate Endophyte / Endophytes bruns septés                                                           |
| EDTA             | Acide éthylène-diamine-tétraacétique                                                                       |
| ECM              | Ectomycorhizien                                                                                            |
| EC <sub>50</sub> | Concentration entraînant l'inhibition de 50 pourcent de la croissance                                      |
| FDA              | Fluorescéine diacétate                                                                                     |
| ETM (TE)         | Éléments traces métalliques (Trace Elements)                                                               |
| FPGN             | Fond pédogéochimique naturel                                                                               |
| GFP              | Green fluorescent protein                                                                                  |
| GHDB             | Glutaminyl-4-hydroxy-benzoate                                                                              |
| GSH              | Glutathion                                                                                                 |
| HAP              | Hydrocarbures aromatique polycyclique                                                                      |
| ICP-AES          | Spectrométrie à plasma à couplage inductif                                                                 |
| LB               | Lubia-Bertani                                                                                              |
| MA (AM)          | Champignon endomycorhizien arbusculaire                                                                    |
| MEA              | Malt extract agar                                                                                          |
| MIC              | Concentration minimale entraînant l'inhibition totale de croissance                                        |
| MS               | Mukashige and Skoog                                                                                        |
| MT               | Metallothionéines                                                                                          |
| NGS              | Nouvelle technologie de séquençage (Next generation sequencing)                                            |
| PA               | Phosphatase alcaline                                                                                       |
| PCR              | Réaction de polymérisation en chaîne                                                                       |
| PGP              | Capacités phytostimulantes « Plant growth promoting »                                                      |
| POD              | Peroxidase                                                                                                 |
| qRT-PCR          | PCR quantitative en temps réel                                                                             |
| ERO (ROS)        | Espèce réactive de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)                                                     |
| SPME-GCMS        | Microextraction en phase solide – chromatographie gazeuse couplée à une analyse par spectrométrie de masse |
| TAIL-PCR         | PCR asymétrique thermique entrelacée                                                                       |



## Introduction générale

---

La crise industrielle et sidérurgique qui a touché la France dans les années 1960 a laissé derrière elle de nombreux sites et sols potentiellement pollués. En 2016, on dénombre 6454 sites pollués en France dont 372 en région Lorraine (Source, Basol). Dans les sols situés sur ou à proximité de ces sites, les teneurs en éléments traces métalliques (*e.g.* As, Pb, Cd, Zn) générés par ces activités sont fréquemment retrouvés dans des concentrations largement supérieures aux normes en vigueur.

La contamination des sols par les **éléments traces métalliques (ETM)** constitue une menace pour la santé humaine et le fonctionnement des écosystèmes. Certains éléments, comme le Pb ou le Cd, ne sont pas essentiels à la vie et sont toxiques pour les organismes à de très faibles concentrations. D'autres, comme le Cu ou le Zn, sont aussi des oligo-éléments. Leur déficit ou leur excès engendre des désordres physiologiques chez les organismes vivants. À la différence des polluants organiques (*e.g.* pesticides, hydrocarbures), les métaux ne sont pas dégradés et sont de ce fait très persistants dans les sols.

Cependant, Le **traitement** des sols pollués constitue un enjeu complexe et difficile à résoudre. Il peut être réalisé via le confinement des sites ou par des procédés physico-chimiques. Cependant ces méthodes sont onéreuses et génèrent en fin de processus un résidu non fertile. Ces contraintes limitent ces approches à une très faible proportion de terrains, généralement les zones les plus contaminées. Une alternative à ces techniques est la phytoremédiation (*i.e.* utilisation de plantes pour remédier à ces pollutions), moins onéreuse et plus respectueuse de l'environnement. Le phytomanagement est un dérivé de la phytoremédiation qui considère les sols pollués comme des outils commerciaux et non plus comme un problème à gérer. Ainsi, par la valorisation des sous-produits issus des végétaux cultivés sur ces sites (*e.g.* fibre, matériaux de construction, biochar, syngaz), il offre à la fois des perspectives de remédiation de sites contaminés et un gain économique. Dans un but d'amélioration du concept, la recherche peut alors contribuer, par exemple, à améliorer les rendements ou le choix des espèces à planter.

D'autre part, l'apport de **microorganismes** peut améliorer le phytomanagement. Les symbiotes fongiques ont la capacité d'améliorer la croissance et la tolérance des plantes hôtes, mais peuvent également réduire le transfert des ETM aux parties récoltables de la biomasse. Cette stratégie repose sur le rôle de filtre biologique que possèdent certains champignons. Particulièrement, cette thèse porte sur l'étude **des endophytes bruns septés (DSE)**. Ces champignons ascomycètes sont abondants dans les sols pollués par des ETM. Quelques études ont mis en évidence qu'une inoculation par ces organismes peut considérablement améliorer la croissance des plantes hôtes. Cependant, peu de données sont disponibles sur ces champignons en particulier dans les sols pollués par les ETM.

Les travaux présentés dans cette thèse ont pour objectif d'apporter des connaissances visant à mieux comprendre les interactions **plantes – champignons DSE** dans les sols pollués par des ETM, en vue de leur potentielle utilisation en phytomanagement des sols pollués. Ce travail est inclus dans le projet **LORVER (financé par la région Lorraine et le Fond Européen de Recherche et de Développement)** dont le but est la création d'une filière de production de biomasse végétale à usage non-alimentaire par la valorisation de sites dégradés (*e.g.* friches industrielles) et de sous-produits industriels délaissés (*e.g.* boues de papeterie, gravats). La thèse a été réalisée au sein de l'**Université de Lorraine** dans le **Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux** (LIEC UMR 7360 Université de Lorraine-CNRS).

Ce manuscrit, présenté sous forme d'un recueil d'articles se compose de six chapitres permettant de mener une étude progressive et logique alimentant la compréhension du système complexe **sol – plante – DSE – ETM**. Plus spécifiquement, ce manuscrit présentera une **caractérisation** avancée des DSE, de leur mode de vie, et de leurs capacités à être étudiés en consortia. Dans un second temps l'impact de ces souches sur la croissance des plantes hôtes en présence d'ETM sera précisé. Ce travail permettra ainsi une réflexion sur les perspectives d'utilisation de champignons DSE spécifiques dans le cas de gestion de sites et sols pollués par phytoremédiation. Toutefois ces considérations nécessitent la compréhension des mécanismes mis en place par les DSE leur permettant de tolérer les ETM. Une dernière partie du manuscrit portera ainsi sur l'étude de ces mécanismes chez quelques souches de DSE.

## I. État de l'Art

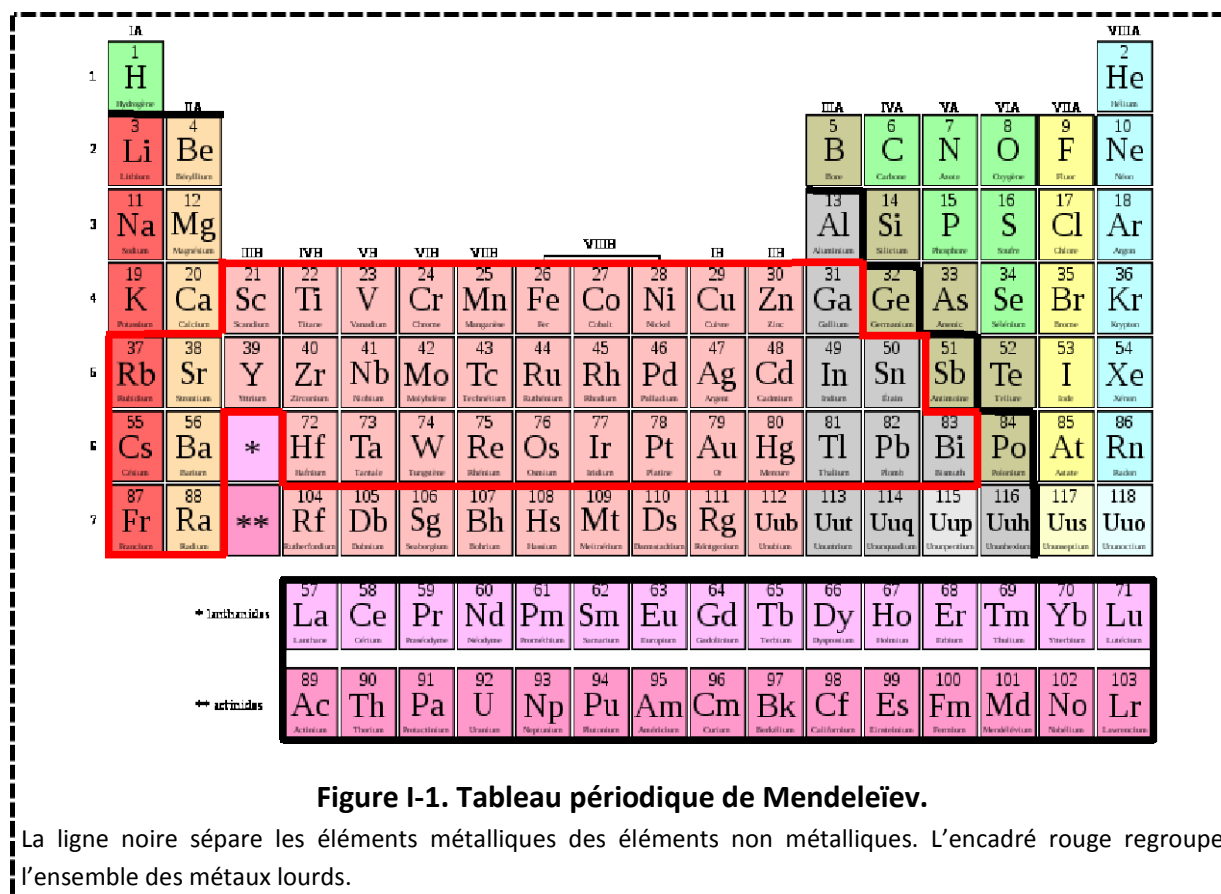
---



## 1. La pollution métallique dans les sols

### 1.1. Définition générale des éléments traces métalliques (ETM)

Les métaux sont des éléments chimiques possédant des propriétés de conduction de chaleur et d'électricité. Ils participent aux réactions sous forme de cations. Parmi les 118 éléments de la classification de Mendeleïev, 94 sont considérés comme des métaux (**Figure I-1**) (Kabata-Pendias 2011).



Les métaux toxiques et/ou métaux lourds, sont des éléments naturels caractérisés par une masse volumique supérieure à  $5 \text{ g/cm}^3$ , un numéro atomique supérieur à 20 et formant des précipités insolubles avec les sulfures (Alloway 2012). Quarante et un éléments correspondent à cette définition générale auxquels il faut ajouter cinq métalloïdes (As, B, Si, Te et At - éléments qui combinent certaines caractéristiques du métal et d'autres caractéristiques opposées). Cependant, le terme « métaux lourds » est sujet à de nombreuses critiques car imprécis et mal défini (Alloway 2012). Il est associé à une notion de toxicité alors que certains de ces éléments sont indispensables en faible concentration à certains processus biologiques (e.g. Cu, Mn, Fe) (Kabata-Pendias 2011).

Le terme « d'éléments traces métalliques » (ETM, ou TE en anglais) a été proposé afin de regrouper les vrais métaux lourds, les éléments plus légers (e.g. Al, Be ou Zn) et les

éléments non métalliques qui s'en approchent physiquement et chimiquement (*e.g.* As et Se). Suivant les disciplines, des confusions peuvent toutefois apparaître, par exemple, en pédologie un élément est qualifié de « trace » lorsque sa concentration est inférieure à 1000 mg/kg dans les sols et dans les roches alors que, dans le domaine de la biologie un élément est qualifié de « trace » lorsque sa concentration n'excède pas 100 mg/kg de matière sèche dans les tissus animaux ou végétaux (Alloway 2012). Malgré ces imprécisions, le terme ETM sera préféré à celui de métaux lourds dans la suite de ce manuscrit.

## **1.2. Origine des éléments traces métalliques dans les sols**

### **1.2.1. Origine naturelle de la pollution métallique**

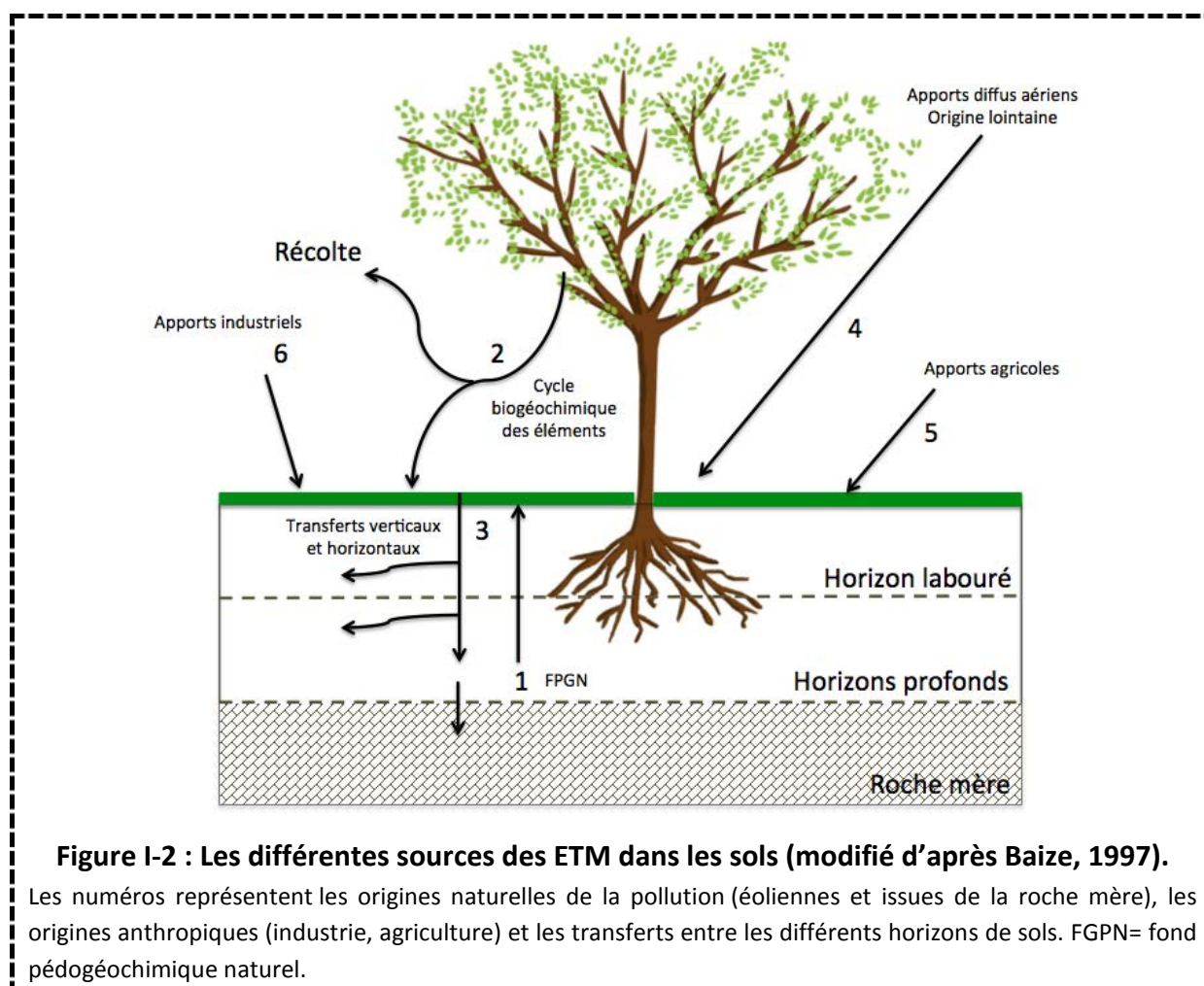
Le fond pédogéochimique naturel (FPGN) local correspond à la concentration d'un élément majeur ou trace dans un sol, résultant des évolutions naturelles géologiques et pédologiques en dehors de tout apport d'origine anthropique (Baize 1997). Le terme « local » est lié à l'existence d'une multitude de valeurs de FPGN correspondant à des contenus variés, propres à différentes parcelles et à différents types de sol (**Figure I-2 ①**). Selon la composition chimique de la roche mère à partir de laquelle le sol est formé, il sera plus ou moins riche en oligo-éléments et en éléments toxiques. En France, les roches sont très variées de par leur nature (roches sédimentaires, métamorphiques et magmatiques) et leur composition chimique (Baize 1997). Au fur et à mesure des processus pédogénétiques, le FPGN va se diversifier verticalement et horizontalement, d'un horizon à un autre. Ces processus pédogénétiques englobent l'altération, la lixiviation et le lessivage auxquels il faut ajouter l'apport continu de matière organique par l'activité biologique.

Les cycles biogéochimiques des éléments dans les sols et dans les plantes interviennent également dans la constitution du FPGN (**Figure I-2 ②**). Les éléments sont absorbés par les racines et sont transportés vers les organes aériens de la plante. En fin de cycle, les éléments retournent ensuite dans le sol par décomposition des tissus végétaux. Ce cycle peut être rompu lorsque les récoltes sont exportées (**Figure I-2 ②**).

Le troisième phénomène qui intervient correspond aux transferts pédologiques verticaux et horizontaux (**Figure I-2 ③**). En France, les précipitations annuelles sont en général supérieures à l'évapotranspiration du couvert végétal. Aussi, de nombreux sols sont dits lessivés (ou luvisols) et les éléments traces peuvent alors migrer vers les horizons profonds puis vers les nappes phréatiques. Les transferts pédologiques peuvent également se faire latéralement (**Figure I-2 ③**).

Le dernier phénomène intervenant dans la composition du FPGN provient des apports aériens. Des particules fines sont libérées dans l'atmosphère par l'activité des volcans, des embruns maritimes et vents lointains puis sont saupoudrées sur les sols des prairies et des forêts. Après interception par les feuilles, les ETM contenus dans ces particules peuvent être absorbés directement par les plantes ou pénétrer dans les sols

(Figure I-2 ④). La mesure de ces apports reste difficile, mais la durée du phénomène lui confère une certaine importance.



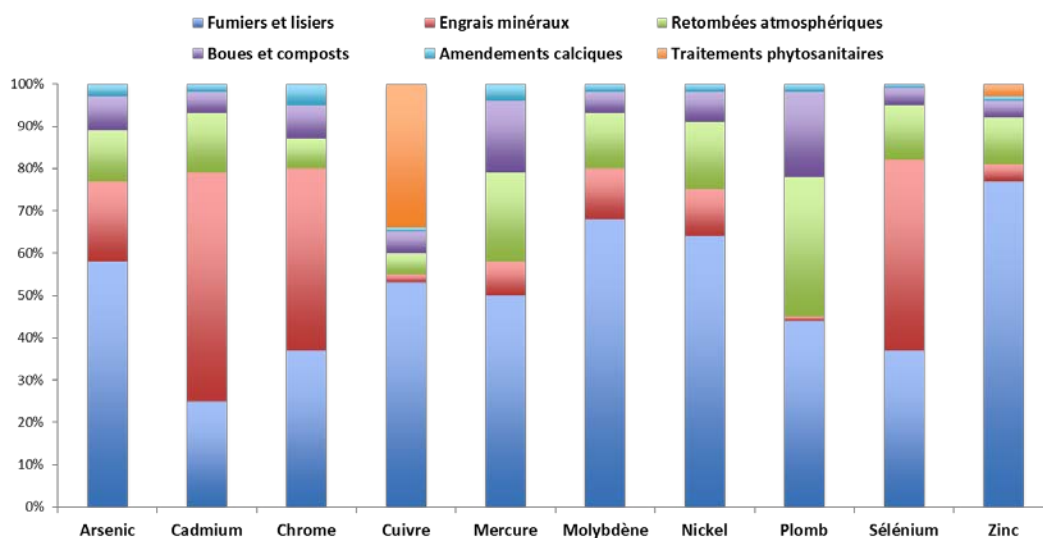
### 1.2.2. Origine anthropique de la pollution

L'Homme modifie la composition en ETM des sols (Bourrelier, Berthelin et Pédro 1998), que ce soit à travers l'agriculture, les activités industrielles ou l'accumulation de ses déchets (Figure I-2, ⑤) et a ainsi contribué à la pollution des sols. Un site pollué présente un risque pérenne, avéré ou potentiel, pour la santé humaine et l'environnement. La pollution locale (quelques dizaines d'hectares), ou ponctuelle (quelques mètres carrés) des sols peut avoir plusieurs origines:

- L'essor des activités industrielles, métallurgiques et sidérurgiques depuis 1930 a conduit à la libération de déchets métalliques (e.g. Cd, Pb et Zn) sous forme de poussières, de gaz ou de liquides chargés en ETM (Figure I-2 ⑥ et Tableau I-1).
- L'urbanisation et les stockages de déchets urbains bruts, l'augmentation de la combustion de sources d'énergies fossiles (e.g. charbon, circulation automobile), ont conduit à une augmentation de la pollution des sols par les ETM.

**Tableau I-1 : Évolution de la production mondiale en ETM (d'après Alloway 2012).**

| Elément | Production mondiale (tonnes) |           |            |            |
|---------|------------------------------|-----------|------------|------------|
|         | 1973                         | 1994      | 2004       | 2010       |
| As      | -                            | 43 000    | 37 500     | 54 500     |
| Cd      | 17 200                       | 18 100    | 17 200     | 22 000     |
| Cr      | -                            | 9 570 000 | 17 000 000 | 22 000 000 |
| Co      | -                            | 18 500    | 46 900     | 88 000     |
| Cu      | 7 116 900                    | 9 430 000 | 14 500 000 | 16 200 000 |
| Pb      | 3 487 000                    | 2 800 000 | 3 150 000  | 4 100 000  |
| Mn      | -                            | 7 190 000 | 11 000 000 | 13 000 000 |
| Hg      | 9 300                        | 1 760     | 1 750      | 1 960      |
| Ni      | 710 000                      | 906 000   | 1 400 000  | 1 550 000  |
| Zn      | 5 709 400                    | 6 810 000 | 9 100 000  | 12 000 000 |



**Figure I-3 : Proportions des différentes sources agricoles d'ETM dans les sols (source : ADEME, 2012).**

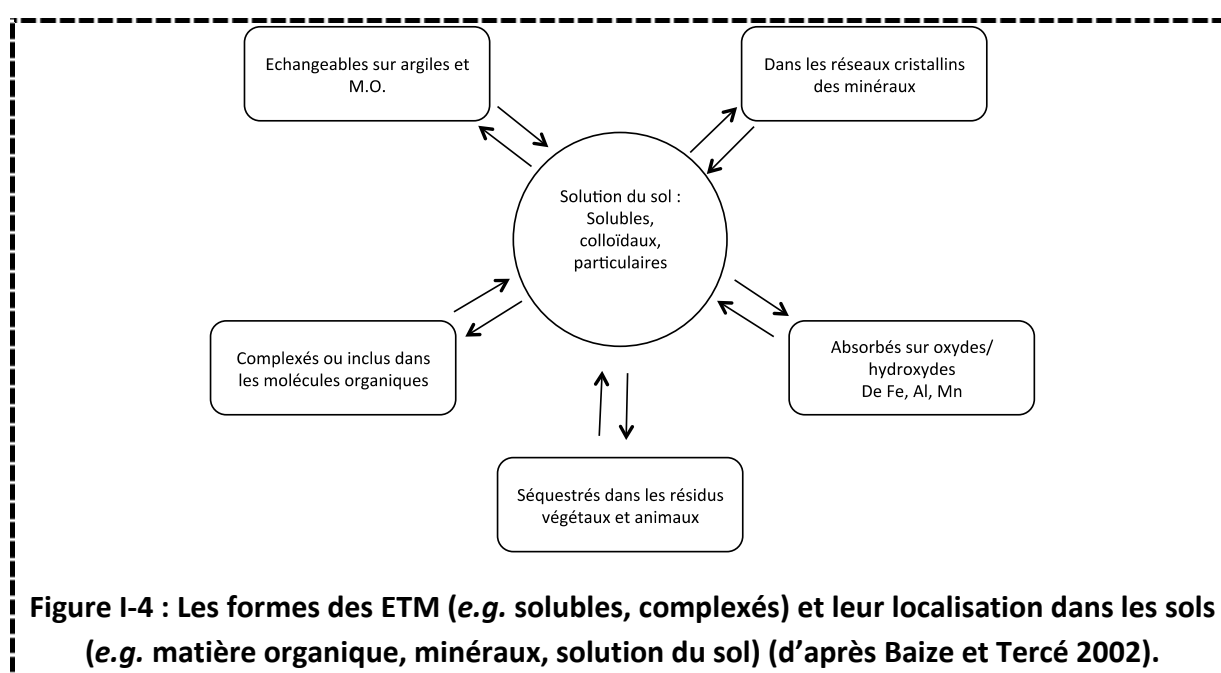
Enfin, les pratiques agricoles sont à l'origine d'apports en ETM via de différentes voies (**Figure I-3** et **Figure I-2** ⑤). Tout d'abord l'utilisation intensive d'engrais et de pesticides amène à une contamination massive en As, Cu, Hg, Mn et Pb (pesticides) et Cd (engrais phosphatés). Les scories de déphosphoration, longtemps utilisées comme amendement calcique contenaient une quantité non négligeable de Ni et de Cr. De même, l'épandage de lisiers ou de fumiers peut

représenter une source importante de Cu et de Zn. Enfin, l'utilisation de boues de stations d'épuration, de composts d'ordures ménagères ou d'effluents des industries agroalimentaires comme fertilisants entraînent également la libération d'ETM dans les sols. Afin de réguler ces apports, une réglementation a été instaurée en 1998.

### 1.3. Spéciation et biodisponibilité des ETM dans l'environnement

Les ETM s'incorporent dans le sol sous différentes formes : en solution, dissoute, colloïdale, libre ou complexée, solide ou précipitée, en liaison avec des phases minérales ou organiques (**Figure I-4**) (Violante *et al.* 2010). Beaucoup de ces formes chimiques sont peu mobiles. De ce fait, les métaux, ne pouvant être dégradés, persistent longtemps dans les sols (*e.g.* le Pb peut persister entre 150 et 5000 ans) et s'y accumulent parfois jusqu'à représenter un pourcentage significatif. D'autres formes, par contre, sont suffisamment mobiles pour diffuser dans l'eau et le sol et peuvent être assimilées par les êtres vivants. De ce fait, la toxicité des ETM n'est pas seulement fonction de leur teneur totale mais dépend surtout de leur biodisponibilité (Gadd 1993).

Le terme de biodisponibilité est défini comme étant « l'aptitude d'un élément à être transféré dans un être vivant » (Kabata-pendias 2004). La biodisponibilité varie fortement selon la spéciation des éléments. Cette spéciation est influencée par différents facteurs physiques (*e.g.* le pH, le potentiel d'oxydoréduction, la capacité d'échange cationique, le taux d'humidité, la température), chimiques (*e.g.* la solubilité des ETM, la teneur en éléments biodisponibles) et biologiques (la capacité des plantes et des micro-organismes à solubiliser les ETM) (Baize et Tercé 2002). Les intensités de ces facteurs sont susceptibles de varier dans le temps et l'espace et donc avec eux, la biodisponibilité des métaux.



Les flèches traduisent la possibilité des éléments à passer d'une forme à une autre.

## 1.4. Chiffres et réglementation française

### Les chiffres

Depuis 1990, les ministères chargés de l'écologie ont eu pour mission de répertorier l'ensemble des sites pollués présents sur le sol français. Ces données sont disponibles dans deux bases de données : Basol<sup>1</sup> et Basias<sup>2</sup>. La première répertorie les sites pollués qui nécessitent une action de traitement et la seconde recense les anciens sites industriels et les sites déjà traités. En 2016, Basol comptabilise 6454 sites et sols pollués sur l'ensemble du territoire (Métropole et DOM-TOM). La répartition géographique de ces sites montre des disparités régionales liées à l'historique industriel, minier ou commercial de chaque région. Ces sols pollués sont concentrés dans 6 % (2180 communes) de l'ensemble des communes françaises. Environ deux tiers d'entre elles comptabilisent seulement un site pollué. Par contre, huit grandes villes (Grenoble, Lille, Lyon, Marseille, Mulhouse, Reims, Strasbourg, Toulouse) et deux villes de taille plus modeste (Gennevilliers et Roubaix) recensent chacune plus de 20 sites et sols pollués.

Les contaminants le plus souvent identifiés dans les sols pollués européens en 2016 sont les métaux et les métalloïdes (35 %), les hydrocarbures (24 %) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (11 %). Au niveau des nappes phréatiques les proportions de ces mêmes polluants sont respectivement de 31, 22 et 15 %.

### Les normes françaises

Afin de limiter les problèmes de pollution aux ETM en France, certaines réglementations ont été mises en place. Ces dernières visent à diminuer les entrées de polluants dans les eaux, les sols et l'alimentation humaine. Ces seuils sont particulièrement difficiles à déterminer tant ils dépendent de l'ETM étudié, du sol, de sa biodisponibilité mais aussi de l'usage fait des sols et des eaux.

**Tableau I-2 : Valeurs seuils dans les eaux de consommation autorisées par l'OMS en 2006 (exprimées en mg/l).**

| Élément       | As   | Cd    | Cr   | Cu | Hg    | Ni   | Pb   | Se   | Zn |
|---------------|------|-------|------|----|-------|------|------|------|----|
| Concentration | 0,01 | 0,003 | 0,05 | 2  | 0,006 | 0,07 | 0,01 | 0,01 | 3  |

<sup>1</sup> <http://basol.developpement-durable.gouv.fr/>

<sup>2</sup> <http://basias.brgm.fr/>

Les seuils limites d'ETM sont fixés par deux circulaires : DCE 2006/18<sup>3</sup> du 21 décembre 2006 pour les eaux souterraines et 2005/12 du 28/07/2005<sup>4</sup> pour les eaux douces de surface. En ce qui concerne les eaux de consommation, elles doivent se conformer à une norme établie par l'OMS (**Tableau I-2**). Concernant l'alimentation humaine, les normes en vigueur en France sont celles établies par l'Union Européenne (EC 466/2001)<sup>5</sup> pour le Pb et le Cd dans les aliments. Elles sont résumées dans le **Tableau I-3**.

**Tableau I-3 : Teneurs maximales (en mg/kg de matière sèche) en Pb et Cd autorisées dans les aliments (d'après EC n° 466/2001).**

| Aliments                 | Pb        | Cd         |
|--------------------------|-----------|------------|
| Viande                   | 0,1       | 0,05       |
| Poisson                  | 0,2 - 0,4 | 0,05       |
| Céréales et légumineuses | 0,2       | 0,1 – 0,2  |
| Légumes                  | 0,1 – 0,3 | 0,05 – 0,2 |

L'épandage des boues de stations d'épuration sur des terrains agricoles fait l'objet d'une norme (NF U 44-041) définissant des valeurs limites autorisées dans les boues et dans les sols susceptibles de les accueillir. Elle a été mise en place le 2 février 1998 (**Tableau I-4**). Elle concerne les « boues des ouvrages de traitement des eaux usées urbaines » considérées comme des « matières fertilisantes » et devant donc répondre à certaines spécifications. Cette norme est basée sur quatre classes, définies par Godin en 1982 :

- **Seuil d'anomalie** : Concentration maximale rencontrée dans les sols courants,
- **Seuil d'investigation** : Concentration dans le sol au-delà de laquelle une étude approfondie du site est nécessaire,
- **Seuil de traitement** : Concentration dans le sol au-delà de laquelle un traitement est nécessaire,
- **Seuil d'urgence** : Concentration dans le sol au-delà de laquelle un traitement s'impose dans un délai de 3 mois.

La législation prévoit également une analyse de la teneur en ETM avant le 1<sup>er</sup> épandage, puis une autre tous les 10 ans. Le pH du sol après épandage doit impérativement être maintenu à une valeur supérieure ou égale à 6. En effet, les ETM sont d'autant moins mobiles et biodisponibles dans les sols que le pH est neutre ou alcalin (Baize, 2002).

<sup>3</sup> [http://www.ineris.fr/aida/consultation\\_document/7349](http://www.ineris.fr/aida/consultation_document/7349)

<sup>4</sup> [http://www.ineris.fr/aida/consultation\\_document/7475](http://www.ineris.fr/aida/consultation_document/7475)

<sup>5</sup> [http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/fcr/fcr02\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/fcr/fcr02_en.pdf)

**Tableau I-4 : Norme française relative aux boues d'épuration et teneurs maximales en ETM dans les sols (en mg/kg matière sèche) (Arrêté du 2 février 1998).**

| ETM considéré                                       | Cd | Co  | Cr   | Cu   | Ni  | Pb   | Zn   |
|-----------------------------------------------------|----|-----|------|------|-----|------|------|
| Seuil d'anomalie                                    | 2  | 30  | 150  | 100  | 50  | 100  | 300  |
| Seuil d'investigation                               | 4  | 60  | 300  | 200  | 100 | 200  | 600  |
| Seuil de traitement                                 | 10 | 150 | 750  | 500  | 250 | 500  | 1500 |
| Seuil d'urgence                                     | 20 | 300 | 1000 | 1000 | 500 | 1000 | 3000 |
| Teneur maximale dans les boues épandues             | 2  | -   | 150  | 100  | 50  | 100  | 300  |
| Teneur maximale dans les sols accueillant les boues | 20 | -   | 1000 | 1000 | 200 | 800  | 3000 |

## **2. Effet des ETM sur les organismes terrestres**

### **2.1. La notion d'éléments essentiels et d'éléments toxiques**

Les ETM peuvent être séparés en deux classes en fonction de leurs effets sur les organismes: les métaux toxiques dont aucune fonction physiologique n'est connue à ce jour (*e.g.* Pb et Hg) et les éléments essentiels.

Ces derniers ont été définis par Arnon et Stout en 1939 et répondent aux caractéristiques suivantes : (i) En l'absence de l'élément, un organisme donné ne peut réaliser son cycle de vie, (ii) un autre élément ne peut remplacer la fonction d'un élément essentiel, (iii) l'élément essentiel est impliqué directement dans le métabolisme de l'organisme, en tant que cofacteur enzymatique par exemple, ou parce qu'il est nécessaire dans une réaction enzymatique (Waldron *et al.* 2009).

A partir de cette définition les éléments (traces) essentiels et bénéfiques chez les végétaux sont : Mn, Zn, Cu, B, Mo et Ni (Bargagli 1998). Concernant l'homme et les animaux les éléments suivants sont reconnus comme essentiels: Cu, Co, Mn, Mo, Ni, Se, Sn (Bargagli 1998).

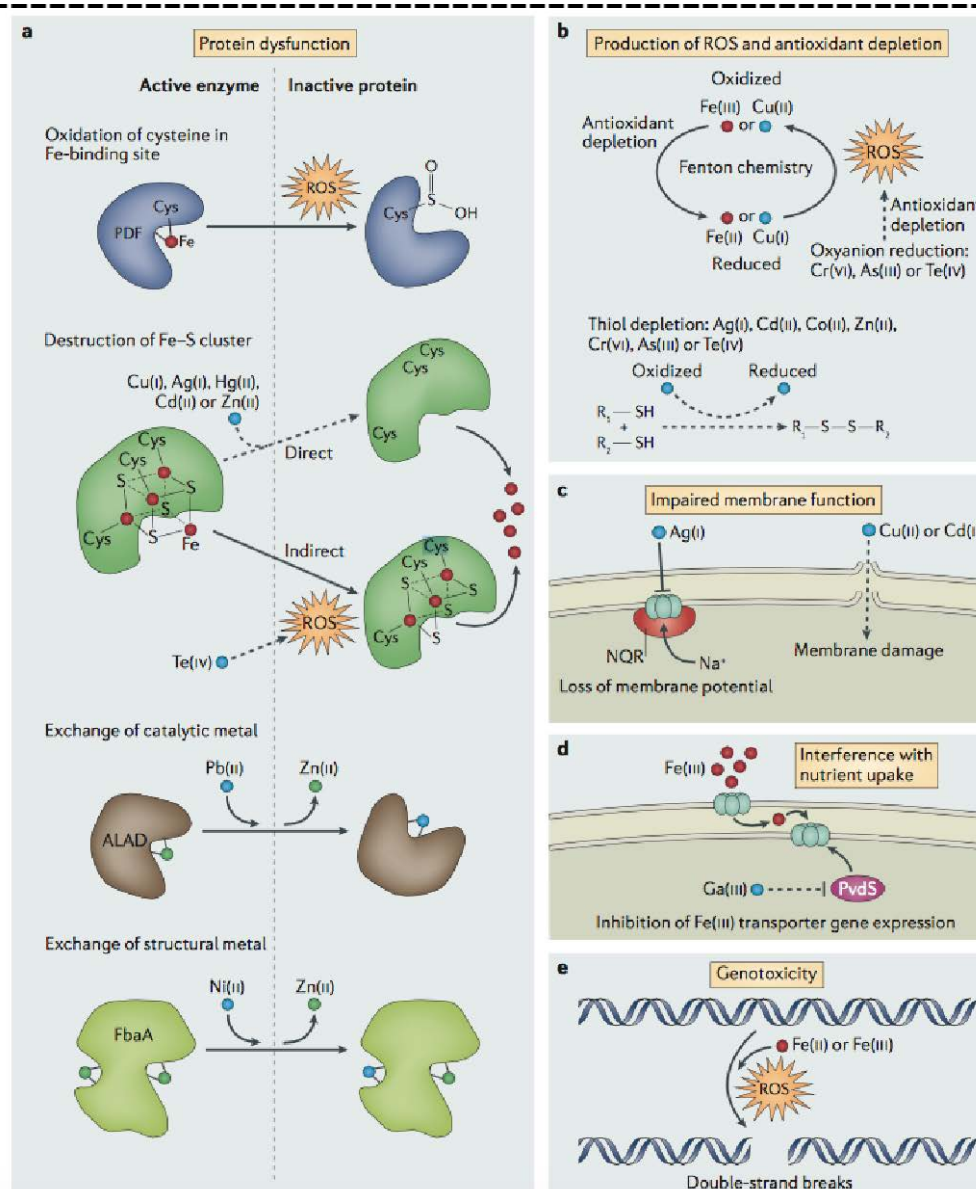
Cependant, bien que nécessaires au métabolisme, ces éléments deviennent toxiques lorsqu'ils sont présents sous des formes biodisponibles dont la concentration est supérieure à un certain seuil. Ce dernier est dépendant de l'organisme, du tissu et de la nature de l'élément (Gadd 1992). De façon générale, la toxicité des métaux est liée à cinq grandes familles de mécanismes illustrés dans la **Figure I-5**. Ces mécanismes peuvent agir seuls ou de manière combinée, et sont variables suivant l'ETM considéré et sa spéciation. Une brève description de ces mécanismes est donnée ci-après.

- La synthèse des **espèces réactives de l'oxygène (ERO)** (**Figure I-5 b**) est induite par certains ETM (*e.g.* Cu, Fe, Mn) (Valko *et al.* 2005). Ces ETM sont capables de

transférer un de leurs électrons sur une molécule acceptrice d'oxygène et de générer ainsi des ERO ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $^{\bullet}\text{OH}$ ). Ces ERO ont une action directe sur la cellule en entraînant des modifications ou une rupture des brins d'ADN (Cabiscol *et al.* 2000).

- Le **dysfonctionnement** des protéines (**Figure I-5 a**), peut être induit par différentes causes. (i) La présence d'ERO qui vont oxyder les groupements sulfhydryles (-SH) ou détruire certains complexes protéiques (*e.g.* les cluster Fe-S) (Lemire *et al.* 2013). (ii) La **fixation** des ETM sur les groupements sulfhydryles et sulfures, sur les résidus cystéine et méthionines (-SCH<sub>3</sub>) des protéines. Cette fixation peut engendrer des modifications de la conformation du site actif, à des déplacements de ce dernier et à des pertes de fonctionnalité (Peralta-Videa *et al.* 2009). L'exposition de la plante *Phaseolus vulgaris* à de fortes teneurs en Zn entraîne un déplacement des atomes de Mg présents dans les photosystèmes et inhibe, par conséquent, le transfert des électrons (Dalcorso *et al.* 2013). (iii) La **substitution** d'un ETM essentiel par un autre de même taille et de même charge peut altérer la structure des protéines et des enzymes, ce qui peut conduire à une perte de fonctionnalité (Length 2007).
- L'altération des **membranes cellulaires** (**Figure I-5 d**) peut se traduire par une peroxydation des lipides due au stress oxydatif. Il en résulte une perte de l'intégrité membranaire, ou une perte de la polarité en raison de l'inactivation de certains transporteurs et canaux ioniques (Avery 2011).
- Une interférence du/des ETM avec l'assimilation des nutriments (**Figure I-5 d**). A titre d'exemple, une contamination au Cr entraîne une altération de l'assimilation des sulfates chez *Saccharomyces cerevisiae* (Lemire *et al.* 2013).

L'effet des ETM à l'échelle moléculaire et cellulaire est généralisable à l'ensemble des organismes (*e.g.* plantes, animaux, microorganismes). Cependant, d'autres effets sont plus spécifiques à tel ou tel organisme. Afin d'illustrer cette spécificité, les effets des ETM sur la physiologie végétale, sur les microorganismes du sol et sur la santé humaine sont présentés dans les paragraphes suivants.



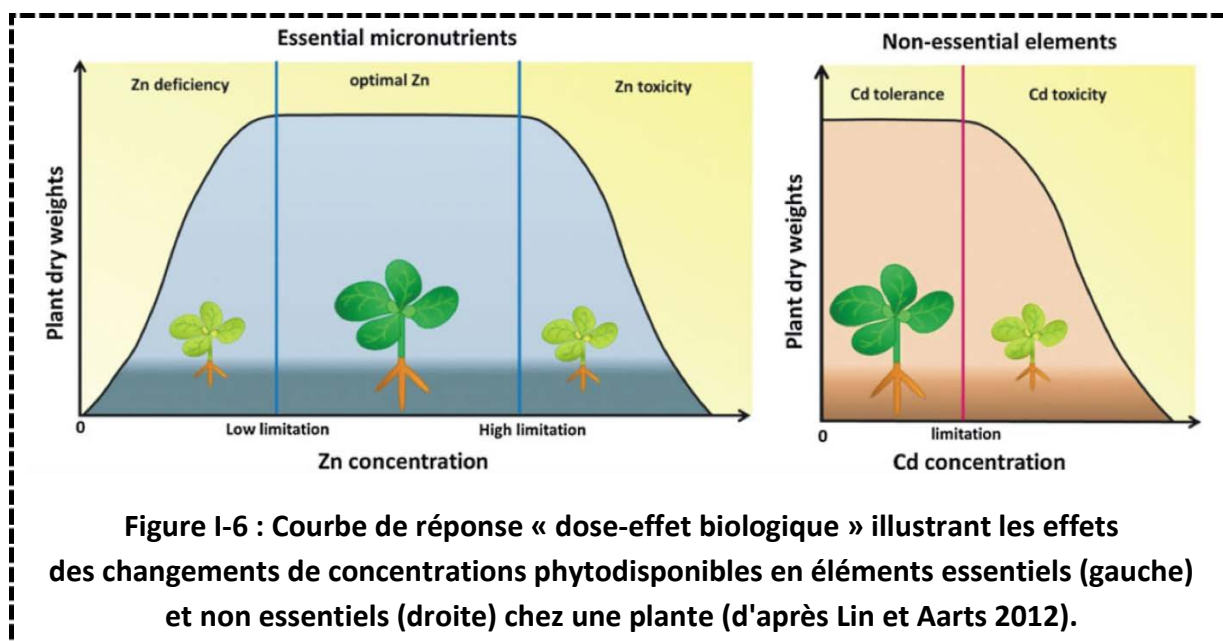
**Figure I-5 : Effets essentiels et toxiques des ETM à l'échelle moléculaire et cellulaire (d'après Lemire *et al.* 2013).**

La figure (a) montre le dysfonctionnement des protéines suite à un excès d'ETM dans l'environnement, (b) la réponse oxydante face à ce même stress, (c) et (d) les effets des ETM sur les membranes et (e) sur l'ADN.

## 2.2. Effet des ETM sur les plantes

En fonction de l'élément et de son rôle dans le métabolisme cellulaire, différentes courbes de réponses peuvent être obtenues (**Figure I-6**) chez les plantes. Une courbe en cloche formées de trois phases : déficience, optimum et toxicité est obtenue en réponse aux éléments essentiels (*e.g.* Mn, Fe, Zn). À l'inverse pour les éléments non-essentiels (*e.g.* Hg, As, Cd), une courbe diphasique (tolérance et toxicité) est obtenue. En présence d'ETM en excès le symptôme le plus commun est la chlorose, associée à un déficit de la production de

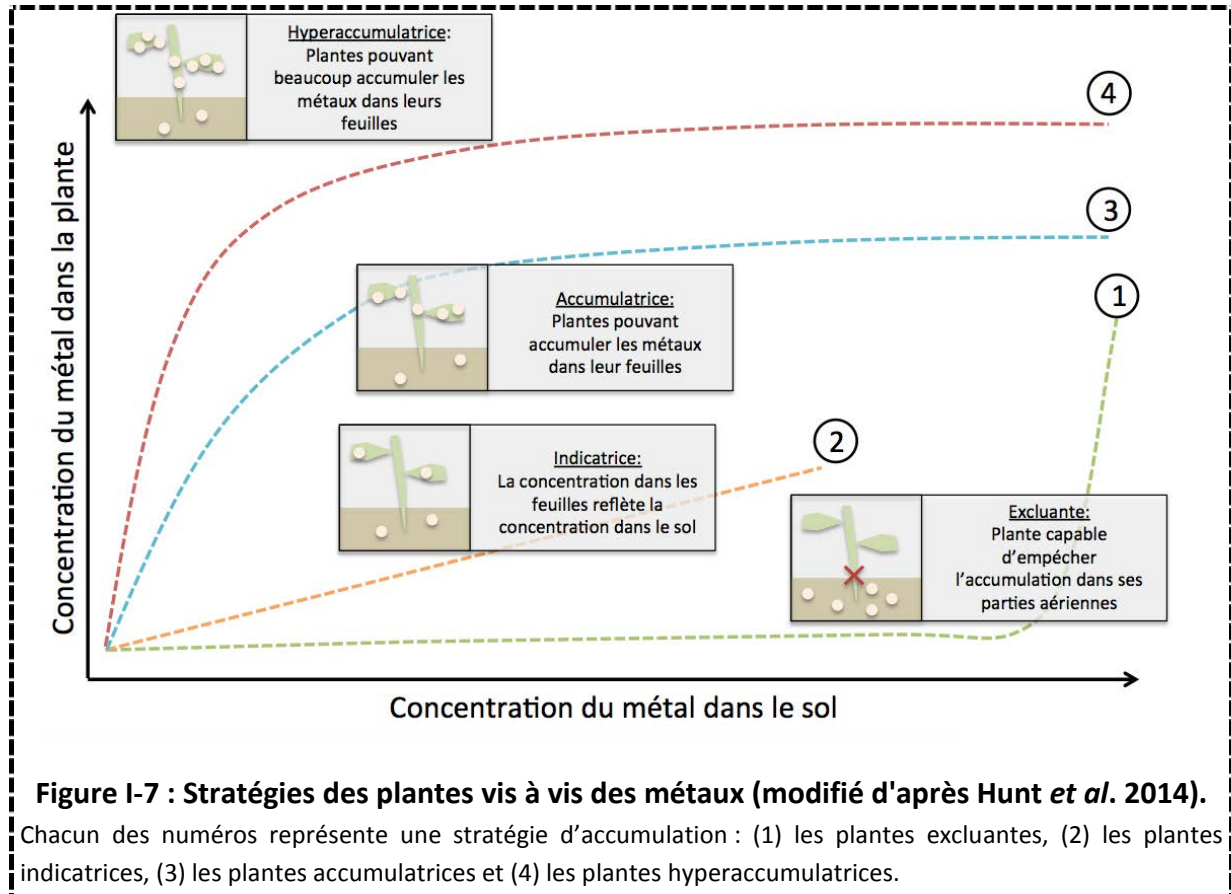
chlorophylles. Par ailleurs, des anomalies morphologiques peuvent survenir : forme anormale des fruits, nécrose des feuilles, rabougrissement, inhibition de l'élongation racinaire (Nagajyoti *et al.* 2010). En général, la toxicité des ETM sur les plantes est due à la formation d'ERO ou à une carence en Fe, due à la substitution de cet élément par un autre (§ 2.1).



Les plantes sont capables d'absorber les ETM présents dans le sol ou dans l'atmosphère et de les accumuler dans leurs tissus. En fonction du facteur de transfert sol-plante et de la tolérance de ces dernières, Baker (1981) a réalisé un classement des quatre types de réponses observables chez les plantes (**Figure I-7**). Chaque réponse étant ETM-dépendante :

- Le terme « **excluanes** » (**Figure I-7 ①**) qualifie les plantes présentant une forte concentration de métaux dans leurs parties racinaires mais qui ne transfèrent que très peu ces éléments aux parties aériennes (ratio concentration partie aérienne/ partie racinaire inférieur à 1).
- Le terme « **indicatrices** » (**Figure I-7 ②**) qualifie les plantes dont la teneur en ETM dans les parties aériennes est proportionnelle à celle du sol.
- Le terme « **accumulatrices** » (**Figure I-7 ③**) qualifie les plantes capables de transloquer et de stocker les ETM en quantité non négligeable dans les parties aériennes.
- Le terme « **hyperaccumulatrices** » (**Figure I-7 ④**) qualifie les plantes pouvant accumuler de très grandes concentrations dans leurs parties aériennes (*e.g.* > 1000 mg Ni par kg de masse sèche, > 100 mg/kg de Cd ou > 500 mg/kg de Co).

En outre, la présence d'ETM dans les parties aériennes des plantes peut poser des problèmes sanitaires, lorsque ces dernières sont comestibles et introduites dans la chaîne alimentaire. Dans ces cas précis, l'ingestion de ces plantes engendre un risque pour la santé (Gardea-Torresdey *et al.* 2005; Pelfrène *et al.* 2013).



### 2.3. Effet des ETM sur la santé humaine

L'ingestion, l'inhalation, et parfois la pénétration par voie cutanée ou parentérale sont les principaux modes de pénétration des ETM chez l'Être humain.

A des doses trop importantes ou, sous forme inappropriée, les ETM peuvent s'avérer toxiques. Les pathologies reliées aux ETM sont nombreuses et de gravités variables : de la dermatose à la carcinogénèse en passant par les troubles cardiovasculaires (Bleackley et Macgillivray 2011). De plus, il est reconnu qu'une exposition chronique à ces éléments augmente drastiquement les risques de cancer, de dépression, d'hypertension et de dérèglements neuronaux et hormonaux (Järup 2003).

Les métaux les plus néfastes pour la santé humaine sont le Pb, le Cd, le Hg et l'As (Peralta-Video *et al.* 2009). Ils sont la cause de certaines maladies dont :

- Le **saturnisme** (troubles du système nerveux central et périphérique) causé par un excès de Pb (souvent observé avec les anciennes canalisations d'eau),

- Les maladies de **Parkinson** et d'**Alzheimer** dont les apparitions peuvent être accentuées par une contamination au Hg,
- La maladie **Itai-itai** (problèmes rénaux et osseux) causée par un excès de Cd.

## 2.4. Effets des ETM sur les microorganismes du sol

Les microorganismes sont les premiers organismes en contact direct avec la pollution. Les effets des ETM sur les microorganismes se résument en une diminution de la biomasse microbienne et de sa diversité (Duxbury 1985). De plus, en diminuant le pool de microorganismes ou leur activité, les ETM engendrent également une diminution de la décomposition de la matière organique, de la respiration et de certaines activités enzymatiques (Kabata-Pendias 2011). L'évaluation de la toxicité des ETM sur la vie microbienne nécessite l'utilisation d'indicateurs. Les plus utilisés sont : la respiration ( $qCO_2$ ) qui est estimée par la libération de  $CO_2$  ; les activités enzymatiques intervenant dans les cycles du P, du C ou du S par exemple, l'abondance (*i.e.* le nombre d'individus) et la diversité (*i.e.* la variabilité) des microorganismes (Leita De Nobili *et al.* 1995; Wang *et al.* 2007).

### 2.4.1. Abondance microbienne

L'effet des ETM sur les communautés microbiennes varie en fonction du groupe d'organismes considéré, de l'élément étudié et de l'environnement (Duxbury 1985). Il a été rapporté à plusieurs reprises que les communautés bactériennes sont plus sensibles aux ETM que les communautés fongiques, ce qui se traduit par une augmentation du ratio champignon/bactérie en réponse à une augmentation des polluants métalliques dans le sol (Bewley 1980; Bisessar 1982; Rajapaksha *et al.* 2004). Cependant, à des concentrations élevées en ETM l'ensemble des populations est affectée entraînant de sévères diminutions de l'abondance (Duxbury 1985; Gadd 1992). Ce phénomène est illustré dans le **Tableau I-5** où l'abondance microbienne est comparée entre un sol non pollué et un sol pollué par du Cd (500 mg/l de sol) et du Pb (1000 mg/l de sol) (Juwarkar *et al.* 2007).

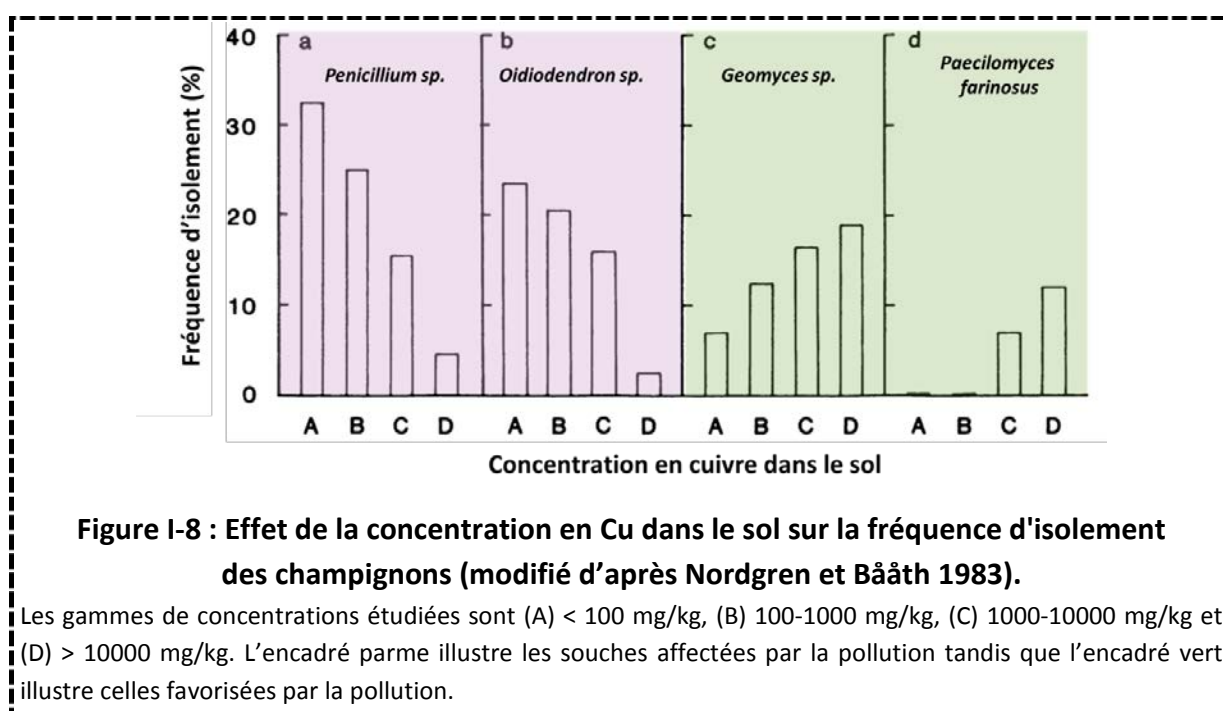
**Tableau I-5 : Abondance microbienne d'un sol non pollué et d'un sol pollué par du Pb et du Cd (Nagpur, Inde) (d'après Juwarkar *et al.* 2007)**

| Microorganismes (CFU/g de sol) | Sol non pollué   | Sol pollué       |
|--------------------------------|------------------|------------------|
| Bactéries                      | $17 \times 10^5$ | $58 \times 10^4$ |
| Champignons                    | $26 \times 10^3$ | $42 \times 10^2$ |
| Actinomycètes                  | $43 \times 10^3$ | $18 \times 10^1$ |
| <i>Azotobacter</i> spp.        | $23 \times 10^3$ | $17 \times 10^1$ |
| <i>Rhizobium</i> spp.          | $21 \times 10^3$ | $16 \times 10^2$ |

CFU= « colony-forming unit (CFU) » est une unité quantifiant le nombre de cellules viables et cultivables dans un échantillon.

### 2.4.2. Diversité microbienne

Les modifications des communautés de microorganismes sous l'influence des ETM résultent principalement de la sensibilité des différents genres, espèces ou souches (Duxbury 1985). Dans le cas d'une contamination importante, les microorganismes sensibles peuvent être décimés, alors que les microorganismes tolérants ne sont pas affectés ou voient même leurs effectifs augmenter, car la compétition avec les microorganismes sensibles a disparu. On parle alors de pression de sélection (Reaney *et al.* 1983). Par exemple, dans un sol pollué au Cu et au Zn, les champignons *Geomyces* et *Paecilomyces* ont leur biomasse qui s'accroît avec l'augmentation de la pollution alors qu'en parallèle une diminution de celle des *Penicillium* et *Oidiodendron* est observée (Nordgren et Bååth 1983) (Figure I-8).



D'autre part, il est suggéré qu'une contamination modérée favorise les mutations et les transferts d'informations génétiques, ce qui peut aboutir à une augmentation de la diversité microbienne (Reaney *et al.* 1983). De plus, les microorganismes peuvent aussi évoluer et s'adapter. Chez les champignons ectomycorhiziens *Suillus bovinus* et *Cenococcum geophilum* une adaptation au Zn et au Ni a été observée avec des populations exposées aux polluants par rapport à des populations non-exposées (Colpaert *et al.* 2004; Gonçalves *et al.* 2009).

### 2.4.3. Conséquence sur les activités dans la rhizosphère

La diminution de l'abondance et de la diversité des microorganismes en présence de polluants métalliques a pour conséquence notable d'altérer l'ensemble des activités enzymatiques dans lesquels ils interviennent (Duxbury 1985). Par exemple, la pollution des sols par du Cu et/ou du Zn affecte les microorganismes prenant part dans la nitrification et

la minéralisation de la matière organique (Doelman et Haanstra 1986; Kabata-Pendias 2011). De la même manière, les processus de dégradation de la matière organique, plus particulièrement de la cellulose, sont très affectés par les pollutions au Pb (Kabata-Pendias 2011). Les cycles biogéochimiques de certains éléments essentiels peuvent également être affectés, avec notamment la minéralisation du P et du S qui est réduite dans les sols pollués par les ETM (Vig *et al.* 2003; Wang *et al.* 2007).

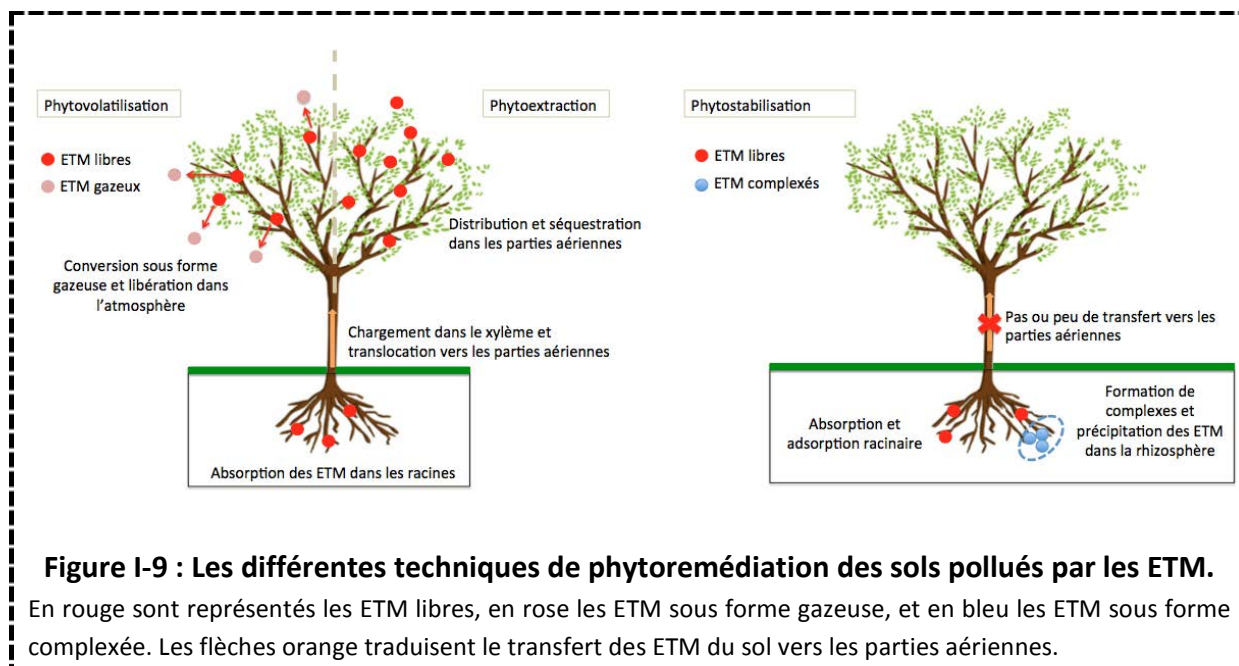
## 2.5. Conclusion

Les ETM ont des effets néfastes sur les Êtres vivants (*e.g.* plantes, microorganismes, humains) et plus généralement sur le fonctionnement général des écosystèmes. Ces problèmes nécessitent la mise en place de méthodes de dépollution adaptées aux différents environnements (zone humide, sols acides), à leur surface et à leur utilisation (*e.g.* terrain de loisir, immobilier). Ces méthodes doivent également s'adapter à la complexité et à l'hétérogénéité de chaque pollution.

## 3. Les techniques biologiques de remédiation des sols pollués par les ETM

L'obligation faite par le gouvernement français aux industriels de réhabiliter les terrains pollués (loi du 30 juillet 2003- article 27 L512-37 et 34-1 décrets 77-1133) lors de la cessation d'activité a créé un marché important favorisant le développement de diverses technologies de dépollution. Parmi les techniques de remédiation utilisées, celles adaptées aux ETM sont les suivantes : les procédés physico-chimiques, tels que l'excavation (47,8 \$/m<sup>3</sup> d'après Wan *et al.* 2016), le confinement, et le lavage des sols (71,4 \$/m<sup>3</sup>), la bioremédiation (59,9 \$/m<sup>3</sup>) adaptée uniquement à certains ETM, et la phytoremédiation (37,7 \$/m<sup>3</sup>). Ainsi, face aux contraintes de coût en énergie et en argent, aux conséquences sur les propriétés physico-chimiques du sol (*e.g.* maintien de la fertilité et de la structure), et encouragée par la loi Grenelle I (2009), la phytoremédiation s'impose peu à peu comme une technique pertinente et naturelle.

Cette technique fait intervenir les plantes pour immobiliser ou diminuer la teneur en polluants dans les sols. Cette technique peut être utilisée *in situ*, sans diminution de la biodiversité et de la fertilité des sols. Suivant les ETM et les plantes utilisées on distingue différents types de processus de phytoremédiation.



### 3.1.1. La phytoextraction

La phytoextraction est une technique de remédiation reposant sur la capacité des plantes à prélever des contaminants depuis le sol (ou l'eau) par les racines et les transférer et accumuler dans les parties aériennes (**Figure I-9**). Cette technique est particulièrement adaptée aux sols présentant une pollution diffuse, où les polluants sont présents en proportion modérée et en surface. Elle peut être couplée à l'ajout de chélateurs pour augmenter la mobilité et l'absorption des éléments dans la plante (Huang *et al.* 1997).

La phytoextraction est influencée par les caractéristiques physiologiques et génétiques des plantes. De récentes observations soulignent l'importance du choix des plantes qui doivent notamment respecter certains critères (Phielers *et al.* 2013): (i) avoir une croissance rapide et une forte production de biomasse, (ii) être tolérantes aux métaux et (iii) pouvoir accumuler une grande quantité de métaux dans leurs parties aériennes, (iv) posséder un système racinaire profond et étendu, (v) s'adapter aux caractéristiques du sol à traiter (plantes natives ou adaptées), (vi) et nécessiter peu d'entretien.

Peu ou pas de plantes répondent à l'ensemble de ces critères. On peut noter l'utilisation de plantes hyperaccumulatrices (*e.g.* *Noccaea caerulescens*, *Berkeya codii* et *Alyssum murale*) présentant des capacités d'accumulation et un facteur de bioconcentration important, et l'utilisation de plantes à fort rendement de biomasse mais à plus faible accumulation (*e.g.* saule ou peuplier).

Les parties aériennes concentrées en métaux sont ensuite retraitées par combustion, pyrolyse ou gazéification (Chalot *et al.* 2012; Bert *et al.* 2017), ou faire l'objet d'une récupération des ETM par chélation et utilisés à des fins industrielles ou pharmaceutiques (Mahar *et al.* 2016).

### 3.1.2. La phytovolatilisation

La phytovolatilisation utilise les plantes pour transférer les ETM du sol vers l'atmosphère. En effet, certains éléments (*e.g.* As, Hg et Se) peuvent être présents sous forme gazeuse dans l'environnement (**Figure I-9**). Dans ce procédé, les ETM sont absorbés par les racines, transférés dans les parties aériennes où ils sont transformés sous leur forme volatile avant d'être émis dans l'atmosphère. Cette technique a tout d'abord été utilisée pour la remédiation des sols contaminés au mercure, les ions  $\text{Hg}^{2+}$  et le Hg organique pouvant être transformés en  $\text{Hg}^0$  (Kabata-Pendias 2011). De la même façon, le Se peut être transformé en  $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$  qui est volatile (Kabata-Pendias 2011).

### 3.1.3. La phytostabilisation

La phytostabilisation vise à végétaliser un sol pollué dans le but d'immobiliser les ETM dans le sol (**Figure I-9**). Cette technique permet la diminution du transfert des polluants vers les nappes phréatiques et vers l'atmosphère. De plus, la présence du couvert végétal limite d'une part l'érosion hydrique et éolienne, et d'autre part le contact direct avec les animaux et les hommes (Mahar *et al.* 2016). Les ETM sont immobilisés dans la rhizosphère grâce à différents mécanismes dont l'adsorption au niveau des racines, la précipitation dans la rhizosphère, la complexation ou le changement de l'état de valence du métal (**Figure I-9**) (Bolan *et al.* 2011).

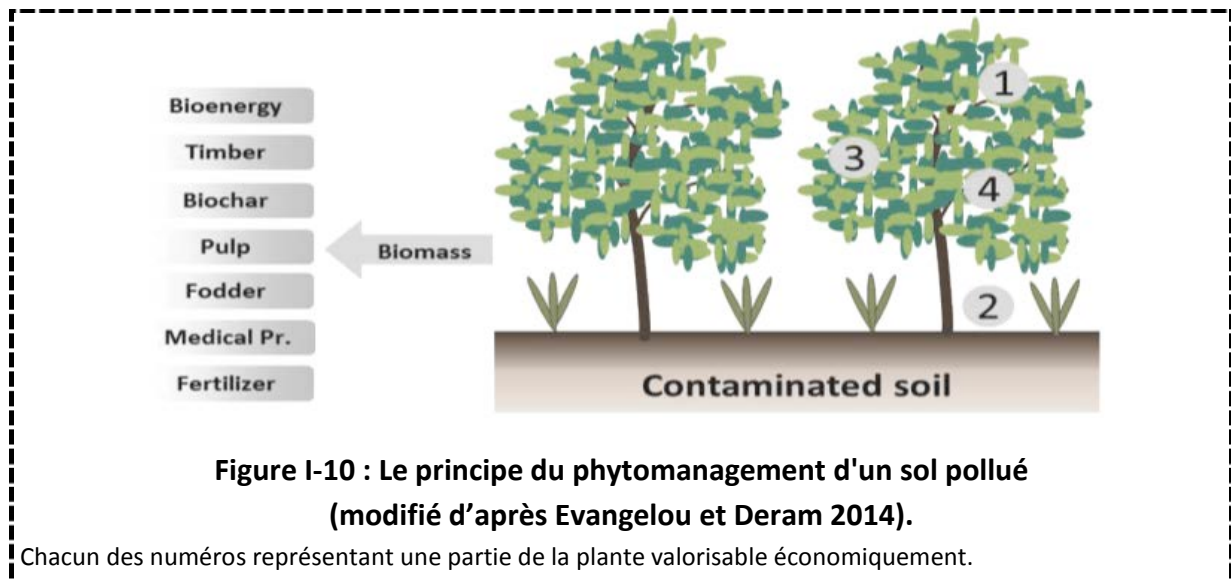
Le choix de la plante et l'apport d'un amendement (*e.g.* agents alcalins, phosphates, matière organique) sont deux critères importants dans la réussite de la remédiation. En particulier, le choix de la plante doit tenir compte des critères suivants (Phieler *et al.* 2013): (i) être tolérante aux ETM présents dans le sol, (ii) avoir une croissance rapide avec une grande capacité de couverture du sol et un système racinaire étendu et abondant, (iii) pouvoir retenir les polluants au niveau des racines ou de la rhizosphère, (iv) avoir une faible capacité à accumuler les polluants, (v) nécessiter un entretien réduit, et (vi) avoir une longévité importante.

Contrairement à la phytoextraction, les polluants ne sont pas extraits du sol, ce qui nécessite un monitoring permanent afin de veiller au maintien des conditions stabilisantes.

### 3.1.4. Un cas particulier : le phytomanagement

Le phytomanagement considère le sol contaminé comme une ressource économique et non comme un problème (Evangelou *et al.* 2015). Cette philosophie, dérivée de la phytoremédiation repose sur certains critères : (i) l'utilisation de sols délaissés ou pollués afin de ne pas accroître la pression existante sur les sols agricoles, (ii) la production de biomasse non alimentaire mais valorisable économiquement (**Figure I-10**), et (iii) la diminution du transfert des ETM dans les différents compartiments (*e.g.* plantes, animaux, êtres humains).

Un large panel de plantes peut être employé dans le cadre du phytomanagement (Evangelou *et al.* 2015). Pour la production de bioénergie, le saule, le peuplier ou encore le miscanthus peuvent être utilisés. Le hêtre, l'eucalyptus ou le bouleau sont plus adaptés pour la filière bois de construction. Enfin, à titre d'exemple le tournesol et le maïs peuvent être utilisés pour la fabrication de biofuels et de bioéthanol, respectivement. De ce fait, à l'instar de la phytostabilisation, les plantes doivent croître rapidement et être tolérantes aux ETM. De plus afin de pouvoir commercialiser les sous-produits, ces derniers ne doivent pas contenir d'ETM ou, à l'état de traces.



Chacun des numéros représentent une partie de la plante qui sera valorisée en différents sous-produits (*e.g.* fibres, énergie). Outre un gain économique, le phytomanagement considère les nombreux services écosystémiques associés (*e.g.* stockage de carbone, habitat animal, rôle culturel et paysager) (Morel *et al.* 2014). Différents projets européens et français ont étudié quels pourraient être les essences utilisables en phytomanagement. Parmi ces projets :

- Le projet PROLIPHYT<sup>6</sup>, supporté par l'ADEME a pour but de choisir parmi 30 essences de plantes ligneuses, les meilleurs candidats pour des projets de phytomanagement.
- Le projet LORVER<sup>7</sup>, financé par la région Lorraine et le FEDER, a pour ambition la création d'une filière de production de biomasse végétale non-alimentaire par la valorisation de sites dégradés et de sous-produits industriels.

<sup>6</sup> <http://dendroremediation.univ-fcomte.fr/spip.php?rubrique64>

<sup>7</sup> <http://www.lorver.org/accueil/index.html>

- le projet GREENLAND<sup>8</sup> a eu pour objectifs de statuer sur les succès, les limites et la rentabilité du phytomanagement au sein de pays européens avec des plantes ligneuses (*e.g.* saules) et herbacées (*e.g.* ray-grass, tournesol).

### 3.2. Rôle des micro-organismes dans la phytoremédiation des sols pollués aux ETM

Les bactéries et champignons au contact direct (*e.g.* champignons mycorhiziens et endophytes) ou non (*e.g.* champignons rhizosphériques) de la plante peuvent jouer un rôle clef dans le succès de la phytoremédiation (**Figure I-11**).

Les microorganismes contribuent à la mobilité des ETM dans le sol. Par la sécrétion de métabolites ils peuvent soit augmenter, soit diminuer la biodisponibilité de ces éléments (**Figure I-11** - Gadd 2004). Ainsi, ils interviennent indirectement dans le transfert des ETM du sol à la plante. Par exemple, Hryniewicz *et al.* (2010) rapportent que l'inoculation du saule par le champignon ectomycorhizien *Hebeloma mesophaeum* en combinaison avec la bactérie *Bacillus cereus* entraîne une diminution de la concentration en Cd dans les parties foliaires et une amélioration de la nutrition minérale.

Les microorganismes peuvent également jouer un rôle dans la tolérance et le fitness des végétaux (**Figure I-11**). Notamment, la sécrétion de métabolites (*e.g.* phytohormones, composés organiques volatiles ; antibiotiques) peut avoir un effet positif sur les plantes, soit en agissant directement sur la croissance (*e.g.* composés auxiniques, cytokinines) soit en les protégeant contre certains stress biotiques ou en améliorant la nutrition et l'accessibilité aux ressources (*e.g.* sidérophores, minéralisation de l'azote et du phosphore) (Whipps 2001; Gamalero *et al.* 2009; Ma *et al.* 2011). L'inoculation de *Brassica rapa* par *Kluyvera ascorbata*, une bactérie synthétisant des sidérophores et contenant une 1-aminocyclopropan-1-carboxylic acide (ACC) déaminase permet une croissance optimale de la plante sur un sol riche en Ni (Burd *et al.* 1998).

Dans la suite du manuscrit nous nous limiterons à l'étude de l'impact des champignons qui sont associés aux des plantes (*i.e.* les champignons endophytes et les champignons mycorhiziens) sur la réponse des plantes en présence d'ETM.

---

<sup>8</sup> <http://www.greenland-project.eu/>

Simulating plant growth for enhancing bioproductivity

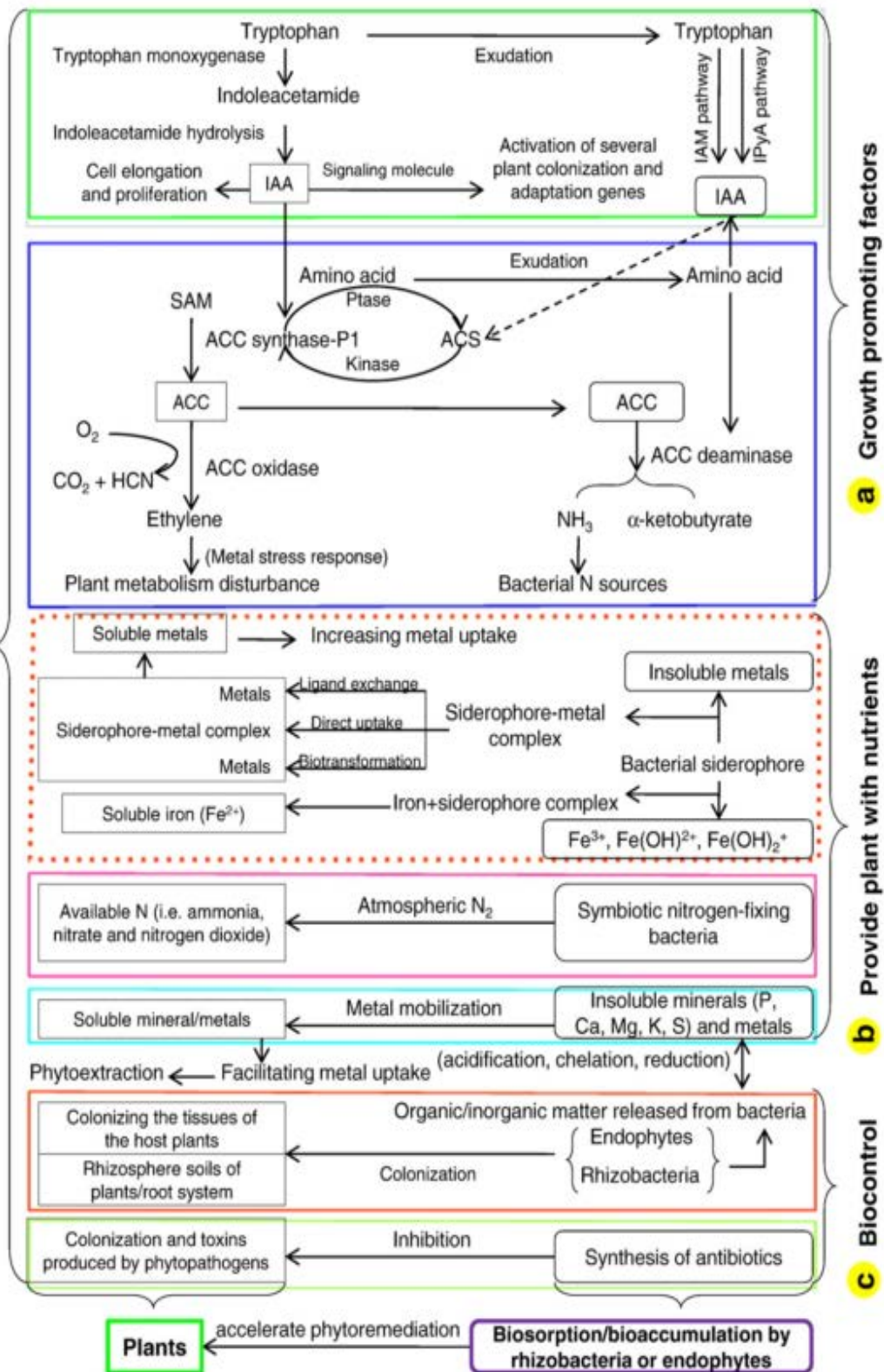


Figure I-11 : Les différents mécanismes microbiens qui stimulent la croissance végétale.

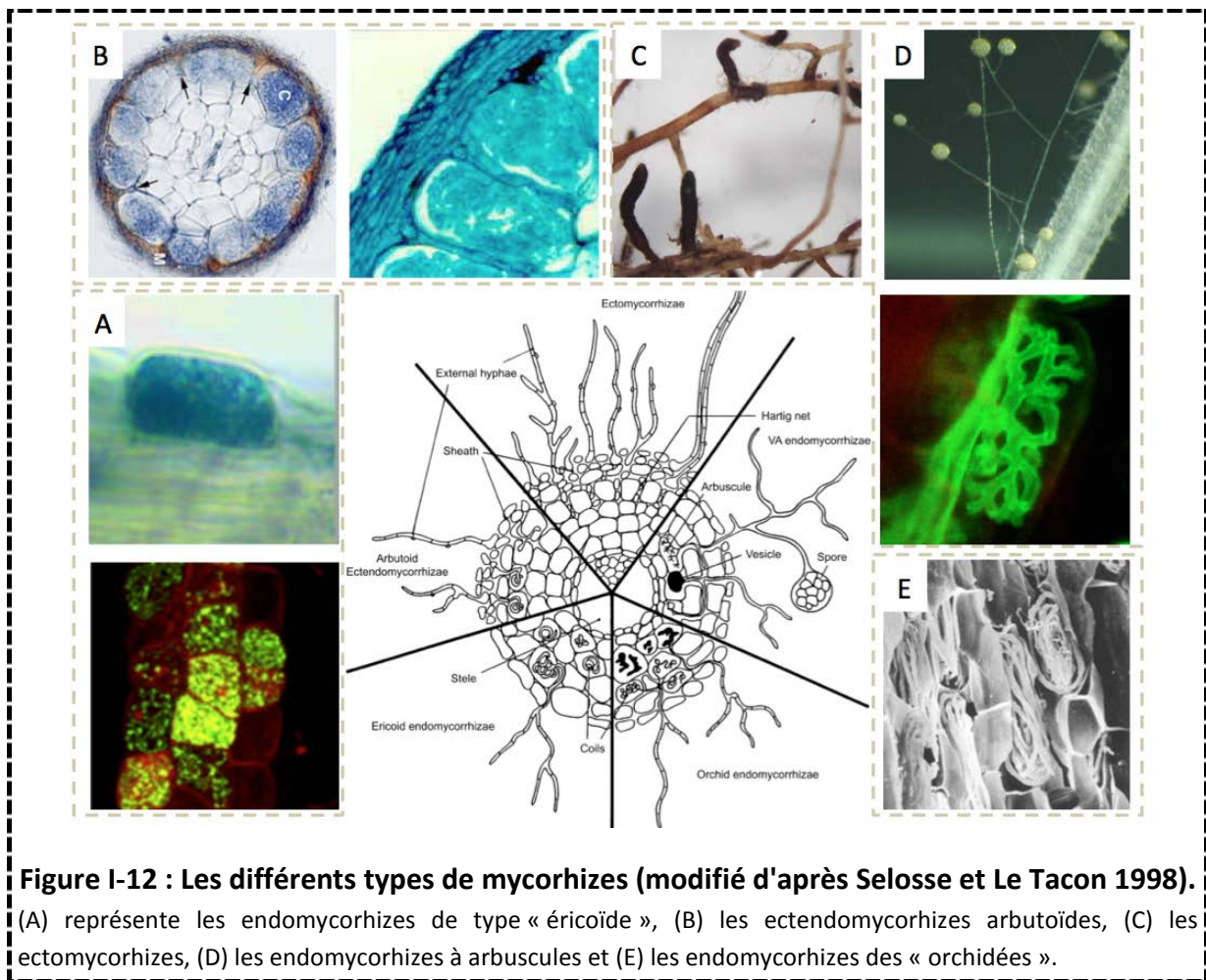
(a) promotion de la croissance, (b) de la nutrition végétale et (c) de la protection des plantes contre les stress biotiques (d'après Ma *et al.* 2011).

#### 4. Les champignons colonisant les plantes dans les sols pollués aux ETM

Les plantes se développant sur les sols pollués aux ETM interagissent avec de nombreux champignons localisés à la fois dans les parties aériennes et/ou racinaires. Ces microorganismes peuvent présenter des modes de vie différents : symbiotiques (*e.g.* les champignons mycorhiziens), mutualistes (*e.g.* les champignons endophytiques), voire commensaux. De plus ces microorganismes peuvent être présents conjointement dans la plante ou se succéder dans le temps. Cette succession peut se faire à l'échelle annuelle ou saisonnière (Deram *et al.* 2008; Op De Beeck *et al.* 2015).

De nombreuses études ont porté sur l'identification des champignons colonisant les plantes se développant dans des sols pollués par les ETM, et cela par l'utilisation de différentes techniques allant de la microscopie au séquençage haut débit (NGS). Les résultats obtenus soulignent une grande diversité de champignons/souches variant en fonction des types de polluants, de leur concentration et des plantes considérées (Likar and Regvar 2009; Op De Beeck *et al.* 2015). Cependant il semble s'exercer une distribution **intra** et **inter-clades** fortement liée aux gradients de polluants. Ainsi, Hassan *et al.* (2011) ont observé que les champignons endomycorhiziens du genre *Glomus* sont plus abondants dans les sols fortement contaminés que ceux des genres *Gigaspora*. Par ailleurs, différents auteurs ont souligné que les champignons bruns septés (*dark septate endophytes* ou DSE) seraient moins affectés par la pollution que les champignons endomycorhiziens dans les sols pollués (Ruotsalainen *et al.* 2007; Deram *et al.* 2011).

L'abondance et la grande diversité de ces champignons dans les racines des plantes laisse supposer qu'ils jouent un rôle sur leur croissance et leur installation dans les zones contaminées aux ETM (Hildebrandt *et al.* 2007; Colpaert *et al.* 2011; Likar et Regvar 2013). Par le passé, les champignons endo- et ectomycorhiziens ont fait l'objet de nombreuses études, qui ont montré leur rôle essentiel dans la croissance des plantes sur les sols pollués (Hildebrandt *et al.* 2007; Colpaert *et al.* 2011). À l'inverse, les rôles des champignons endophytes et plus particulièrement celui des DSE dans les sols pollués sont moins documentés.



**Figure I-12 : Les différents types de mycorhizes (modifié d'après Selosse et Le Tacon 1998).**

(A) représente les endomycorhizes de type « éricoïde », (B) les ectendomycorhizes arbutoïdes, (C) les ectomycorhizes, (D) les endomycorhizes à arbuscules et (E) les endomycorhizes des « orchidées ».

#### 4.1. Les champignons mycorhiziens

Les mycorhizes sont des symbioses entre les racines d'une plante et un champignon mycorhizien. Ces champignons sont abondants et colonisent la quasi-totalité des plantes terrestres. Des échanges bidirectionnels sont établis entre ces deux partenaires (Bonfante et Genre 2010). Le champignon fournit à la plante de l'N et du P qu'il assimile grâce à ses réseaux d'hyphes extramatriciels, alors que la plante lui apporte des photosynthétats riches en carbone.

##### 4.1.1. Les champignons endomycorhiziens

Des structures endomycorhiziennes retrouvées chez la plante *Aglaophyton major* et datant de l'ère primaire (Dévonien) indiquent que ce type d'association s'est établi il y a 353 à 462 millions d'années (Brundrett 2004). Les endomycorhizes regroupent trois sous-types de structures :

- Les mycorhizes à arbuscules forment des arbuscules et éventuellement des vésicules et au sein des cellules corticales (**Figure I-12-D**)
- les endomycorhizes de type éricoïde, dont l'interaction a lieu directement au niveau des cellules corticales des Ericacées car elles ne possèdent pas

d'épiderme. Ces mycorhizes se présentent sous la forme de pelotons à l'intérieur des cellules racinaires (**Figure I-12 -A**).

- les endomycorhizes des orchidées (**Figure I-12 E**) qui présentent un troisième type de structure dans les racines de ces plantes.

Les champignons endomycorhiziens sont des symbiotes obligatoires *i.e.* incapables d'utiliser les ressources carbonées du sol en l'absence d'une plante hôte. Ils colonisent une large gamme de plantes incluant les angiospermes et les gymnospermes ainsi que les ptéridophytes. Tous les types d'endomycorhizes cités ci-dessus sont retrouvés dans les sols pollués par des ETM (Martino *et al.* 2000; Turnau *et al.* 2001; Shefferson *et al.* 2008). Différentes revues recensent les nombreuses expériences réalisées sur ce sujet (Göhre et Paszkowski 2006; Meier *et al.* 2012; Cabral *et al.* 2015; Ingrid *et al.* 2016). Ainsi, suivant les isolats et/ou la taxonomie, Il existe une variabilité dans l'intensité de la réponse de la plante à l'inoculation (He *et al.* 2014). Par exemple, l'inoculation de *Medicago truncatula* par *Funneliformis mosseae* dans un sol multi-contaminé (Cd, Zn, Pb) engendre une stimulation du transfert des ETM vers les parties aériennes (Redon *et al.* 2009), l'inverse est observé chez *Helianthus annuus* colonisé par ce même champignon (Hassan *et al.* 2013). Joner et Leyval (1997) révèlent que la séquestration du Cd dans les hyphes de *F. mosseae* entraîne une augmentation de la tolérance de la plante hôte (*Trifolium subterraneum*). Cette augmentation de tolérance étant associée à une diminution du transfert de Cd vers les parties aériennes.

#### 4.1.2. Les champignons ectomycorhiziens

Les champignons ectomycorhiziens sont des champignons appartenant aux Basidiomycètes et aux Ascomycètes, ils colonisent une large majorité des arbres et des arbustes dont la répartition géographique s'étend des zones boréales et tropicales aux zones tempérées et plus particulièrement sur les sols acides. Leur apparition remonte à l'éocène, soit après celle des mycorhizes à arbuscules (Brundett *et al.* 2004). On estime que 5000 à 6000 espèces de champignons sont capables de former des ectomycorhizes. Cette symbiose est caractérisée par trois structures principales (**Figure I-12- C**) : (i) un réseau d'hyphes extramatriciels en relation avec le sol et les fructifications du champignon, (ii) un manteau de cellules fongiques qui entoure la racine, (iii) un réseau de Hartig constitué d'hyphes qui s'allongent vers le centre de la racine entre les cellules de l'épiderme et les cellules corticales sans jamais pénétrer à l'intérieur de ces cellules (Smith et Read 2008). A l'inverse, des champignons formant des endomycorhizes à arbuscules, les champignons ectomycorhiziens sont cultivables, *in vitro*, sans présence d'hôte végétal. Ces derniers sont fréquemment retrouvés dans les sols pollués par les ETM (Colpaert *et al.* 2011). Grâce à un réseau mycélien conséquent ils augmentent la nutrition hydrique et minérale des plantes

colonisées en puisant les nutriments nécessaires à leur croissance au-delà de la zone exploitée par les racines (Bonfante et Genre 2010). Grâce à la présence d'un réseau d'hyphes très développé, le champignon peut adsorber les ETM et ainsi limiter leur transfert aux plantes (Vogel-Mikuš et Regvar 2013). A titre d'exemple, l'inoculation de peupliers par *Hebeloma crustuliniforme* et *Paxillus involutus* induit une protection pour la plante hôte sous stress Cu ou Pb (Bojarczuk *et al.* 2014). De même, *Pisolithus truncatus* protège les plants d'eucalyptus contre une pollution au Ni en réduisant de soixante fois, par rapport aux plants non-inoculés, le transfert de cet élément des parties racinaires vers les parties aériennes (Jourand *et al.* 2010). D'avantage d'études sont recensées dans les nombreuses revues documentant ce sujet (quelques exemples : Jentschke et Godbold 2000; Colpaert *et al.* 2011; Luo *et al.* 2014)

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 également 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) mécanisme(s) de tolérance mis en place, afin d'obtenir un couple champignon mycorhizien-plante performant en terme de phytostabilisation (Göhre et Paszkowski 2006; Colpaert *et al.* 2011).

#### 4.2. Les endophytes racinaires

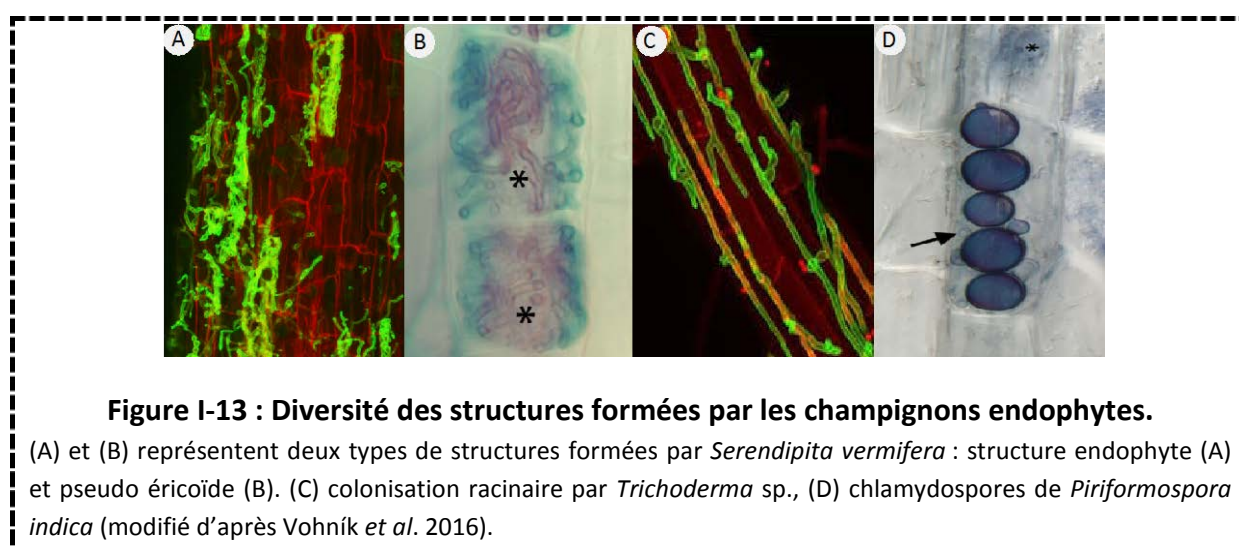
Le terme « endophyte » a été introduit pour la première fois en 1884 par le phytopathologiste Heinrich Anto de Barry pour désigner « *les champignons ou bactéries présents dans les tissus végétaux sans causer de dégâts apparents à la plante hôte* » (Wilson 1995). A l'inverse des champignons mycorhiziens qui colonisent les plantes tout en se développant dans la rhizosphère, les champignons endophytes demeurent intégralement dans les tissus racinaires (**Figure I-13**). Ils n'émergent que pour sporuler ou lors de la sénescence des tissus de la plante hôte (Rodriguez *et al.* 2009). Les endophytes se distinguent en deux groupes majeurs (**Tableau I-6**) par leur évolution, leur taxonomie, leurs plantes hôtes et leurs fonctions écologiques (Rodriguez *et al.* 2009):

- Les endophytes clavicipitacés qui infectent essentiellement les graminées
- Les endophytes non clavicipitacés qui sont retrouvés dans les tissus des plantes non vasculaires, des fougères, des angiospermes et des conifères.

**Tableau I-6 : Les différentes classes d'endophytes (d'après Rodriguez *et al.* 2009)**

| Critères                      | Clavicipitacés         | Non Clavicipitacés              |                 |             |
|-------------------------------|------------------------|---------------------------------|-----------------|-------------|
|                               | Classe 1               | Classe 2                        | Classe 3        | Classe 4    |
| Spectre d'hôtes               | Restreint              | Large                           | Large           | Large       |
| Tissus colonisés              | Racine et rhizome      | Parties aériennes et racinaires | Partie aérienne | Racine      |
| Colonisation <i>in planta</i> | Étendue                | Étendue                         | Faible          | Étendue     |
| Biodiversité <i>in planta</i> | Faible                 | Faible                          | Élevé           | <i>n.d.</i> |
| Transmission                  | Vertical et horizontal | Vertical et horizontal          | Horizontal      | Horizontal  |

Les endophytes racinaires se distinguent des champignons mycorhiziens par leur morphologie, leur développement et par leurs effets sur les transferts de nutriments (Brundrett 2004). Ce groupe comprend différents types d'organismes dont les trois plus connus sont les DSE, les *Sebacinales* et les *Trichoderma* (Chadha *et al.* 2014).



#### Les Sebacinales

Les *Sebacinales* (basidiomycètes) sont capables de former différentes interactions avec les plantes : des structures de types endophytiques ou ectomycorhiziennes dans les racines des arbres (Selosse *et al.* 2009; Lacercat-Didier *et al.* 2016), des ectendomycorhizes dans les racines des plantes de la famille des Ericacées (Selosse *et al.* 2007; Vohník *et al.* 2016) ou des structures endomycorhiziennes dans les racines des Orchidées et des Renonculacées (Kottke *et al.* 2003; Oberwinkler *et al.* 2013). *Sebacina vermifera* et *Piriformospora indica* sont les membres les plus étudiés de cet ordre (Selosse *et al.* 2009;

Gill *et al.* 2016) (**Figure I-13 A, B et D**). Ces deux souches sont capables de former des associations avec un très grand nombre de plantes. De plus, elles peuvent présenter des rôles notables dans la promotion de croissance, en améliorant la protection contre les stress biotiques (*e.g.* pathogènes) et abiotiques (*e.g.* ETM, NaCl, hydrique) (Dolatabadi *et al.* 2011; Gill *et al.* 2016). *P. indica* présente une croissance rapide permettant la synthèse de grande quantité d'inoculum, elle présente, ainsi, tous les atouts nécessaires à des utilisations en horticulture ou en agriculture (Franken 2012; Ansari *et al.* 2013).

De plus, le séquençage du génome de *P. indica* en 2011 (Zuccaro *et al.* 2011) a facilité la compréhension de nombreux mécanismes spécifiques à ces champignons endophytes. Des études protéomiques ont ainsi permis la compréhension du rôle de l'inoculation de *P. indica* contre le stress hydrique et NaCl chez l'orge (Alikhani *et al.* 2013; Ghabooli *et al.* 2013). D'autre part, l'utilisation de puces à ADN a permis de mettre en évidence un mode de vie pouvant varier de la biotrophie à la saprotrophie (Zuccaro *et al.* 2011).

#### Les Trichoderma

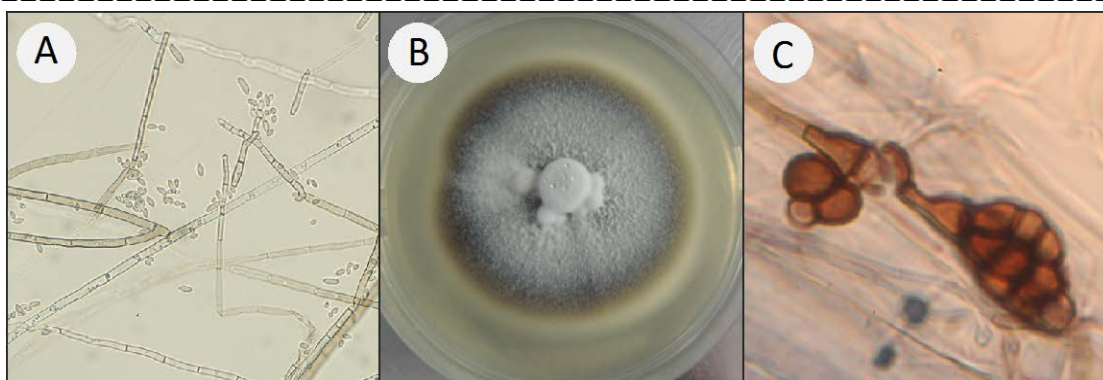
Les *Trichoderma* appartiennent à l'ordre des *Hypocréales* et au phylum des Ascomycètes (**Figure I-13 C**). Ce sont des champignons endophytes à croissance rapide et qui colonisent les plantes en formant des structures comparables à des appressoria (Harman *et al.* 2004). Ces champignons présentent des activités antagonistes vis-à-vis des pathogènes microbiens (Busby *et al.* 2016). Ils facilitent également l'accès aux nutriments et ont un rôle dans la tolérance à divers stress abiotiques dont la pollution métallique. A titre d'exemple, la souche *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 stimule la croissance des saules (*Salix fragilis*), du pin (*Pinus sylvestris*) et du maïs (*Zea mays*) dans des sols contaminés par du Ni, du Cd, du Zn et du Pb (Adams *et al.* 2007; Babu *et al.* 2014).

#### Les endophytes bruns septés (DSE)

Read et Haselwandter (1981) ont introduit le terme « *Dark Septate (DS) hyphae* » pour caractériser les champignons bruns, stériles formant des hyphes septés et des microscélérotés dans les plantes (**Figure I-14**). Cette dénomination a ensuite été complétée par le terme endophyte et en précisant la définition : « champignon formant des hyphes septés partiellement ou complètement mélanisés et colonisant les racines des plantes vivantes et saines » (Stoyke et Currah 1991). Ces champignons ont été découverts il y a une trentaine d'années mais les connaissances acquises restent infimes en comparaison aux autres types de champignons cités précédemment. Ces lacunes sont notamment expliquées par l'absence ou l'insuffisance de traits taxonomiques communs entre les souches de DSE (Wang et Wilcox 1985).

D'un point de vue phylogénique, les DSE appartiennent au phylum des Ascomycètes, et sont répartis dans différents ordres dont les *Helotiales*, les *Xylariales*, les *Pleosporales*, les *Sordariales*, les *Hypocreales* et les *Chaetosphaeriales* (Grünig *et al.* 2011). Les espèces les

plus étudiées à l'heure actuelle appartiennent aux genres *Cadophora*, *Exophiala*, *Leptodontidium* et *Phialocephala* (Jumpponen et Trappe 1998a; Grünig *et al.* 2011).



**Figure I-14 : Caractéristiques morphologiques des DSE.**

(A) hyphes septés de *Cladosporium cladosporioides*, (B) mycélium brun de *Cadophora* sp. et (C) microscélérotés de *Cadophora* sp. dans une racine de bouleau.

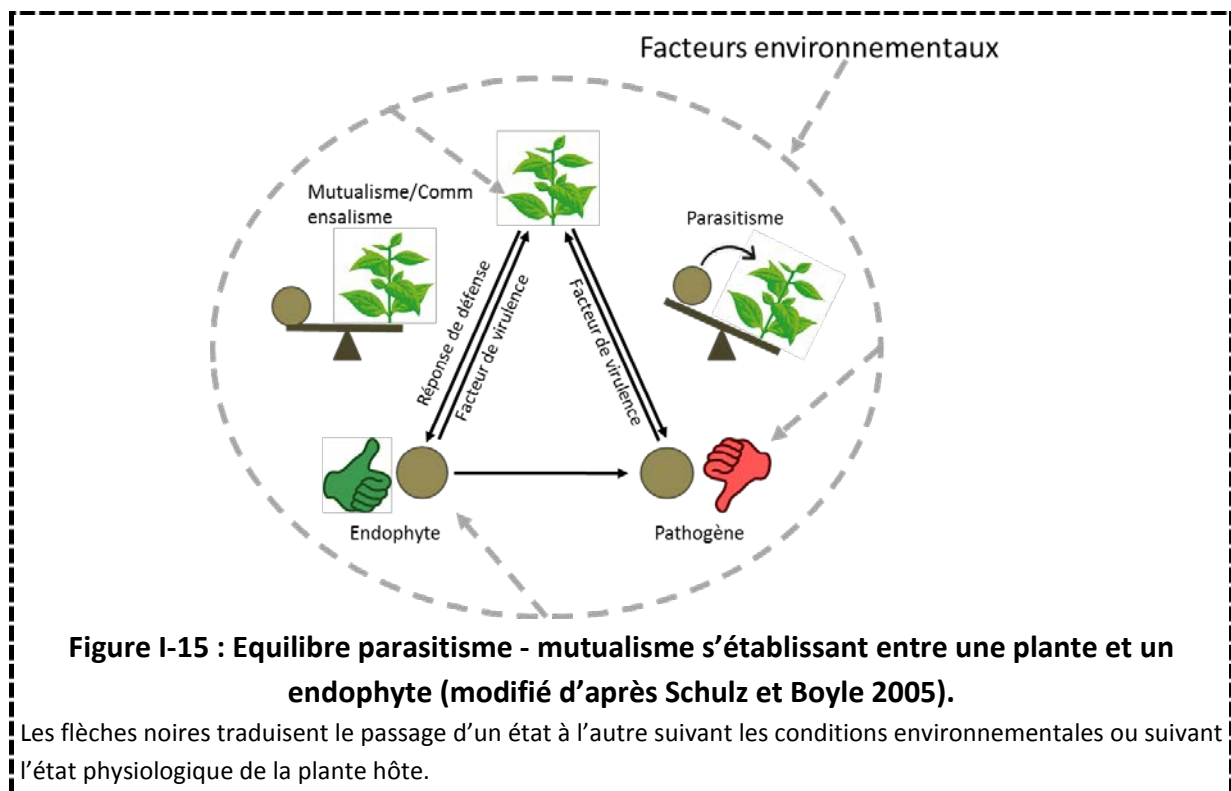
Les DSE ont été observés dans les racines de plus de 600 plantes différentes, répartie au sein de 320 genres et 114 familles (Jumpponen et Trappe 1998a). Ces champignons ne semblent pas avoir de spécificité d'hôte et ont été isolés de plantes ligneuses et herbacées, ainsi que de plantes « non-mycorhiziennes » (Mandyam and Jumpponen 2005). D'autre part, de très nombreuses études ont observé la présence simultanée de DSE et de champignons endo/ecto-mycorhiziens et endophytes dans une même plante (John, Lundholm and Kernaghan 2014; Kauppinen *et al.* 2014; Massenssini *et al.* 2014).

Les DSE ont une répartition géographique étendue à l'ensemble du globe, des écosystèmes tropicaux, aux écosystèmes polaires et arides mais aussi dans les zones humides et aquatiques (Mandyam and Jumpponen 2005; Torta *et al.* 2015; Vohník, Borovec and Kolařík 2015). Plus particulièrement, les DSE semblent être abondants dans les zones polluées aux ETM (Vrålstad, Myrhe and Schumasher 2002; Regvar *et al.* 2010; Xu *et al.* 2015).

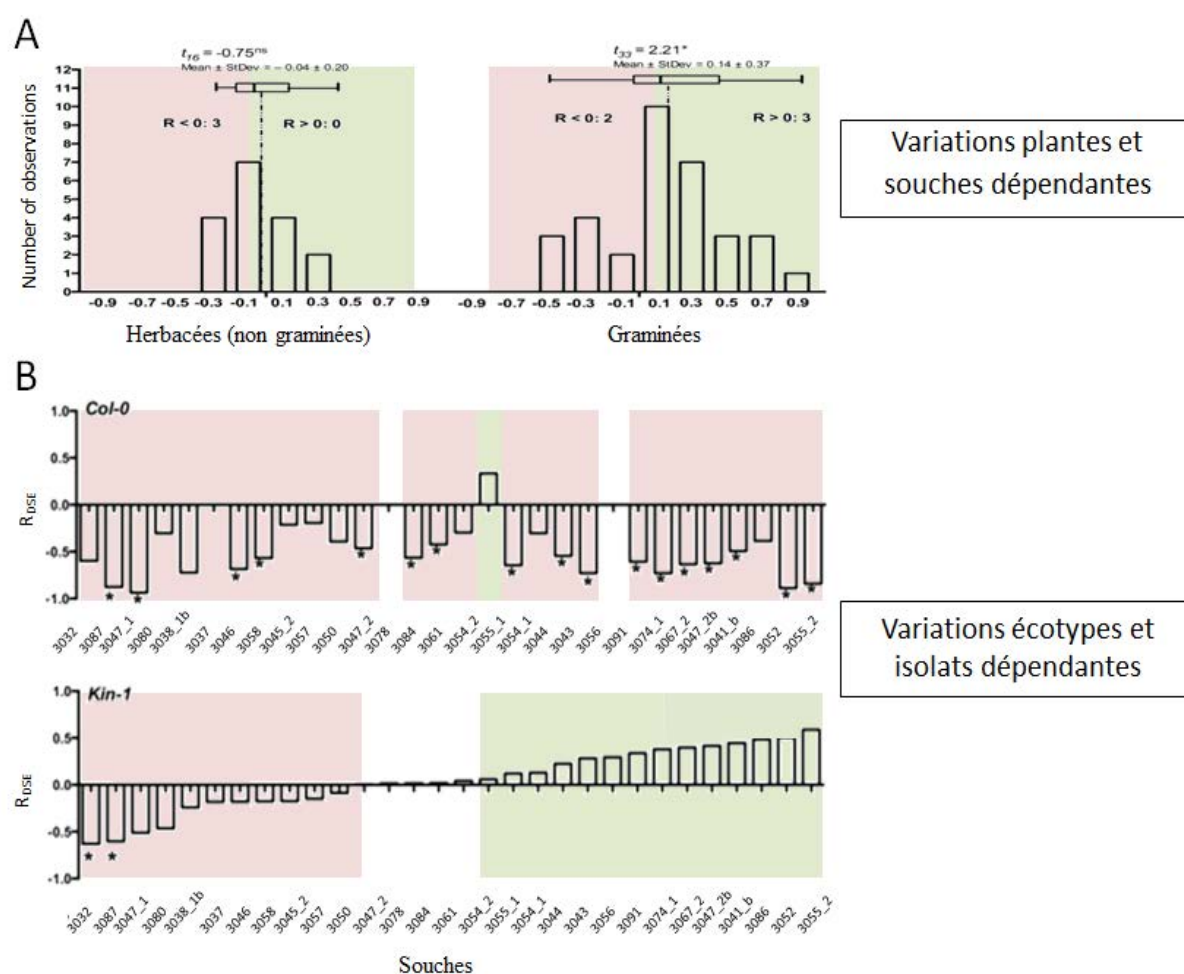
## **5. Rôle des DSE dans les sols, en particulier les sols pollués aux ETM**

### **5.1. Le paradigme mutualisme-parasitisme des DSE**

La colonisation d'une plante par un endophyte est la réaction d'un équilibre antagoniste (Schulz and Boyle 2005). Comme mentionné précédemment, les DSE sont des organismes qui vivent à l'intérieur des plantes et qui ne montrent pas de symptômes de maladie. Cependant les voies de colonisation utilisées par les endophytes sont similaires à celles utilisées par les pathogènes (Schulz and Boyle 2005; Kogel, Franken and Hückelhoven 2006). Ils peuvent coloniser les plantes de manière opportuniste via une blessure, mais peuvent également pénétrer dans la plante au moyen d'exo-enzymes de dégradation, ainsi que par la production de métabolites phytotoxiques (Caldwell *et al.* 2000; Schulz et Boyle 2005).



L'équilibre s'établissant entre la plante et le champignon est le résultat d'un ajustement entre les réactions de virulence de l'endophyte nécessaires pour la colonisation de la plante, et la réaction de défense de la plante en réponse à la virulence de l'endophyte (**Figure I-15**) (Schulz et Boyle 2005; Porras-Alfaro et Bayman 2011). Dès lors qu'un déséquilibre est introduit, (i) soit la virulence devient plus forte que les mécanismes de défense et le champignon devient pathogène, (ii) soit les défenses de la plante sont plus fortes que la virulence et le champignon endophyte est rejeté.



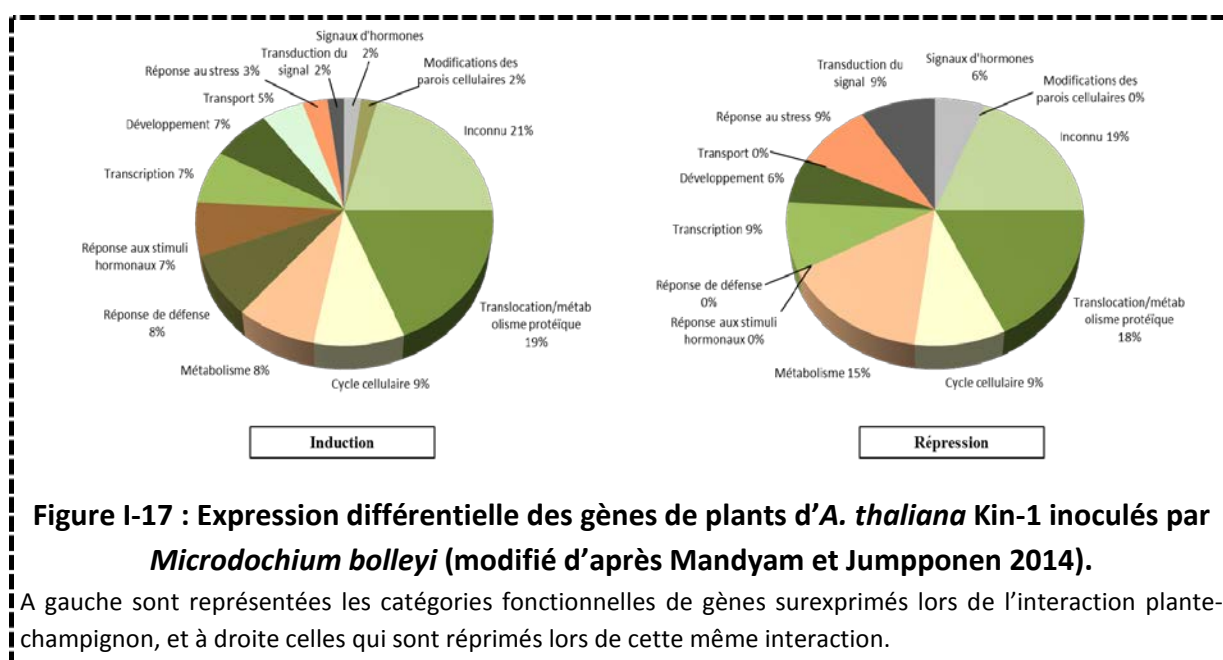
**Figure I-16 : Effet plante-, espèce- et souche- dépendant chez les DSE (modifié d'après Mandyam *et al.* 2013; Mandyam et Jumpponen 2015).**

(A) Croissance de plantes herbacées non-graminées et de graminées inoculées par *Microdochium bolleyi* ou *Periconia macrospinoso*. (B) Croissance de deux écotypes d'*Arabidopsis thaliana* (Col-0 et Kin-1) inoculés par 30 isolats de *Microdochium bolleyi*. Les encadrés rouges indiquent un effet négatif tandis que les encadrés verts dénotent un bénéfice de l'inoculation.

L'effet des DSE sur la croissance des plantes est un sujet très controversé qui a fait l'objet de différentes méta-analyses et revues ces dernières années (Addy *et al.* 2005; Newsham 2011; Mayerhofer *et al.* 2013; Mandyam et Jumpponen 2014; Mandyam et Jumpponen 2015). Il semble s'établir entre la plante et le champignon des réactions variables, allant du parasitisme au mutualisme, en fonction des plantes et des souches de DSE. Une expérience menée sur douze plantes (graminées et non graminées) avec quatre DSE (trois souches de *Periconia macrospinoso* et une souche de *Microdochium bolleyi*) confirme ce large spectre d'hôtes et de réponses (**Figure I-16 A**) (Mandyam *et al.* 2012).

Mandyam *et al.* (2013) ont mené une étude sur trente isolats de *M. Bolleyi* et trois écotypes d'*A. thaliana*. Il en ressort que suivant l'écotype de la plante et l'isolat du champignon, on observe des réactions post-inoculation très différentes (**Figure I-16-B**).

D'autre part, les études portant sur les mécanismes moléculaires, chimiques et physiologiques mis en place lors de la promotion de croissance ou lors de la colonisation de la plante par les DSE sont encore très rares. Cependant, des analyses récentes de transcriptomique ont permis de mettre en évidence les gènes sous- et sur-exprimés chez *A. thaliana* en présence ou non du DSE *M. bolleyi* (Mandyam et Jumpponen 2014). La présence du champignon diminue l'expression des gènes impliqués dans la réponse aux stress, de ceux nécessaires à la nutrition et à l'entretien du métabolisme basal. A l'inverse, les gènes codant des protéines de transport de nutriments et ceux liés aux mécanismes de défense de la plante sont plus induits. Ces observations laissent penser que les DSE pourraient favoriser une meilleure nutrition de la plante hôte et induire une protection accrue contre les stress biotiques et abiotiques (Mandyam et Jumpponen 2014). Ces deux points sont développés dans les paragraphes ci-après.



## 5.2. Effet des DSE sur la nutrition minérale des plantes

Les DSE possèdent un panel enzymatique leur permettant de dégrader/utiliser de nombreuses sources de carbone, d'azote et d'autres minéraux essentiels. Des cellulases, laccases, amylases, tyrosinases et gélatinases ont été observées chez *P. macrospinosa*, *Microdochium* sp., *Phialocephala fortinii* et *Cadophora finlandica* (Caldwell *et al.* 2000; Mandyam *et al.* 2010). Chez ces deux dernières espèces, les capacités à dégrader les xyloses, certaines protéines et certains acides gras ont également été relevées. La présence de ces enzymes permet à ces champignons de solubiliser la matière organique et les composés

complexes afin de les rendre plus disponibles pour la plante. Les DSE faciliteraient l'accès à la ressource azotée uniquement lorsqu'elle est apportée sous une forme organique (*e.g.* leucine, phénylalanine, valine, glycine) (Usuki et Narisawa 2007; Upson, Read et Newsham 2009; Mahmoud et Narisawa 2013). Dans une méta-analyse, Newsham (2011) a rapporté que la stimulation de croissance induite par les DSE est liée à la proportion des nutriments présents sous forme organique dans le milieu. Cependant certaines espèces telles que *Cadophora* sp. peuvent également stimuler la croissance des plantes en présence d'azote inorganique, comme par exemple avec le melon (*Cucumis melo*) (Khastini *et al.* 2014). Cependant, comme pour la stimulation de croissance, cet effet sur la nutrition est souche et plante-dépendante (Vohník *et al.* 2005).

A l'image des champignons endomycorhiziens, les DSE permettraient également une amélioration de la nutrition phosphatée (Jumpponen, Trappe and Mattson 1998; Newsham 1999). Cette stimulation est expliquée, d'une part par la présence de phosphatases alcaline et acide chez les DSE (Della Monica *et al.* 2015; Knapp et Kovács 2016) et d'autre part par la capacité de ces derniers à solubiliser les formes minérales et complexées du phosphore dans le sol (Caldwell *et al.* 2000; Barrow et Osuna 2002).

En échange de cet apport azoté et phosphaté, il semblerait que la plante puisse fournir du carbone au DSE, tout comme cela a été précédemment montré pour les symbioses mycorhiziennes (Usuki et Narisawa 2007). Néanmoins seule une étude a été réalisée à ce sujet et les résultats demandent à être confirmés.

### 5.3 Protection contre les stress biotiques

Différentes études ont montré que l'inoculation d'une plante par un DSE peut réduire les effets négatifs de souches fongiques pathogènes (**Figure I-18**) (Andrade-Linares *et al.* 2011; Su *et al.* 2013; Khastini *et al.* 2014). On parle alors d'effet « biocontrôle ». Chez le melon, l'inoculation de *Cadophora* sp. permet une diminution de 48 à 62% des symptômes causés par *Fusarium* sp. et une amélioration significative de la qualité du fruit (Khastini *et al.* 2014). Plus particulièrement, la présence du DSE peut engendrer une diminution de la croissance de la souche pathogène (**Figure I-18 A, B et C**), provoquer une altération de la morphologie des hyphes du champignon pathogène (**Figure I-18 D et E**) ou de façon extrême empêcher la colonisation de la plante par le pathogène.

Mandyam et Jumpponen (2005) suggèrent que les DSE pourraient majeurs pour inhiber les souches phytopathogènes via trois mécanismes majeurs :

- La compétition pour les **sites d'infections** et/ou pour les **ressources nutritives** : Khastini *et al.* (2014) suggèrent que la formation par *Cadophora* sp. d'un manteau fongique autour de la racine de *Cucumis melo* constituerait une barrière physique qui empêcherait la colonisation du phytopathogène *Fusarium*

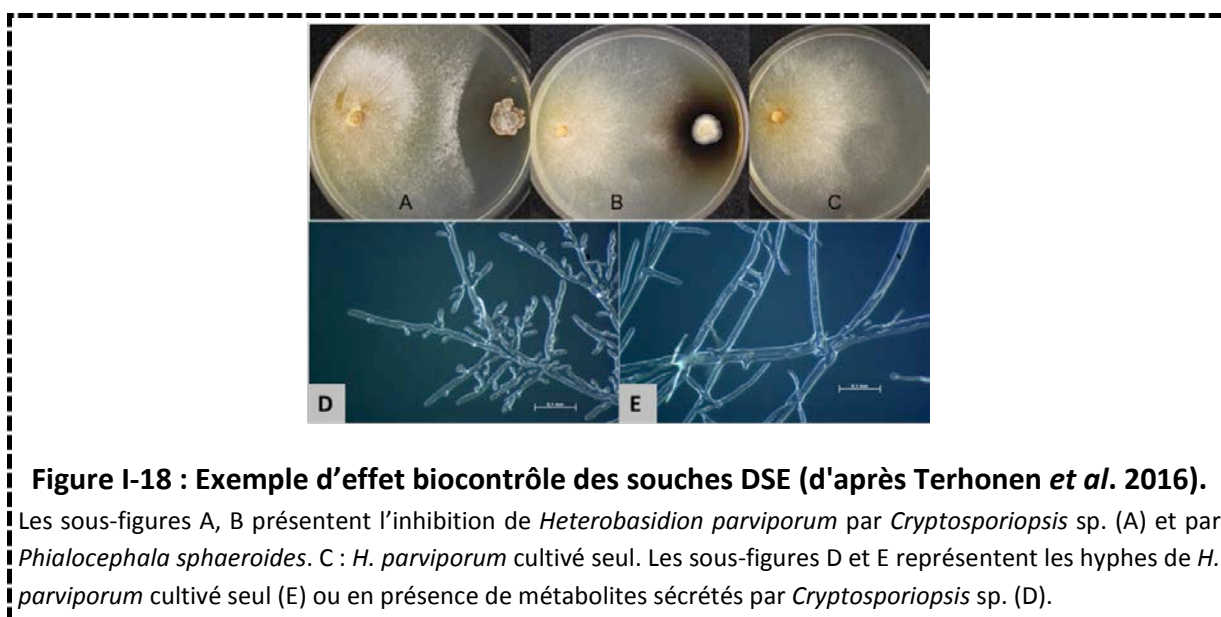
sp. De même, la pénétration de *Harpophora oryzae* dans les cellules apicales racinaires du riz (*Oryza sativa*) protège la plante contre l'invasion par *Magnaporthe oryzae* (Su *et al.* 2013). D'autre part, la synthèse de sidérophores par *P. fortinii* pourrait être une stratégie d'inhibition par l'acquisition des ressources nutritives nécessaires à la croissance de la souche pathogène (Bartholdy *et al.* 2001).

- La synthèse de **métabolites secondaires** avec un effet anti-phytopathogène :  
En présence de souches pathogènes, les DSE ont la capacité de synthétiser des métabolites secondaires antipathogènes, permettant une action sans contact physique comme illustré par la **Figure I-18 A**. Sur celle-ci, on observe l'inhibition de *H. parviporum* (C) par *Cryptosporiosis* sp. (A) et par *P. sphaeroides* (B). Ces molécules ont été identifiées comme étant des échinocandines, de la sclérine, de la dichlorodiaportine et de la cryptosporiopsine (Tellenbach *et al.* 2013; Terhonen *et al.* 2016).

- L'induction de systèmes de **défense** préalable à la colonisation par les pathogènes :

La colonisation des plantes par les DSE peut induire la mise en place de la résistance systémique induite (SIR) qui joue un rôle important dans la protection des plantes contre les pathogènes. Su *et al.* (2013) ont mis en évidence que la colonisation du riz par *H. oryzae* engendre une augmentation de l'activité des enzymes superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxydase (POD), et de la glutathion réductase (GR), ce qui permettait de protéger la plante contre l'invasion par *M. oryzae*. D'autre part il a été montré que la présence d'un DSE engendre une augmentation de l'épaisseur des parois cellulaires nécessaire à la protection contre les champignons pathogènes (Su *et al.* 2013; Khastini *et al.* 2014; Mandyam et Jumpponen 2014).

La présence du DSE auprès de la plante permet également une amélioration de la nutrition minérale et hydrique, ce qui lui permet un meilleur fitness pour la tolérance contre les pathogènes.



**Figure I-18 : Exemple d'effet biocontrôle des souches DSE (d'après Terhonen *et al.* 2016).**

Les sous-figures A, B présentent l'inhibition de *Heterobasidion parviporum* par *Cryptosporiopsis* sp. (A) et par *Phialocephala sphaeroides*. C : *H. parviporum* cultivé seul. Les sous-figures D et E représentent les hyphes de *H. parviporum* cultivé seul (E) ou en présence de métabolites sécrétés par *Cryptosporiopsis* sp. (D).

Il a également été suggéré par certains auteurs que les DSE pourraient avoir une action protectrice contre les attaques d'herbivores (Mandyam et Jumpponen 2005), cependant aucune étude, à ce jour, n'a été effectuée pour confirmer cette hypothèse chez les DSE. Néanmoins certains champignons endophytes racinaires tel que *Beauveria bassiana* et *Trichoderma* sp. ont prouvé leurs capacités à protéger leurs plantes hôtes contre des attaques de pucerons (*Aphis gossypii*) ou de criquets (*Chortoicetes terminifera*). Les mécanismes impliqués seraient la synthèse de métabolites secondaires toxiques ou inhibiteurs et le parasitisme de l'herbivore concerné (Porrás-Alfaro et Bayman 2011).

### 5.1. Protection des plantes contre les stress abiotiques

Les DSE sont abondants au niveau des racines des plantes se développant dans des sols contaminés aux métaux (Čevnik *et al.* 2000; Vrålstad, Myrhe and Schumacher 2002; Ruotsalainen *et al.* 2007; Likar et Regvar 2009; Regvar *et al.* 2010). En général, les auteurs ont étudié l'effet de quelques espèces fongiques (*Leptodontidium* sp., *Cadophora* sp. et *E. pisciphila*) sur la sensibilité aux ETM de quelques espèces végétales (e.g. saule et maïs - De Maria *et al.* 2011; Ban *et al.* 2012; Likar et Regvar 2013) (**Tableau I-8**). L'effet général observé des DSE semble être une augmentation de la tolérance des plantes aux ETM et accroissement de la biomasse végétale. Dans certains cas, une diminution de la concentration en ETM des parties aériennes peut être notée (Li *et al.* 2011; Likar et Regvar 2013; Wang *et al.* 2016).

D'autre part, les DSE peuvent permettre un meilleur fonctionnement du métabolisme de l'hôte. Likar et Regvar (2013) ont observé une augmentation de la teneur en chlorophylles et des capacités de transpiration de plants de saules en présence de *Leohumicola* sp.. Enfin, la stimulation de la biomasse des plantes peut aussi être liée à une augmentation de la nutrition minérale. En outre, l'inoculation de *S. caprea* par *C. finlandica*

permet une augmentation de l'assimilation du phosphore par la plante (De Maria *et al.* 2011).

À ce jour, une seule étude est en mesure d'expliquer la diminution de la toxicité des ETM pour la plante par les DSE. Wang *et al.* (2016) ont inoculé des plantules de maïs par *E. pisciphila*, et ont montré une tendance à la diminution de l'expression des transporteurs ZIP (Zrt-Irt like protein), une augmentation des transporteurs MTP (Metal Transport Protein) et une induction de l'expression des gènes impliqués dans la séquestration vacuolaire des polluants. La présence du champignon pourrait ainsi conduire à une modification de la spéciation du Cd dans les cellules racinaires, avec une diminution de la fraction soluble au profit d'une augmentation de la fraction liée à l'oxalate. De ce fait la fraction de Cd toxique serait diminuée, tout comme sa toxicité. Enfin, ces auteurs rapportent que la colonisation par le DSE induisait une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes (*e.g.* SOD, POD, CAT) et de certaines molécules complexantes (*e.g.* glutathion) ce qui permettrait la diminution du stress oxydant généré par une exposition à de fortes concentrations d'ETM.

Le rôle des DSE dans la tolérance des plantes au stress hydrique et au stress NaCl a également été suggéré, cependant très peu d'études ont été menées pour confirmer ces hypothèses (Mandyam et Jumpponen 2005; Bois *et al.* 2006). Bois *et al.* 2006 ont observé une grande capacité, *in vitro*, de *Phialocephala* sp. à tolérer le NaCl. Cette aptitude serait due à la mélanine dans les hyphes du champignon.

**Tableau I-7 : Études récentes sur l'effet des champignons DSE sur la croissance de souches fongiques phytopathogènes**

| Souches pathogènes               | DSE étudiés                       | Plante hôtes                | Type d'étude   | Effets                                                                                                                                                       | Références                           |
|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Heterobasidion parviporum</i> | <i>Phialocephala fortinii</i>     | -                           | In vitro       | 19 isolats qui diminuent la croissance de <i>H. parviporum</i>                                                                                               | (Terhonen <i>et al.</i> 2014)        |
| <i>Heterobasidion parviporum</i> | <i>Cryptosporiopsis</i> sp.       | <i>Picea abies</i>          | In vitro, pots | Diminution de la croissance des souches pathogènes <i>in vitro</i> .                                                                                         | (Terhonen <i>et al.</i> 2016)        |
| <i>Phytophthora pini</i>         | <i>Phialocephala sphareoides</i>  |                             |                | Diminution de la croissance de la plante <i>in situ</i> ( <i>Cryptosporiopsis</i> sp.) mais pas d'effet sur les souches pathogènes ( <i>P. sphareoides</i> ) |                                      |
| <i>Botrytis cinerea</i>          |                                   |                             |                |                                                                                                                                                              |                                      |
| <i>Verticillium dahliae</i>      | <i>Leptodontidium orchidicola</i> | <i>Solanum lycopersicum</i> | pots           | Diminution de l'effet négatif de <i>V. dahliae</i> sur la croissance de la plante                                                                            | (Andrade-Linares <i>et al.</i> 2011) |
| <i>Magnaporthe oryzae</i>        | <i>Harpophora oryzae</i>          | <i>Oryza sativa</i>         | pots           | Diminution de l'effet négatif de <i>M. oryzae</i> sur la croissance de la plante                                                                             | (Su <i>et al.</i> 2013)              |
| <i>Phytophthora citricola</i>    | <i>Phialocephala fortinii</i>     | -                           | In vitro       | Synthèse de métabolites secondaires à effet antipathogène                                                                                                    | (Tellenbach <i>et al.</i> 2013)      |
|                                  | <i>Phialocephala subalpina</i>    |                             |                | Diminution de la croissance de <i>P. citricola</i>                                                                                                           |                                      |
| <i>Fusarium oxysporum</i>        | <i>Cadophora</i> sp.              | <i>Cucumis melo</i>         | pots           | Diminution de l'effet négatif de <i>F. oxysporum</i> sur la croissance de la plante                                                                          | (Khastini <i>et al.</i> 2014)        |
| <i>Phytophthora citricola</i>    | <i>Phialocephala subalpina</i>    | <i>Picea abies</i>          | pots           | Effet souche dépendant, avec certaines souches qui diminuent l'effet négatif des souches pathogènes                                                          | (Tellenbach et Sieber 2012)          |
| <i>Pythium undulatum</i>         |                                   |                             |                |                                                                                                                                                              |                                      |
| <i>Verticillium dahliae</i>      | <i>Heteroconium chaetospira</i>   | <i>Solanum melongena</i>    | pots           | Effet souche dépendant, avec certaines souches qui diminuent l'effet négatif de <i>V. dahliae</i>                                                            | (Narisawa <i>et al.</i> 2002)        |
|                                  | <i>Phialocephala fortinii</i>     |                             |                |                                                                                                                                                              |                                      |
| <i>Plasodiophora brassicaea</i>  | <i>Heteroconium chaetospira</i>   | <i>Brassica campestris</i>  | pots           | Diminution de l'effet négatif des deux pathogènes sur la croissance de la plante                                                                             | (Narisawa <i>et al.</i> 2000)        |
| <i>Verticillium</i> sp.          |                                   |                             |                |                                                                                                                                                              |                                      |

*In vitro* : conditions axéniques en l'absence de plantes; pots : tests en pots. La couleur rouge traduit l'absence d'effet et/ou la stimulation de la croissance des souches pathogènes tandis que la couleur verte souligne les effets biocontrôle des souches étudiées.

**Tableau I-8. Etudes de l'effet d'une inoculation par des champignons DSE sur la tolérance des plantes aux ETM**

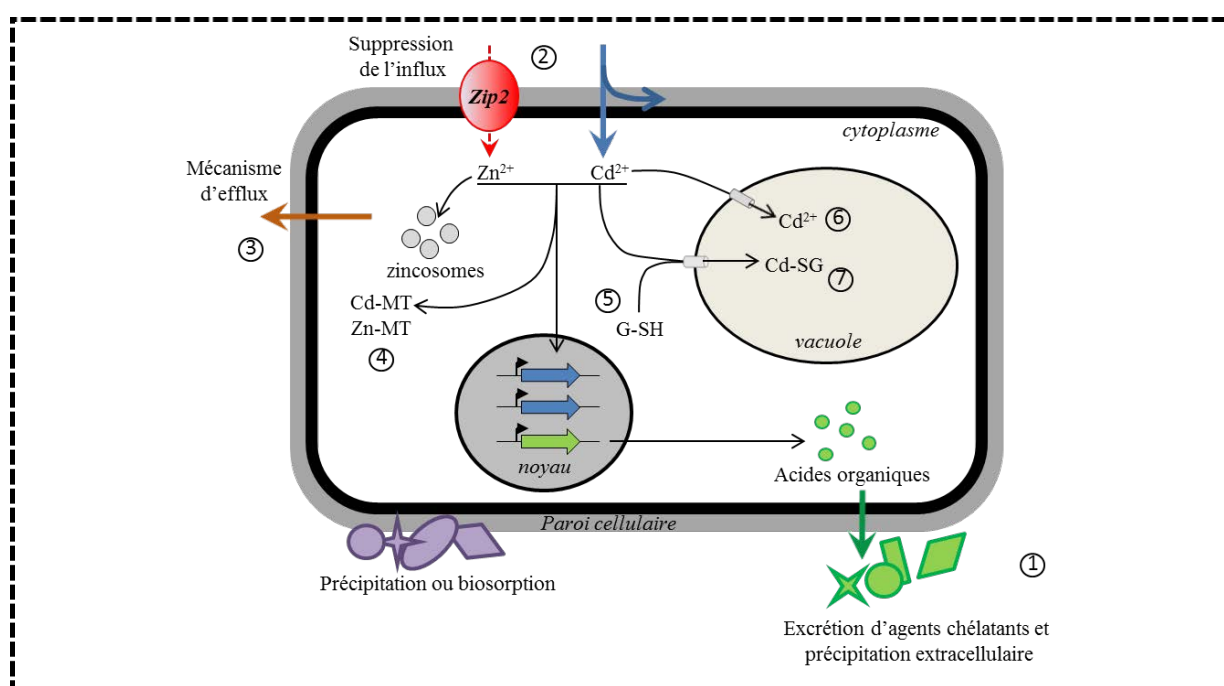
| ETM testés | DSE étudiés                                         | Plantes hôtes                                 | Types d'étude | Effets de l'inoculation du DSE sur la plante                                                                                                             | Références                    |
|------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Cd, Pb, Zn | <i>Leohumicola sp.</i><br><i>Leptodontidium sp.</i> | <i>Salix caprea</i>                           | Pots, SP      | Diminution du transfert de Cd et Zn vers les parties aériennes, augmente la teneur en chlorophylles, de la transpiration et de la production de biomasse | (Likar et Regvar 2013)        |
| Cd, Pb, Zn | <i>Exophiala pisciphila</i>                         | <i>Zea mays</i>                               | Pots, CA      | Diminution du transfert de Cd, Pb et Zn vers les parties aériennes et augmentation de la production de biomasse                                          | (Li <i>et al.</i> 2011)       |
| Cd, Pb, Zn | <i>Cadophora finlandica</i>                         | <i>Salix caprea</i><br><i>Salix smithiana</i> | Pots, SP      | Diminution de la biomasse racinaire et aérienne. Absence d'effet sur le transfert des ETM                                                                | (Utmazian <i>et al.</i> 2007) |
| Cd, Zn     | <i>Cadophora finlandica</i>                         | <i>Salix caprea</i>                           | Pots, SP      | Augmentation de la concentration en Cd dans les racines, et de la concentration en P dans les parties aériennes                                          | (De Maria <i>et al.</i> 2011) |
| Cd         | <i>Exophiala pisciphila</i>                         | <i>Zea mays</i>                               | Pots, CA      | Augmentation de la croissance et des activités d'enzymes anti-oxydantes, inactivation des formes solubles du Cd dans les cellules.                       | (Wang <i>et al.</i> 2016)     |

Pots : tests en pots ; CA : contamination artificielle en ETM ; SP : substrat issu de site pollué ; En vert sont représentées les capacités intéressantes pour une utilisation en phytomanagement tandis qu'en rouge sont notés les aspects non favorables pour le phytomanagement.

## 6. Les mécanismes de tolérance aux ETM chez les DSE

Les DSE sont abondants dans les racines des plantes se développant dans des environnements pollués par les ETM. Cependant même si la tolérance des DSE aux ETM a été à plusieurs reprises étudiée en conditions *in vitro* (Zhang *et al.* 2008; Ban *et al.* 2012; Likar et Regvar 2013), les mécanismes moléculaires et cellulaires expliquant cette tolérance chez les DSE reste largement méconnus (Zhao *et al.* 2015).

Contrairement aux DSE, plusieurs études ont porté sur l'étude des mécanismes de tolérance chez la levure et chez les champignons mycorhiziens. Bellion *et al.* (2006) et Gube (2016) décrivent au travers de deux revues les différents mécanismes de tolérance mis en place (**Figure I-19**). La tolérance 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 I-19** ①). Les champignons lient les ETM plus ou moins fortement à leur paroi fongique par biosorption aspécifique (**Figure I-19** ②). Il existe également des stratégies faisant intervenir des transporteurs d'ETM spécifiques et non spécifiques ainsi que des canaux permettant à ces ETM de traverser la membrane plasmique et d'entrer dans la cellule fongique. Une fois dans le cytosol, les ETM sont soit complexés par des métallothionéines ou du glutathion par exemple (**Figure I-19** ④,⑤), soit exportés hors de la cellule fongique via des transporteurs spécifiques ou non spécifiques (**Figure I-19** ③). D'autres mécanismes de tolérance tels que la séquestration des ETM dans la vacuole de la cellule sont possibles (**Figure I-19** ⑥,⑦). Plusieurs de ces mécanismes interviennent souvent simultanément et peuvent se cumuler afin d'accroître la tolérance. De plus, certains de ces mécanismes sont constitutifs alors que d'autres, sont activés uniquement en situation de stress (Zhao *et al.* 2015).



**Figure I-19 : Mécanismes de tolérance aux ETM des champignons  
(d'après Bellion *et al.* 2006).**

G-SH : Glutathion et MT : metallothionéines

### **6.1 Mécanismes extracellulaires de protection contre les ETM**

Les mécanismes extracellulaires permettent une protection qui s'opère directement à l'extérieur des cellules fongiques. L'excrétion de molécules chélatantes, ainsi que la précipitation au niveau des parois permettent en effet une diminution de l'import des ETM dans la cellule (**Figure I-19** - Bellion *et al.* 2006; Zhao *et al.* 2015).

#### **6.1.1. Complexation et précipitation extracellulaire**

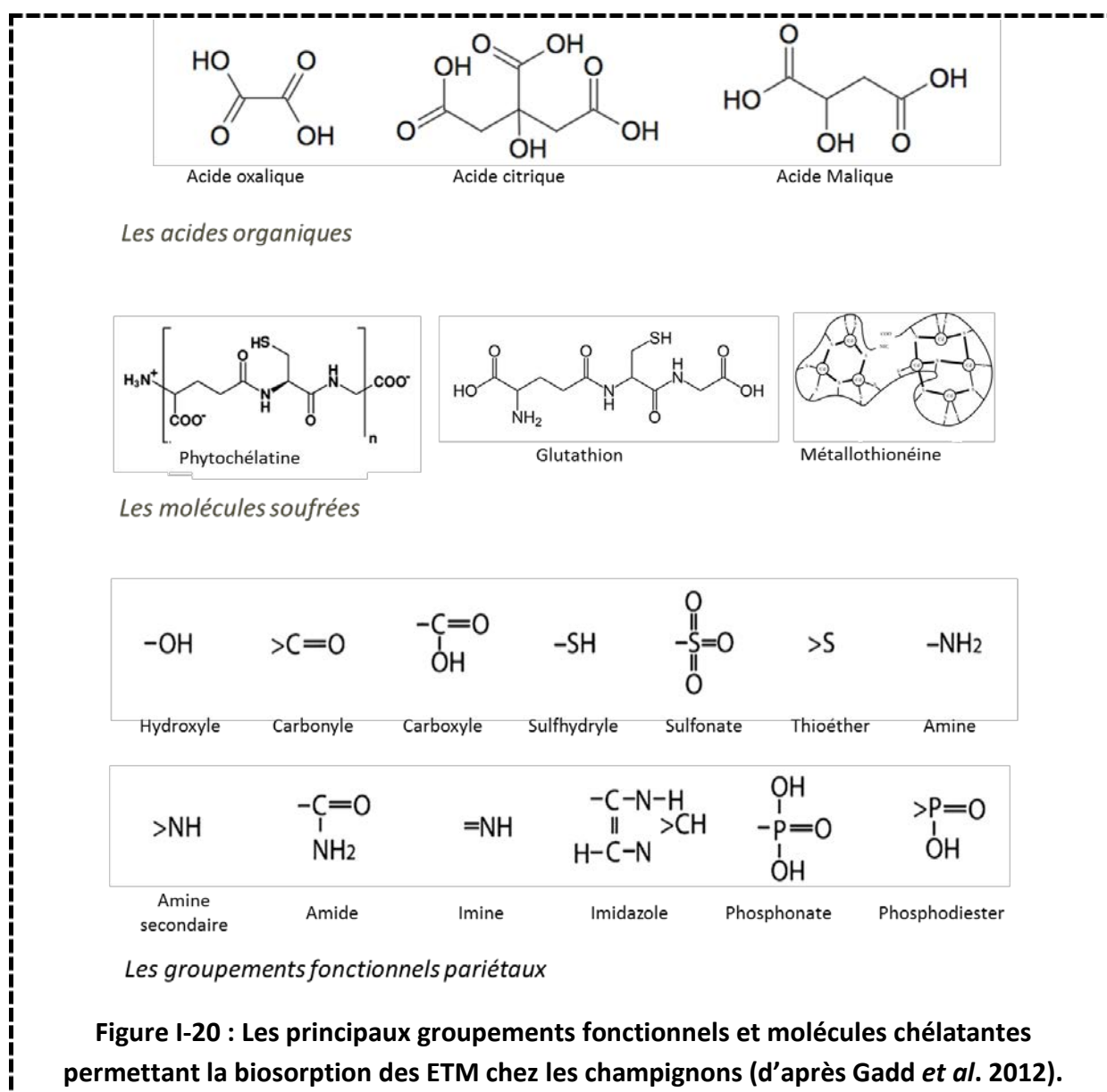
En conditions de stress, les champignons sécrètent des métabolites (*e.g.* acides organiques, glutathion (GSH) (Gadd *et al.* 2012) dans l'espace extracellulaire et peuvent alors se lier aux ETM et former des complexes. Cette forme précipitée limite ainsi leur entrée dans la cellule et donc leur toxicité (**Figure I-19** - Tripathi et Srivastava 2007a).

Parmi ces molécules on peut noter :

- Les acides organiques (**Figure I-20**). Chez *Aspergillus nidulans* la sécrétion d'oxalate en réponse au Ni présent dans l'environnement amène à la formation de complexes extracellulaires Ni-oxalate qui ne peuvent pas entrer dans la cellule (Tripathi et Srivastava 2007a). De la même façon, la sécrétion de citrate et de malate confère une tolérance au Pb chez *Beauveria caledonia* (Fomina *et al.* 2005)
- Le glutathion (GSH) est un tripeptide contenant de la cystéine (**Figure I-20**) et possédant une capacité de liaison des ETM au niveau des groupements -SH. Il a été décrit qu'en présence d'As, il s'établit des complexes As/GSH dans l'espace extracellulaire de *S. cerevisiae*. Ce changement de spéciation forme ainsi une barrière chimique à l'entrée du polluant (Thorsen *et al.* 2012).
- La sécrétion de sidérophores (*e.g.* ferricoprogène, ferricrocine, acide rhodotorulique) peut également empêcher la pénétration des ETM dans la cellule (Gube 2016).

Cependant certains de ces mécanismes (*e.g.* sidérophores, acides organiques) sont également employés pour permettre la récupération d'éléments essentiels (*e.g.* Fe, K, Cu) dans l'environnement et maintenir l'homéostasie cellulaire. La balance entre ces mécanismes doit donc être très précise (Gube 2016).

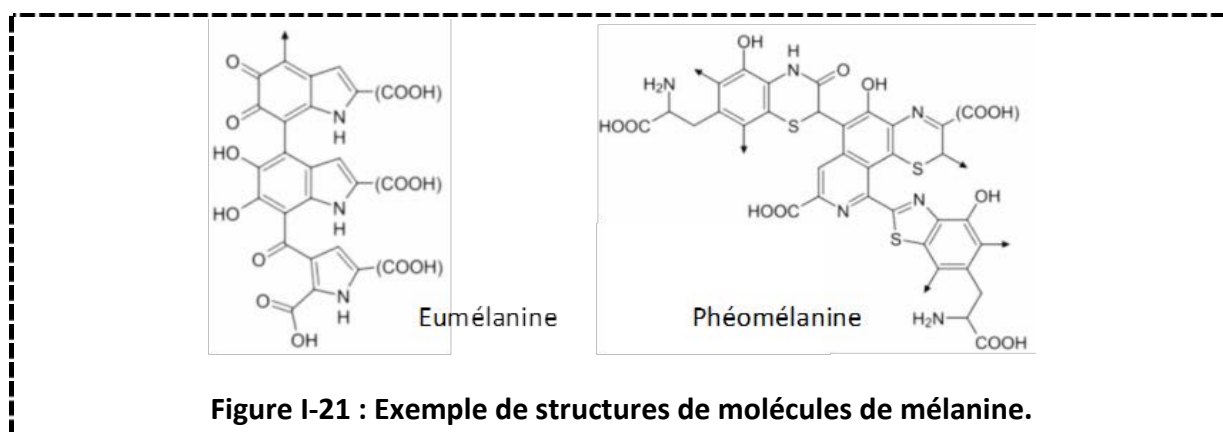
Chez les DSE, l'excrétion de molécules dans l'espace extracellulaire n'a pas encore été mise en évidence. Cependant, Zhao *et al.* (2015) ont observé chez *E. pisciphila*, que la présence de Cd engendre l'expression de 81 gènes nécessaires aux voies de biosynthèses de certains acides organiques et acides aminés, qui peuvent chélater certains ETM.



### 6.1.2. Fixation aux parois cellulaires

Lorsque les ETM ne peuvent pas être immobilisés par chimiotaxie négative, les champignons peuvent être protégés via l'adsorption des ETM au niveau des parois cellulaires. C'est un mécanisme passif qui ne requiert pas d'investissement de nutriments ou d'énergie. La paroi fongique est le premier lieu d'interaction entre les ETM et la cellule fongique. Elle est constituée de glycoprotéines et de glycosaccharides tels que les glucanes, la chitine, le chitosane et les galactosamines et d'une faible proportion de protéines. Ces molécules offrent un ensemble de groupements libres (*e.g.* carboxyle, amino, hydroxyle, mercapto ou phosphate) permettant la fixation des ETM (Strandberg *et al.* 1981) (**Figure I-20**), on parle alors de biosorption.

Chez le DSE *E. pisciphila*, le Cd est adsorbé à hauteur de 81 à 97 % au niveau de la paroi (Zhan *et al.* 2015). Les liaisons utilisées pour la fixation sont en premier lieu des liaisons phosphorées (-P=O) puis, secondairement des liaisons pectiques et/ou protéiques (Zhan *et al.* 2015). L'augmentation de la teneur en ETM dans l'environnement entraîne également des changements de composition et de morphologie des parois cellulaires. En présence de Pb (0,1 mg/ml), les hyphes du DSE *Gaeumannomyces cylindrosporus* présentent une allure renflée et des parois plus épaisses. Cet épaississement est corrélé avec une augmentation de la consommation en carbone. Chez *E. pisciphila*, des variations, croissantes et décroissantes, de l'activité de chitinases ont également été remarquées en présence de Cd (Ban *et al.* 2012; Zhan *et al.* 2015). Elles permettraient le maintien de l'intégrité cellulaire.



Chez les DSE, on retrouve également une proportion non négligeable de mélanine dans les parois (**Figure I-21**). La mélanine possède un grand pouvoir de piégeage des ETM et semble jouer un rôle important dans la tolérance aux ETM (Fogarty et Tobin 1996). L'accumulation de mélanine dans le mycélium et dans les spores des champignons se développant dans des environnements dégradés et/ou pollués a de nombreuses fois été observée (Fogarty et Tobin 1996; Gessler *et al.* 2014). Une augmentation des ETM engendrerait une augmentation de la synthèse de la mélanine chez les microorganismes (Gadd et de Rome 1988; Caesar-Tonthat *et al.* 1995; Zhan *et al.* 2011; Ban *et al.* 2012). Le rôle de la mélanine dans la tolérance aux métaux n'est toutefois pas démontré. Ainsi l'absence de mélanine chez *Streptomyces scabies* (mutants albinos) et *E. pisciphila* (via l'utilisation d'inhibiteur chimique) entraîne une diminution de la tolérance au Cd et au Cu (Beauséjour et Beaulieu 2004; Zhan *et al.* 2016). A l'inverse, des souches albinos de *Gaeumannomyces graminis* et de *Aspergillus nidulans* ne présentent aucune altération de leur niveau de tolérance au Cd, Co, Cu et Ni (Frederick *et al.* 1999; Tripathi et Srivastava 2007a; Tripathi et Srivastava 2007b).

D'autre part, les souches albinos de *Cladosporium resinae* et *Aureobasidium pullulans* accumulent moins les métaux que les souches pigmentées (Gadd et Rome 1988). Cependant une étude récente est en contradiction avec ces premières observations. L'inhibition de la synthèse de mélanine chez *E. pisciphila* par l'utilisation d'un inhibiteur

chimique n'entraîne ni la variation de la localisation subcellulaire des ETM, ni celle de leur accumulation dans le mycélium (Zhan *et al.* 2016).

Il semble donc que, chez les champignons, le rôle de la mélanine dans la tolérance aux ETM et dans leur accumulation reste encore hypothétique et nécessite davantage d'expérimentations.

## 6.2. Réponses intracellulaires et transport des ETM

Malgré les mécanismes de chélation extracellulaire ou de fixation à la paroi, les ETM peuvent tout de même entrer en excès dans les cellules quand le mycélium est exposé à une trop forte concentration en ETM. Deux stratégies sont alors mises en place: (i) la chélation des éléments dans l'espace intracellulaire et (ii) le transport vers l'espace extracellulaire ou vers des organites.

### 6.2.1. Complexation intracellulaire des ETM

L'implication de molécules chélatrices peut représenter une stratégie afin de limiter la toxicité engendrée par les ETM dans le cytosol. Chez *E. pisciphila* de très nombreux gènes liés aux voies de biosynthèse des molécules soufrées sont sur-exprimés en présence de Cd (Zhao *et al.* 2015). Un bref aperçu de ces composés est livré dans les alinéas suivants.

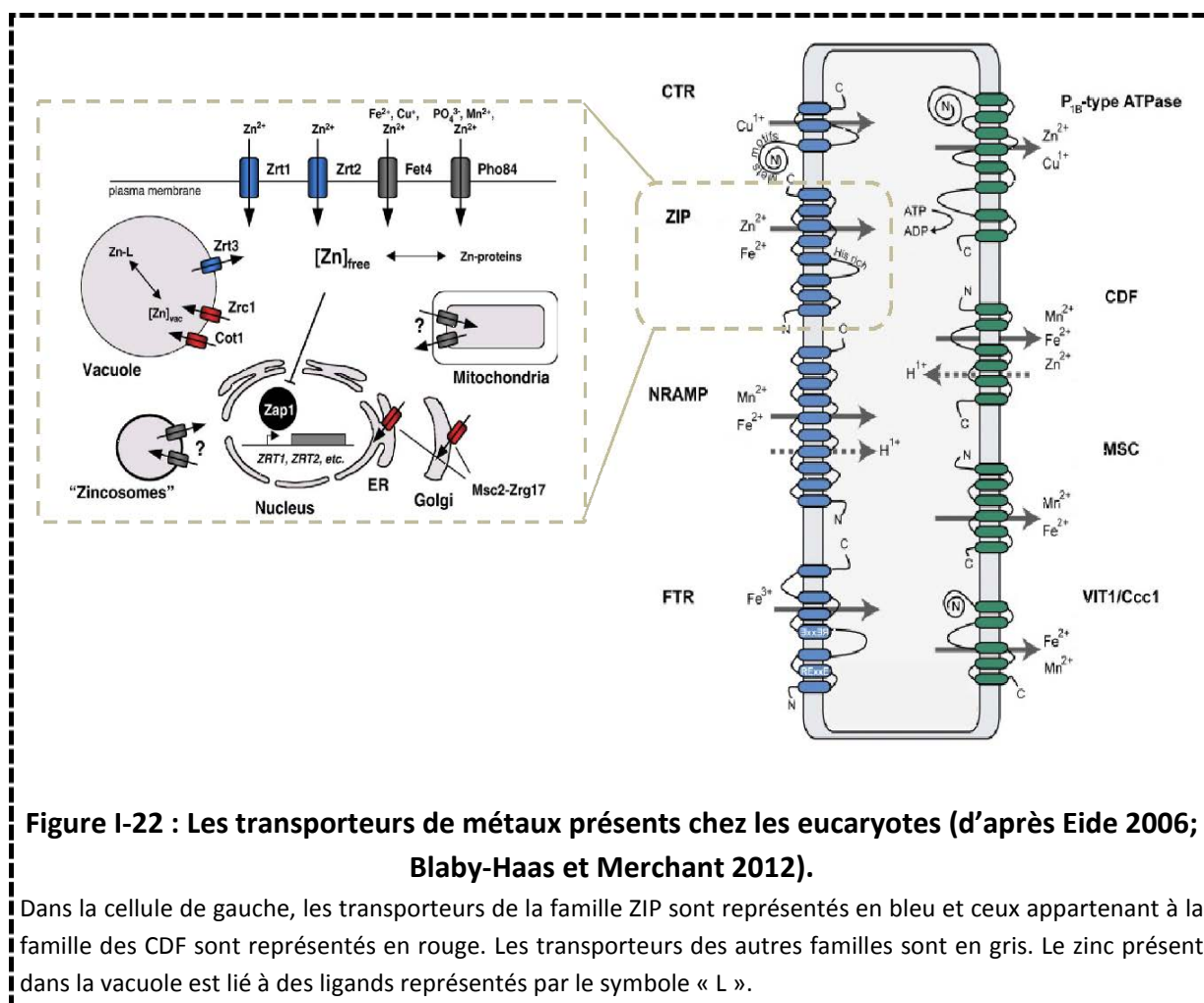
- Le GSH, comme décrit ci-dessus, a une forte affinité vis à vis des ETM (Pocsi *et al.* 2004). Cette chélation permet la diminution de la toxicité dans l'espace intracellulaire. De plus les complexes ETM/GSH peuvent être stockés dans la vacuole grâce à des transporteurs spécifiques (**Figure I-19**), ce qui permet une protection supplémentaire contre la toxicité
- Les phytochélatines (PC) sont des polymères riches en cystéines capables de lier les métaux au niveau de leurs groupements -SH (**Figure I-20**). Leur biosynthèse est induite par les ETM (*e.g.* As, Cd, Cu, Hg, et Zn). Les mutants délétés pour les gènes codant les enzymes synthétisant ces molécules témoignent d'une hypersensibilité à ces ETM. A l'instar du GSH, les complexes PC-ETM sont amenés jusqu'à la vacuole. Les PC sont très peu répandues chez les champignons. Mais, elles ont été identifiées chez les champignons *Boletus edulis* (Collin-Hansen *et al.* 2007) et *Tuber melanosporum* (Bolchi *et al.* 2011). Plus récemment, les gènes codant pour des PC ont été identifiés chez le DSE *E. pisciphila* (Zhao *et al.* 2015) néanmoins leur présence n'a pas encore été démontrée.
- Les métallothionéines (MT), sont des protéines thiol, de faibles masses moléculaires (**Figure I-19**). Elles sont présentes chez de nombreux organismes incluant les bactéries, les plantes, les animaux et les champignons. Les MT lient les ETM essentiels ou toxiques et sont utilisées à la fois pour l'homéostasie

métallique et pour la détoxification. Chez *Gigaspora margarita*, Lanfranco *et al.* (2002) a mis en évidence la haute spécificité des MT pour certains ETM. De même, chez *Paxillus involutus*, le gène *Pimt1* codant pour une MT est régulé par le Cu et le Cd mais pas par le Zn (Bellion *et al.* 2007). Trois MT ont été découverte chez *Amanita strobiliformis* et interviennent dans la séquestration intracellulaire de Ag (Osobová *et al.* 2011). Chez *E. pisciphila*, trois gènes codant pour des MT ont été mis en évidence suite à un stress Cd (Zhao *et al.* 2015). Cependant aucune caractérisation fonctionnelle de ces gènes n'a été réalisée chez cet organisme.

### **6.2.2. L'efflux intra ou extracellulaire des ETM**

Certains ETM étant essentiels et pouvant servir de cofacteurs enzymatiques, la cellule fongique met en place un système de transporteurs permettant l'absorption de ces éléments. A l'inverse, en grande concentration, les ETM peuvent être toxiques et doivent alors être séquestrés dans des compartiments cellulaires ou être excrétés hors de la cellule (Gube 2016). Chez les eucaryotes, il existe six familles principales de transporteurs permettant l'influx ou l'efflux des ETM de la cellule : la famille ZIP (Zrt-Irt like Proteins) ; la famille NRAMP (Natural Resistance- Associated Macrophage Proteins) et les familles FTR (Fe TRansporter) spécifiquement impliquées dans le transport du Fe, la famille CTR (Cu TRansporter), spécifiquement impliquée dans le transport du Cu, les P-type ATPases, et les CDF (Cation Diffusion Facilitators) (Bellion *et al.* 2006; Zhao *et al.* 2015; Gube 2016) (**Figure I-22**).

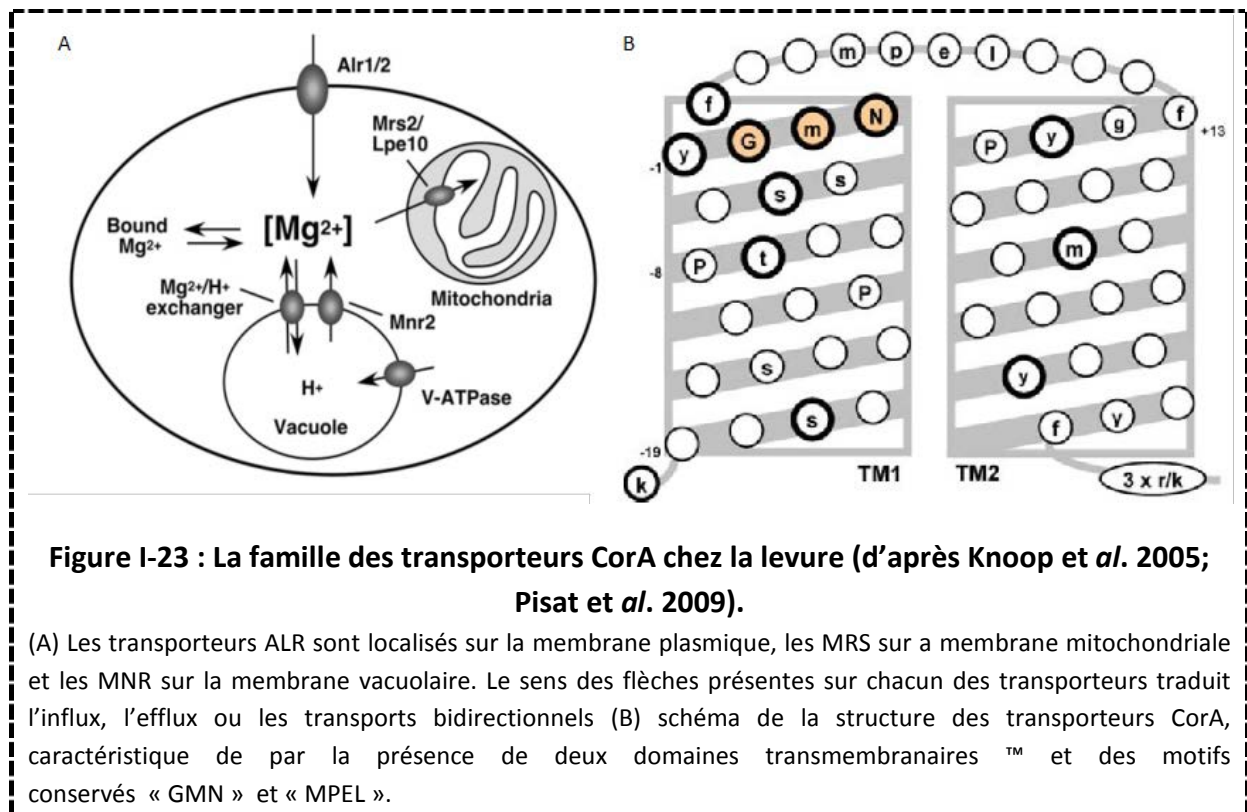
Dans le cadre de cette thèse nous nous sommes particulièrement intéressés à l'étude des mécanismes de la tolérance au Zn chez les DSE. Malheureusement, la plupart des études ont été réalisées sur des plantes, la levure *S. cerevisiae* (**Figure I-22**) et chez quelques champignons mycorhiziens (Blaudez et Chalot 2011; Khouja *et al.* 2013). Cependant quelques données sont disponibles concernant les DSE. Chez *E. pisciphila*, l'activité de 32 transporteurs est modifiée par l'application d'un stress au Cd. Parmi ces transporteurs, la plupart sont impliqués dans l'acquisition et l'homéostasie des éléments essentiels. Le Cd entre dans les cellules fongiques par l'intermédiaire des systèmes non spécifiques du transport intramembranaire de Fe, Ca et Zn. Pour pallier à cette entrée non spécifique en cas d'un excès de Cd, une diminution de l'expression de quelques-uns de ces transporteurs a été observée chez *E. pisciphila* (*e.g.* transporteurs ZIP, ABC et Nramp) (Zhao *et al.* 2015; Wei *et al.* 2016). Chez les plantes et certains champignons les transporteurs ZIP et Nramp sont connus pour le transport respectivement du Zn et du Fe, tandis que les transporteurs ABC ont un rôle dans l'excrétion de nombreuses molécules toxiques (*e.g.* antibiotiques, pesticides)(Gube 2016).



En particulier, une étude avec *E. pisciphila* s'est focalisée sur la régulation des transporteurs Nramp en présence de Cd (Wei *et al.* 2016). Du fait de leur faible sélectivité, certains transporteurs sont également impliqués dans le transport des éléments toxiques, dont le Cd. Chez *E. pisciphila*, l'activité du transporteur EpNramp localisé sur la membrane plasmique est réprimée en présence de Cd, ce qui permet une diminution de l'entrée de l'élément et ainsi une augmentation de la tolérance (Wei *et al.* 2016). A l'inverse de cette sous-régulation, l'expression de transporteurs impliqués dans l'efflux de ces molécules peut être stimulée. Ainsi, une analyse transcriptomique (puces à ADN) portant sur l'étude du stress généré par le Cd chez *C. finlandica* a mis en évidence une augmentation de l'activité d'un transporteur « Proton dependent oligopeptide » (POT) et d'un transporteur DHA1, appartenant tous deux à la famille des MFS pour « Major Facilitator Superfamily » (Gorfer *et al.* 2009). Ces derniers sont connus chez la levure pour jouer un rôle dans la détoxification (Sá-Correia *et al.* 2009).

Outre, les familles de transporteurs citées ci-dessus, d'autres protéines impliquées dans l'homéostasie des éléments essentiels peuvent intervenir dans la tolérance aux métaux. C'est le cas de la famille des **transporteurs CorA**. Plus particulièrement, un chapitre

des résultats de cette thèse est lié à l'étude d'un transporteur CorA dans la tolérance au Zn. La dénomination CorA provient du nom qui a été donné au mutant de *Salmonella typhimurium* présentant une résistance au Co et chez qui la protéine a été identifiée (Niegowski et Eshaghi 2007). Ces transporteurs sont exprimés constitutivement et forment le mécanisme prédominant pour l'accumulation du Mg chez la levure (Pisat *et al.* 2009). Cependant, ces protéines peuvent également transporter d'autres cations divalents ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ ) (Maguire 2006). Ces transporteurs seraient aussi impliqués dans la tolérance aux ETM chez différents organismes dont *S. cerevisiae*, *Salmonella enterica* et *Cupriavidus metallidurans* (Chamnongpol et Groisman 2002; Kern *et al.* 2005a; Pisat *et al.* 2009).



La structure protéique de ces transporteurs est caractérisée par la présence de deux ou trois domaines transmembranaires et par la présence de deux motifs conservés entre les organismes : les motifs « GMN » et « MPEL » situés du côté C terminal de la protéine (Knoop *et al.* 2005) (**Figure I-23**). De plus, des études phylogéniques réalisées sur cette famille CorA ont mis en évidence l'existence de trois sous-familles divergeant en fonction de la localisation cellulaire des protéines et de leurs fonctions (**Figure I-23**) :

- Les transporteurs ALR, localisés sur la membrane plasmique permettent l'influx de Mg dans la cellule. D'autre part, leur rôle a été mis en évidence dans la tolérance vis-à-vis de l'Al, du Cd, du Co et du Ni chez *S. cerevisiae* (Gibson *et al.* 1991; MacDiarmid et Gardner 1998; Kern *et al.* 2005a; Sarikaya *et al.* 2006),

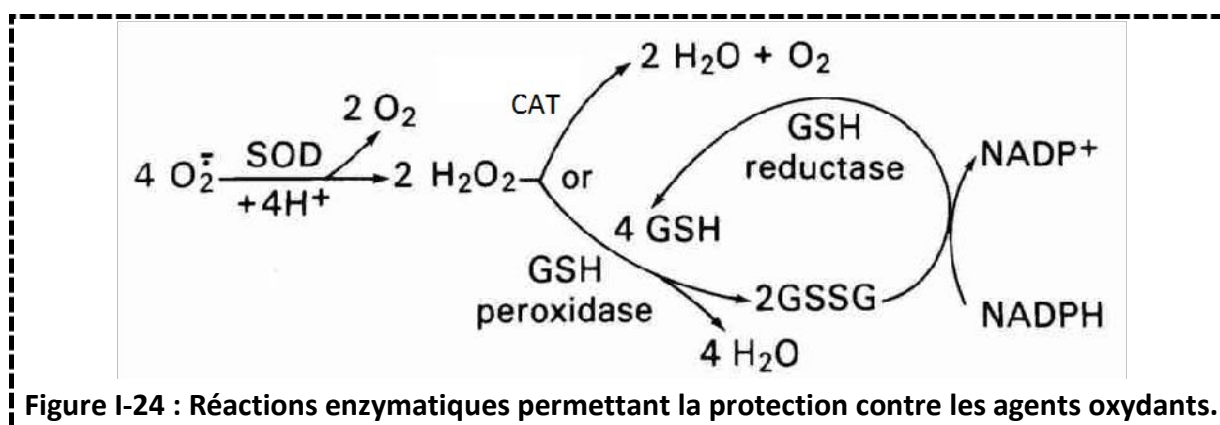
- Les transporteurs MRS, localisés au niveau des mitochondries, ils interviennent dans l'influx de Mg dans ces organites (Niegowski et Eshaghi 2007),
- Les transporteurs MNR sont localisés au niveau de la vacuole. Ils interviennent dans l'efflux de Mg vers le cytosol. Leur absence entraîne une diminution de la tolérance et une augmentation de l'accumulation dans la cellule du Co, du Mn et du Zn chez *S. cerevisiae* (Pisat *et al.* 2009).

### 6.3. Autres mécanismes de tolérance aux ETM chez les DSE

#### 6.3.1. La réponse anti-oxydante

Des concentrations élevées en ETM génèrent des stress oxydants considérables. En conséquence, des métabolismes enzymatiques, ou non enzymatiques, sont activés en présence de métaux (*e.g.* glutathion (GSH), catalase (CAT), thioredoxine, glutaredoxine, polyamines, superoxide dismutase (SOD), ubiquinone ou acide ascorbique) (Bellion *et al.* 2006; Zhao *et al.* 2015). Les enzymes SOD, POD et CAT ont pour rôle d'éliminer les formes réactives de l'oxygène selon les réactions présentées dans la **Figure I-24**. Chez *G. cylindrosporus* la présence de Pb entraîne une augmentation des activités CAT et SOD (Ban *et al.* 2012). De la même manière, ces deux enzymes sont stimulées en présence de Zn et de Cd chez *E. pisciphila* (Zhang *et al.* 2008; Diao *et al.* 2013). Le GSH joue le rôle de donneur d'électrons pour la glutathion peroxydase (GPx) (**Figure I-24**). Vingt-quatre gènes codant des glutathion-S-transférases ont été identifiés chez *E. pisciphila*, leurs expressions étant induites par la présence d'ETM (Cd, Cu, Zn, Pb) (Shen *et al.* 2015). Chez le DSE *Gaeumannomyces cylindrosporus*, la présence du GSH est augmentée en présence de Pb dans le milieu de culture (Ban *et al.* 2012).

La comparaison de ces trois mécanismes entre deux souches de *E. pisciphila* (souche sensible (B40-3) *versus* souche tolérante (H93)) confirme le rôle de ces derniers dans la défense anti-oxydante des champignons DSE (Diao *et al.* 2013). En présence de Zn, la réponse antioxydante de la souche sensible ( $EC_{50} = 26$  mg/l) et plus faible que celle de la souche tolérante ( $EC_{50} = 1010$  mg/l) : 1,32 fois plus d'activité SOD et POD sont observé et trois fois plus de GSH est présent dans la souche tolérante (Diao *et al.* 2013).



#### **6.3.1.1. La réparation de l'ADN et les facteurs de transcription**

Les facteurs de transcription (TF) jouent un rôle crucial dans la tolérance aux ETM. Ils permettent la régulation des gènes et ainsi l'induction et la répression des mécanismes de tolérance. Chez *E. pisciphila* le rôle des TF dans la tolérance au Cd a également été mise en évidence via une étude reposant sur une analyse RNAseq (Zhao *et al.* 2015).

En présence d'ETM, l'information génétique des organismes subit des lésions (cassures, mésappariements). Face à ce problème des mécanismes de réparation peuvent être mis en place. Ces mécanismes ont été observés chez des bactéries et chez des champignons (Ruotolo *et al.* 2008; Gube 2016) et leur présence a été supposée chez le DSE *E. pisciphila* (Zhao *et al.* 2015).

Les quelques études menées jusqu'alors chez les DSE ont permis d'observer une forte similarité entre la réponse aux ETM chez les DSE et chez les champignons ectomycorhiziens. Cependant pour l'essentiel des résultats obtenus, une caractérisation ou une vérification fonctionnelle des résultats obtenus est nécessaire. De plus, la majorité des travaux ont été menés avec une seule souche d'*E. pisciphila* et demandent encore à être confirmés chez d'autres genres.

### **7. Conclusion de l'état de l'art**

Le phytomanagement des sols pollués est une technique alternative à la remédiation, moins onéreuse et respectueuse de l'environnement, qui permet de gérer de grandes surfaces. De plus, la biomasse produite sur ces sites peut être valorisée économiquement via des filière de bioénergie, fibres ou de récupération de métaux.

Les plantes se développant sur les sols pollués par les ETM interagissent, au niveau de leurs racines, avec de nombreux champignons. Parmi ces organismes, les DSE sont abondants dans les sols pollués par les ETM et pourraient jouer un rôle clef sur la mobilisation et l'immobilisation de ces éléments dans le sol et dans leur transfert aux plantes. De plus, ils peuvent stimuler la croissance de la plante hôte via différents mécanismes dont l'augmentation de la nutrition minérale ou l'augmentation de la teneur en chlorophylles. Ils semblent ainsi être des candidats très prometteurs pour la phytoremédiation ou le phytomanagement. Cependant, l'effet des DSE sur la croissance végétale est très controversé et décrit comme variant du parasitisme au mutualisme. De plus, les études effectuées concernent uniquement un nombre très restreint de genres et d'espèces fongiques et/ou d'espèces végétales et demandent à être étendues à d'autres genres/espèces et n'ont que très rarement été réalisées en présence d'ETM.

L'utilisation de souches fongiques tolérantes, provenant de sites pollués pourrait apporter un avantage pour la réussite de la phytoremédiation dans la mesure où ces souches peuvent être acclimatées à de tels environnements. Toutefois, ces considérations

nécessitent la compréhension des mécanismes utilisés par les DSE pour tolérer les ETM. Or, à ce jour ces données sont manquantes ou, limitées à une souche (*e.g. E. pisciphila*) et à un élément (*e.g. le Cd*). D'autre part, la présence de mélanine pourrait jouer un rôle fondamental dans la tolérance aux ETM. Mais les résultats étayant cette hypothèse restent limités à des études d'observation et sont très contradictoires d'une étude à l'autre.

*In situ*, les DSE co-habitent avec d'autres symbiotes fongiques tels que les champignons endo- et ectomycorhiziens. A l'instar des autres associations fongiques, il pourrait s'établir des relations variant du parasitisme à la synergie. Il s'avère donc impératif de prendre en compte ces interactions pour se rapprocher au mieux de conditions réelles. Toutefois, les expérimentations utilisant des consortia de souches fongiques sont rares, particulièrement dans le cas des DSE. De plus, le type d'interactions qui s'établissent entre une souche fongique et un second symbiote sont encore inconnus, tout comme les effets générés sur la plante hôte et/ou sur les ETM.

## 8. Objectifs de la thèse

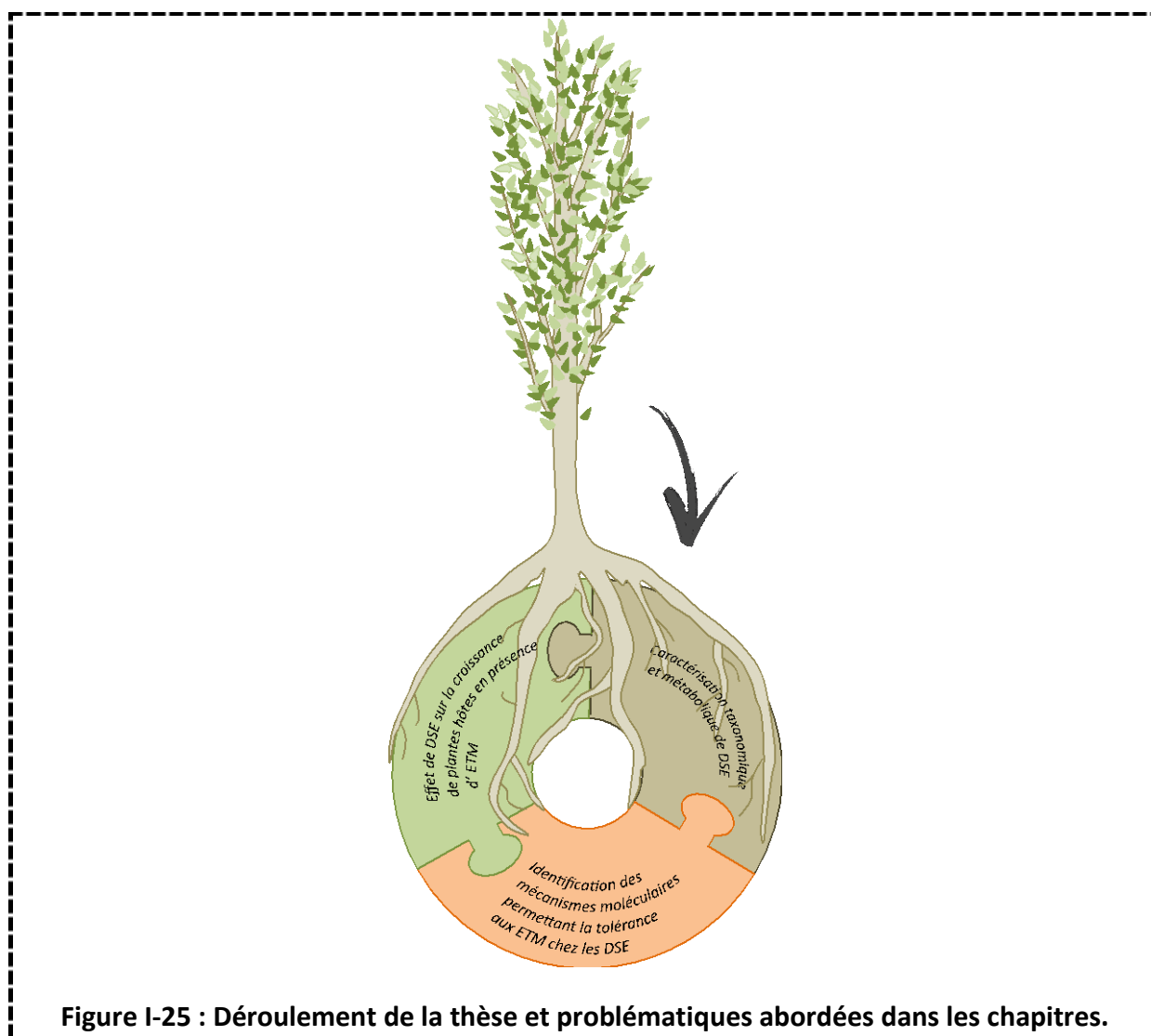
La démarche de la thèse vise à mieux comprendre les interactions « **plantes-champignons DSE-ETM** ». Pour cela, une étude multi-dimensionnelle partant de l'étude de l'effet des ETM sur les DSE à l'échelle moléculaire et cellulaire, jusqu'à l'association de ces symbiotes aux racines des plantes dans les sols pollués par des ETM, a été menée. Ainsi, ce manuscrit sera divisé en trois parties, chacune de ces divisions correspondant à une échelle d'étude (**Figure I-25**), et visant à répondre aux questions identifiées.

- *Quelles sont les caractéristiques des DSE provenant de sols pollués par des ETM ? Sont-ils capables de s'associer avec des plantes et sont-ils compatibles avec d'autres souches fongiques et si oui, quel est leur effet sur ces organismes ?* (**Figure I-25**, marron)

Pour mieux comprendre la **singularité** des souches DSE provenant de milieux pollués, des isollements ont été réalisés à partir de racines de peupliers poussant sur des sols pollués aux métaux. Les souches obtenues ont ensuite été identifiées taxonomiquement. Afin d'étudier le mode de vie de ces souches, leurs capacités à dégrader différentes **sources de carbone** et à **coloniser** des plantes ont été évaluées. En parallèle, certaines **capacités PGP** (« *plant growth promoting* ») ont été analysées. Parmi ces dernières, les capacités de biocontrôle contre des **champignons phytopathogènes** et la **tolérance aux ETM** ont été étudiées. Les résultats de ce chapitre permettront d'une part de réaliser une caractérisation approfondie de chacune des souches, et d'autre part, de sélectionner celles qui favorisent au mieux la croissance des plantes.

- Spécifiquement, dans le cas de sols pollués par des ETM, (i) quel est l'effet de l'inoculation de champignons DSE sur la croissance de plantes (ii) Comment interagissent une souche DSE et une souche mycorhizienne sur la croissance de ray-grass? (Figure I-25, vert) :

A partir des résultats du chapitre III et des souches ainsi sélectionnées, les **capacités à améliorer la croissance de plantes en présence d'ETM ont ensuite été étudiées**. Cette étude s'est déclinée en deux étapes. Dans un premier temps, l'effet de trois souches de DSE sur la croissance du peuplier et du bouleau a été mesuré sur deux sols pollués aux ETM présentant des propriétés agronomiques différentes (e.g. pH, granulométrie, métaux biodisponibles..). Dans un second temps, la souche de DSE présentant les meilleures capacités à coloniser et à promouvoir la croissance des plantes a été associée à une souche endomycorhizienne. L'objectif, ici, est d'une part d'évaluer **l'effet d'une inoculation mixte** sur la croissance végétale et d'autre part d'évaluer la capacité d'une souche de DSE choisie à interagir avec une souche endomycorhizienne.



- *Quels sont les mécanismes permettant aux DSE de tolérer les ETM ? Plus spécifiquement, quels sont les gènes impliqués ? et quelle est la part de la mélanine dans ce phénomène ? (Figure I-25, orange) :*

Dans le but d'identifier les mécanismes mis en place par les champignons DSE pour tolérer les ETM, nous avons choisi de nous focaliser sur les mécanismes impliqués dans la tolérance au **Zn**. Nous avons réalisé une **banque de mutants insertionnels** via *Agrobacterium tumefaciens*. En préalable à la création de cette banque, une première étape a consisté à étudier le rôle de l'**âge** et du contenu en **mélanine** dans la réussite de la transformation génétique de huit souches de DSE. A partir de ces résultats, la souche *Leptodontidium* sp. Me07 a été choisie comme modèle d'étude. L'étude de la réponse au Zn des mutants a mené à l'obtention de 19 mutants sensibles. Nous nous sommes ensuite focalisé sur l'étude d'un gène de la famille des CorA. Une approche post-génomique de caractérisation fonctionnelle de ce gène a été mise en œuvre. Par ailleurs, l'utilisation de mutants albinos et d'inhibiteurs des voies de biosynthèse de la mélanine a permis l'étude du rôle de ce polymère dans la tolérance et dans l'accumulation des ETM chez plusieurs espèces de DSE.



## II. Matériels et méthodes

---



## 1. Les sites pollués étudiés

Quatre sites expérimentaux pollués par des ETM ont servi de support à des expérimentations dans le cadre de cette thèse. Des racines issues des sites de Pierrelaye, Fresnes-sur-Escaut et Métaleurop-Leforest ont été utilisées pour l'isolement de souches fongiques (Chapitre III). Des prélèvements de sols sur les parcelles expérimentales de Jeandelaincourt et de Pierrelaye-Bessancourt ont été effectués afin de réaliser des expériences en conditions contrôlées, au laboratoire, visant à observer l'impact de l'inoculation de plantes par des champignons dans des sols pollués (Chapitre IV). Ces différents sols ont été choisis en raison de leurs différences d'origines, de leurs différentes teneurs en ETM disponibles et totaux et de leurs propriétés physico-chimiques (**Tableau II-1**). Un bref descriptif de chacun de ces sites est donné dans les paragraphes ci-dessous.

### Le site expérimental de Pierrelaye :

Le site expérimental de Pierrelaye se situe dans la plaine de Pierrelaye-Bessancourt du département du Val d'Oise (95). Cette plaine de 1200 hectares, caractérisée par un sol de texture sablonneuse (**Tableau II-1**), a été utilisée pour le maraîchage depuis les années 1880. La fertilité des cultures était assurée par l'épandage des eaux usées non traitées de la ville de Paris. En 1999, suite à la mise en évidence de teneurs élevées en métaux (Cd, Cu et Zn notamment) dans les légumes issus de cette plaine, la production maraîchère a été interdite par arrêté préfectoral. Suite à cette décision, les cultures maraîchères furent remplacées par de la monoculture de maïs pour usage en alimentation animale. En 2007 et en 2011, dans le cadre des projets PHYTOPOP<sup>9</sup> (ANR 2007-2011) et BIOFILTREE<sup>10</sup> (ANR 2010-2014), des parcelles expérimentales de TCR (taillis à courtes rotations) et de TTCR (taillis à très courtes rotations) de peupliers, inoculés ou non par des champignons mycorhiziens, ont été mises en place. Un suivi de la croissance des peupliers, des communautés microbiennes et du transfert des polluants dans les plantes a été réalisé (Foulon *et al.* 2016). De plus, des campagnes de prélèvements de racines ont été menées en 2011 et 2013 afin d'isoler des souches fongiques associées aux racines des peupliers se développant sur sites contaminés aux ETM (Lacercat-Didier *et al.* 2016).

---

<sup>9</sup> <http://dendroremediation.univ-fcomte.fr/spip.php?rubrique5>

<sup>10</sup> [http://www.agence-nationale-recherche.fr/suivi-bilan/editions-2013-et-anterieures/recherches-exploratoires-et-emergentes/blanc-international/fiche-projet/?tx\\_lwmsuivibilan\\_pi2%5BCODE%5D=ANR-10-INTB-1703](http://www.agence-nationale-recherche.fr/suivi-bilan/editions-2013-et-anterieures/recherches-exploratoires-et-emergentes/blanc-international/fiche-projet/?tx_lwmsuivibilan_pi2%5BCODE%5D=ANR-10-INTB-1703)

#### Le site expérimental de Fresnes-sur-Escaut :

Le site expérimental de Fresnes-sur-Escaut est situé dans le département du Nord, en région Hauts-de-France. Le site jouxte la rivière Escaut et est géré par l'organisme Voies Navigables de France (VNF). La pollution en Cd et en Zn constatée sur ce site trouve son origine dans le curage de la rivière et le dépôt répété des sédiments récupérés pendant plusieurs années. Des couches de différentes épaisseurs variant de quelques dizaines de centimètres (20 à 40 cm) à quelques mètres (2 à 3 m) ont été successivement déposées. Le sol est de texture limoneuse. Par la suite, des peupliers ont été implantés en 2011 dans le cadre du projet BIOFILTREE. Une campagne de prélèvements de racines a également été réalisée en 2013 afin d'isoler des souches fongiques (Chapitre III).

#### Le site expérimental de Leforest :

A proximité de la commune de Douai (région Hauts-de-France), se trouvaient deux des plus importantes usines de production de Zn et de Pb en France (Annexe 1), propriétés de la société Metaleurop SA. La première a été implantée sur la commune de Noyelles-Godault en 1894 et pouvait produire annuellement 170 000 t de Pb et 105 000 t de Zn. La seconde, implantée en 1869 à Aubry, produisait 230 000 t de Zn par an. Malgré la fermeture des activités en 2003, les sols autour des usines sont encore fortement pollués par le Cd, le Pb et le Zn (**Tableau II-1**) et dans des proportions moindres par les éléments suivants : Ag, As, Bi, Cr, Cu, Co, Hg, Sn, In, Ni, Se et Tl (Sterckeman *et al.* 2002). La surface affectée couvre une zone de 120 km<sup>2</sup> sur lesquelles vivent 55 000 habitants, touchant les parcelles agricoles comme les jardins particuliers. Aux alentours de Noyelles-Godault, les teneurs moyennes en Cd, Pb et Zn sont 23, 13 et 9 fois plus importantes que sur un site loessique de référence (Sterckeman *et al.* 2002) (**Tableau II-1**). La distribution verticale des ETM se restreint aux 30 premiers centimètres de sol puis décroît très fortement en profondeur (Sterckeman *et al.* 2000). Le site expérimental mis à profit dans cette thèse est situé sur la commune de Leforest, entre les deux usines. La zone d'étude est une ancienne parcelle agricole, dont le sol présente une texture limoneuse. Dans le cadre du projet BIOFILTREE, une plantation de peupliers a été mise en place en 2011 sur cette parcelle. En 2013, une campagne de prélèvements de racines a également été effectuée (Chapitre III).

#### Le site de Jeandelaincourt :

Dans le cadre du projet LORVER<sup>11</sup>, différents sous-produits fertiles provenant de la région Grand-Est ont été choisis pour construire des technosols permettant de

---

<sup>11</sup> <http://lorver.org/accueil/index.html>

fournir de la biomasse végétale sur des friches industrielles. Les matériaux ont été sélectionnés sur la base de leur teneur en polluants (*e.g.* teneur totale, teneur biodisponible), et de leur capacité à favoriser le développement des plantes (*e.g.* texture, teneur en matière organique, rétention en eau). Les mélanges élaborés ont ensuite été disposés dans des parcelles de 225 m<sup>2</sup> sur le site expérimental de l'entreprise SITA FD situé à Jeandelaincourt (Meurthe-et-Moselle). Le mélange final est composé d'une terre (anciennement contaminée par des composés organiques (*e.g.* hydrocarbures aromatiques polycycliques) et qui a subi un traitement de décontamination par biopile), d'une boue industrielle de pH alcalin (10,2) et d'une boue industrielle de pH acide (1,45). La première boue est issue d'une industrie de lavage de gaz de combustion et contient du Cd (284 mg/kg), du Pb (5108 mg/kg) et du Zn (23630 mg/kg). La seconde est issue d'un processus de production d'acide de chlorure ferrique. Des peupliers ont ensuite été implantés en avril 2014. Cent litres de sols ont été prélevés en juin 2014 dans la parcelle. Ce sol a été tamisé à 1 cm puis utilisé comme support de croissance pour des plants de peupliers et de bouleau (Chapitre IV-1, Annexe 1).

### 1.1. Caractéristiques physico-chimiques des sols

L'ensemble des caractérisations physico-chimiques des sols utilisés lors de cette thèse a été réalisé par la société SADEF (Aspach-le-bas, France) (certificat COFRAC N° 1-0751) en utilisant les normes décrites dans le **Tableau II-1**. De plus, les teneurs en ETM totaux et solubles ont été déterminées au laboratoire en suivant les normes citées ci-après, à partir respectivement de 100 mg et de 4,5 g de sol sec, tamisé à 2mm.

### 1.2. Préparations des sols pour les tests « en pots »

L'effet de l'inoculation par des DSE et/ou par des champignons mycorhiziens a été évalué sur des plantes se développant dans des substrats contaminés (Chapitre IV). Afin d'éliminer toute contamination bactérienne ou fongique, les sols utilisés pour ces expériences sont préalablement stérilisés trois fois à 115°C pendant 20 minutes, avec un intervalle de 24 h entre deux étapes d'autoclavage.

Des suspensions bactériennes endogènes à chaque sol ont été obtenues à partir du protocole suivant : 250 g de sol frais sont agités à 140 rpm, à 28°C, dans une solution de NaCl 0,9% (m/v) pendant 2 h, puis la solution est filtrée à 5 µm afin d'éliminer les spores endomycorhiziennes et la plupart des spores des autres champignons. Deux millilitres de la suspension pour 100 ml de sol sont ensuite ajoutés aux sols préalablement stérilisés afin de réintroduire une flore bactérienne quasi-identique à celle présente dans le sol avant stérilisation.

**Tableau II-1 : Caractéristiques physico-chimiques des sols utilisés dans ce manuscrit**

| Paramètres                               | Norme             | Unités           | Fresnes-sur-Escaut | Leforest | Lorver | Pierrelaye |
|------------------------------------------|-------------------|------------------|--------------------|----------|--------|------------|
| pH <sub>H2O</sub>                        | NF ISO 10390      | -                | 7,8                | 6,5      | 8,3    | 7,4        |
| CEC                                      | NFX 31130         | cmol+/kg sol sec | 155,0              | 201,0    | 84,0   | 82,0       |
| P <sub>Joret-Hebert</sub>                | NFX 31 161        | g/kg             | 0,50               | 0,28     | 0,56   | 1,10       |
| N total                                  | NF ISO 11261      | g/kg             | 3,64               | 2,19     | 0,8    | 2,70       |
| C total                                  | NF ISO 14235      | g/kg             | 149,0              | 27,0     | 13,0   | 31,0       |
| C/N                                      |                   | -                | 41,0               | 12,0     | 16,0   | 12,0       |
| Argile (0-2 µm)                          | NF 31 107         | %                | 15,5               | 27,8     | 14,3   | 3,7        |
| Limon (2-50 µm)                          |                   | %                | 66,8               | 54,7     | 24,6   | 10,5       |
| Sable (50-2000 µm)                       |                   | %                | 17,7               | 17,6     | 61,0   | 87,5       |
| Pb total                                 | NF ISO 2236 et NF | mg/kg            | 57,0               | 176,0    | 451,0  | 139,0      |
| Cd total                                 |                   | mg/kg            | 1,0                | 3,1      | 5,1    | 1,5        |
| Zn total                                 |                   | mg/kg            | 191,0              | 259,0    | 1784,0 | 318,0      |
| Pb extractible (CaCl <sub>2</sub> 10 mM) | NEN 5704          | mg/kg            | <0,1               | <0,1     | 0,1    | 0,1        |
| Cd extractible (CaCl <sub>2</sub> 10 mM) |                   | mg/kg            | 0,03               | 0,05     | 0,05   | 0,04       |
| Zn extractible (CaCl <sub>2</sub> 10 mM) |                   | mg/kg            | 4,20               | 13,6     | 0,20   | 1,70       |

## 2. Matériels biologiques

### 2.1. Microorganismes utilisés

#### 2.1.1. Les organismes fongiques et oomycètes

L'essentiel de ce manuscrit porte sur l'étude des interactions « Plantes-DSE » et « DSE-métaux ». A cette fin treize souches de DSE ont été utilisées lors de cette thèse (**Tableau II-2**). De plus, afin d'évaluer le potentiel des souches DSE à protéger leur plante hôte contre les stress biotiques, trois souches phytopathogènes ont été utilisées (Chapitre III-2).

En parallèle, pour comprendre et tester les capacités des DSE à interagir avec d'autres champignons, des souches mycorhiziennes (endo- et ecto-mycorhiziennes) ont également été utilisées (Chapitre III-2 et Chapitre IV). La souche endomycorhizienne *Funneliformis mosseae* AMB06.11 a été fournie par la société Agronutrition<sup>12</sup>. Les détails concernant l'ensemble de ces souches sont présentés dans le **Tableau II-2**. Les souches renseignées par les termes « CBS » ont été achetées auprès de l'organisme CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre (Pays-Bas).

A l'exception des souches endomycorhiziennes, toutes les souches sont conservées à -80°C dans du glycérol à 20% (v/v). L'entretien des souches est assuré par repiquages successifs à partir des souches mères sur un milieu malt extract gélosé (MEA) (**Tableau II-3**) et incubées à 24°C le temps de leur croissance. En fonction des expériences réalisées, les souches ont soit été cultivées *in vitro* (e.g. en culture liquide ou sur milieu gélosé) ou dans des conditions non axéniques (e.g. inoculation de plantes sur substrat artificiel ou sols).

#### 2.1.2. Les souches bactériennes

##### 2.1.2.1. Escherichia coli

La souche *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen)<sup>13</sup> a été utilisée pour les étapes de clonage et de multiplication de plasmides. Cette souche est caractérisée par une grande capacité de transformation ( $1 \times 10^9$  cfu/ $\mu$ g d'ADN plasmidique) et dont le génotype est : F-*mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80/*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$  *lacX74* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*araleu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*. Elle est conservée à -80°C et cultivée à 37°C en milieu LB (gélosé ou liquide) (**Tableau II-4**).

---

<sup>12</sup> <http://www.agronutrition.com>

<sup>13</sup> <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C404010>

**Tableau II-2 : Souches fongiques et oomycètes utilisées au cours de cette thèse.**

| Souche      | Affiliation taxonomique             | Mode de vie | N°d'accession | Origine                                        | Plante hôte                                            |
|-------------|-------------------------------------|-------------|---------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Fe06*       | <i>Cadophora</i> sp.                | DSE         | KU886589      | Fresnes sur Escaut                             | <i>Populus</i> sp.                                     |
| DSE1049     | <i>Cadophora</i> sp.                | DSE         | JN859258      | (Hongrie)(Vági <i>et al.</i> 2014)             |                                                        |
| CBS 100584  | <i>Cadophora malorum</i>            | DSE         | AY249062      | Edmonson Point (Antarctique) CBS               | -                                                      |
| Va47*       | <i>Cladosporium cladosporioides</i> | DSE         | KX622756      | Vandœuvre-lès Nancy (France)                   | <i>Picea abies</i>                                     |
| CBS 101367  | <i>Cladosporium cladosporioides</i> | DSE         | HM148002      | Minas Gerais (Brésil) (CBS)                    | souche isolée à partir de sol                          |
| Me07**      | <i>Leptodontidium</i> sp.           | DSE         | KU886584      | MetalEurop (France)                            | <i>Populus</i> sp.                                     |
| Me10**      | <i>Leptodontidium</i> sp.           | DSE         | KU886585      | MetalEurop (France)                            | <i>Populus</i> sp.                                     |
| Pr30**      | <i>Leptodontidium</i> sp.           | DSE         | KU886583      | Pierrelaye (France)                            | <i>Populus</i> sp.                                     |
| PMI_412     | <i>Leptodontidium</i> sp.           | DSE         | JX243932      | (Bonito <i>et al.</i> 2016)                    | <i>Populus deltoides</i>                               |
| Pr28**      | <i>Phialocephala fortinii</i>       | DSE         | KU886588      | Pierrelaye (France)                            | <i>Populus</i> sp.                                     |
| Va46*       | <i>Phialophora mustea</i>           | DSE         | KX622757      | Vandœuvre-lès-Nancy                            | <i>Fraxinus excelsior</i>                              |
| Pr27**      | <i>Phialophora mustea</i>           | DSE         | KU886586      | Pierrelaye (France)                            | <i>Populus</i> sp.                                     |
| Pr29**      | <i>Phialophora mustea</i>           | DSE         | KU886582      | Pierrelaye (France)                            | <i>Populus</i> sp.                                     |
| DSM 11827   | <i>Piriformospora indica</i>        | Endophyte   | KF061284      | Rajasthan (Inde)                               | <i>Prosopis juliflora</i> & <i>Ziziphus nummularia</i> |
| D2          | <i>Hebeloma cylindrosporum</i>      | ECM         | JQ751210      | St Martin d'Oney (France) (Debaud et Gay 1987) | <i>Pinus Pinaster</i>                                  |
| ATCC 200175 | <i>Paxillus involutus</i>           | ECM         | PRJNA60449    | Midlothian (Ecosse)(Kohler <i>et al.</i> 2015) | <i>Betula pendula</i>                                  |
| AMB06.11**  | <i>Funneliformis mosseae</i>        | AMF         | -             | Pierrelaye (France)                            | <i>Populus</i> sp.                                     |
| Cit 3       | <i>Phytophthora citricola</i>       | Pathogène   | -             | -                                              | -                                                      |
| Pyint 1     | <i>Pythium Ultimum</i>              | Pathogène   | -             | -                                              | -                                                      |
| LNPV394     | <i>Heterobasidion annosum</i>       | Pathogène   | -             | Bordeaux (France)                              | <i>Pinus Pinaster</i>                                  |

Les souches renseignées par (Vági *et al.* 2014) et (Bonito *et al.* 2016) ont respectivement été données par le Dr Gabor Kovacs (université de Budapest, Hongrie) et le Dr Gregori Bonito (Université du Michigan, États-Unis). Les souches Pyint 1, Cit3 ont été fournies par l'INRA de Champenoux (France) et la souche LNPV 394 par l'ANSES (France). Les souches légendées par \* ont été isolées lors de cette thèse tandis que celles présentant \*\* ont été isolées lors de deux thèses précédentes (Thèses L. Lacercat et J. Foulon) et les souches sans précisions ont été fournies par d'autres laboratoires.

**Tableau II-3 : Composition des milieux utilisés pour la culture des champignons.**

| Composés                                            | Composants |        |         |
|-----------------------------------------------------|------------|--------|---------|
|                                                     | Pachlewski | Malt   | M9      |
| Extrait de malt                                     | -          | 12 g/l |         |
| Tartrate d'ammonium                                 | 2,3 g/l    | -      | 3 g/l   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 0,5 g/l    | -      |         |
| CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O               | -          | -      |         |
| MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O               | 1,0 g/l    | -      |         |
| NH <sub>4</sub> Cl                                  |            |        | 1 g/l   |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                    | -          | -      | 6 g/l   |
| NaCl                                                |            |        | 0,5 g/l |
| Maltose                                             | 5,0 g/l    | -      |         |
| Glucose                                             | 20 g/l     | -      | 4 g/l   |
| Thiamine-HCl (Solution mère 1g/l)                   | 10 µl/l    | -      |         |
| Solution de Kanieltra                               | 100 µl/l   | -      |         |
| Ajuster à pH 5,5                                    |            |        |         |
| Agar*                                               | 20 g/l     | 15 g/l | 15 g/l  |
| Autoclaver 20 min à 120°C                           |            |        |         |
| Solution de Kanieltra :                             |            |        |         |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 20,6 µM    |        |         |
| CuCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O               | 0,47 µM    |        |         |
| Fe-EDTA Na                                          | 10,7 µM    |        |         |
| MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O                | 11,6 µM    |        |         |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O | 0,28 µM    |        |         |
| ZnSO <sub>4</sub>                                   | 3,24 µM    |        |         |

\*L'agar est ajouté uniquement en cas de cultures gélosées

**Tableau II-4 : Composition des milieux LB et LBinduction**

| Composés                   | Concentration finale |             |
|----------------------------|----------------------|-------------|
|                            | LB                   | LBinduction |
| Tryptone                   | 10 g/l               | 10 g/l      |
| NaCl                       | 10 g/l               | 10 g/l      |
| Extrait de levures         | 5 g/l                | 5 g/l       |
| Glycérol                   | -                    | 5 ml        |
| Agar*                      | 20 g/l               | 20 g/l      |
| Autoclaver 20 min à 120 °C |                      |             |
| Acétosyringone             | -                    | 200 µM      |

\*L'agar est ajouté uniquement en cas de cultures gélosées

### 2.1.2.2. *Agrobacterium tumefaciens*

La souche EHA101 d'*A. tumefaciens* est utilisée dans ce manuscrit. Elle est conservée à -80°C dans une solution de glycérol à 20%. Elle est réactivée sur milieu Luria-Bertani (LB). La souche a été utilisée pour réaliser des expériences d'agrotransformation de plusieurs souches DSE (Chapitre V)

### 2.1.3. *Les levures*

La souche parentale de levure utilisée est *Saccharomyces cerevisiae* (BY4741), elle sera par la suite appelée souche sauvage (ou WT). Le génotype de cette souche est le suivant : MATa *ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0*. De plus, un mutant isogénique de cette souche a également été utilisé : un mutant pour le gène *MNR2* (YKL064w::kanMX4). Ces deux souches proviennent de la collection Euroscarf<sup>14</sup>. Elles sont conservées au laboratoire à -80°C dans une solution de glycérol à 30% (v/v). Elles sont réactivées et multipliées sur milieu yeast peptone dextrose (YPD) (**Tableau II-5**). Pour les expériences réalisées en présence d'ETM, le milieu SD sans uracile (SD-URA) est utilisé (**Tableau II-5**). Les cultures sont incubées à 28°C. Pour les expériences nécessitant une récolte de cellules issues d'une culture liquide, celles-ci ont été effectuées à partir de cultures en phase exponentielle de croissance ( $DO_{600nm} = 0,9$ ).

**Tableau II-5 : Composition des milieux YPD et SD-uracile**

| Composés                                                         | Concentration finale |             |
|------------------------------------------------------------------|----------------------|-------------|
|                                                                  | YPD                  | SD -uracile |
| Tryptone                                                         | 20 g/l               | -           |
| Extrait de levure                                                | 10 g/l               | -           |
| Glucose                                                          | 20 g/l               | -           |
| Yeast nitrogen base sans acide aminés et sans sulfate d’ammonium | -                    | 1,7 g/l     |
| Galactose                                                        | -                    | 20 g/l      |
| Supplément en acides aminés sans uracile (Sigma, Y1501)          | -                    | 1,92 g/l    |
| Ajuster le pH à 5,9                                              |                      |             |
| Agar*                                                            | 20 g/l               |             |
| Autoclaver 20 min à 120°C                                        |                      |             |

\*L'agar est ajouté uniquement en cas de cultures gélosées

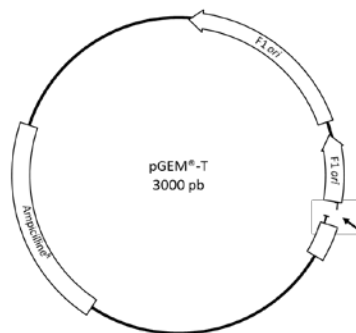
---

<sup>14</sup> <http://www.euroscarf.de>

## 2.2. Plasmides utilisés

### 2.2.1. Le plasmide pGEM®-T

Le plasmide pGEMT®-T (3000 pb) (Promega) (**Figure II-1**) est utilisé pour le clonage des produits d'amplification par PCR dans *E. coli*. Il possède un gène de résistance à l'ampicilline et une origine de réplication du phage f1. Au cours de ce travail, ce plasmide a été utilisé pour le clonage des fragments ITS et des fragments obtenus par TAIL-PCR (Chapitres III et V).

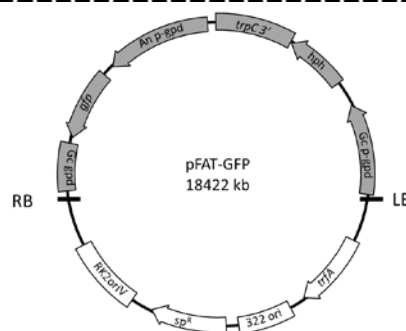


**Figure II-1 : Carte du plasmide pGEM®-T.**

La flèche noire signale la zone de ligation des séquences d'intérêts.

### 2.2.2. Le plasmide pFAT-GFP

Le plasmide pFAT-GFP (14822 bp) (Fitzgerald *et al.* 2003) est un vecteur navette entre *E. coli*, *A. tumefaciens* et les champignons Ascomycètes. Il a été utilisé dans le chapitre V afin de réaliser des expériences d'agrotransformation des DSE visant à l'obtention de mutants d'insertion. Il est formé de deux parties : l'ADN de transfert (ADN-T) encadré par les bordures droites (RB) et gauche (LB) (**Figure II-2**) et le reste du plasmide. Il possède deux gènes de résistance : un, vis à vis de la spectinomycine, à destination des bactéries, et l'autre vis-à-vis de l'hygromycine placé sur le T-DNA, à destination des champignons. Le plasmide pFAT-GFP contient le gène codant la GFP inséré au niveau du site *Bam*HI.



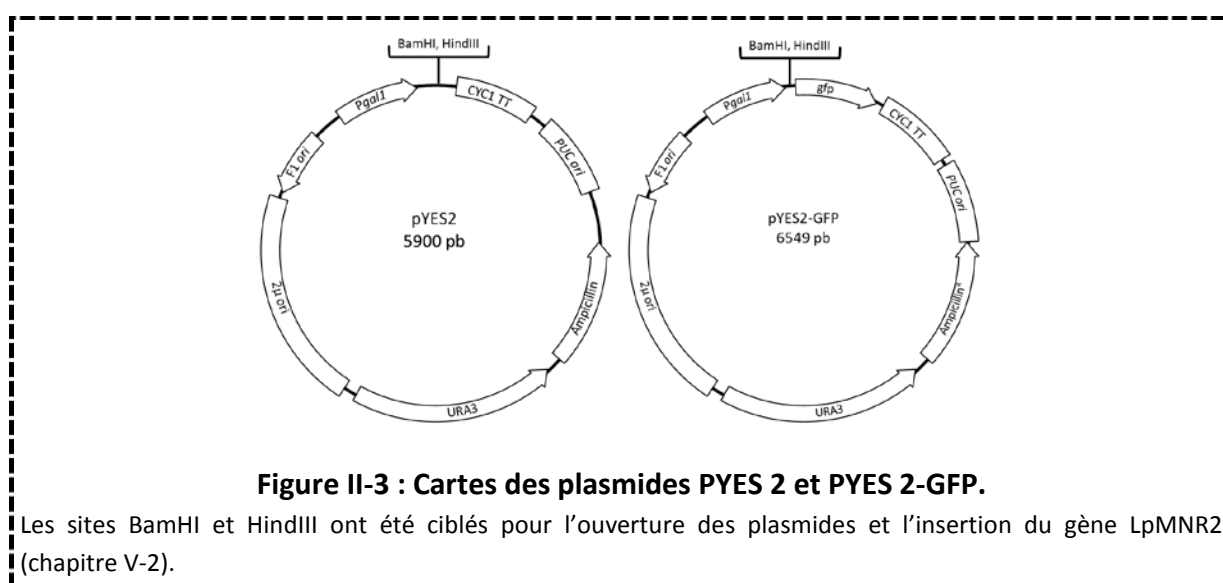
**Figure II-2 : Carte du plasmide pFAT-GFP (d'après Fitzgerald *et al.* 2003).**

La région grisée représente l'ADN de transfert (ADN-T) délimité par les bordures LB et RB.

### 2.2.3. Les plasmides PYES2 et PYES2-GFP

Les plasmides pYES2 (5900 pb) (Invitrogen) et pYES2-GFP (6549 pb) (Blaudez *et al.* 2003) sont utilisés comme vecteurs navettes entre *E. coli* et *S. cerevisiae*. Ils portent un gène de résistance à l'ampicilline et le marqueur d'auxotrophie *URA3*. Le promoteur situé en amont du multisite de clonage est *pgal1*, induit par le galactose et réprimé par le glucose. Deux origines de réplication sont présentes sur ce plasmide : pUC ori à destination des bactéries et  $2\mu$  à destination des levures (**Figure II-3**).

Le plasmide pYES2-GFP est issu du plasmide pYES2 et contient le gène *GFP* codant la « *green fluorescent protein* » inséré au niveau du site de restriction *XbaI*. Ces deux plasmides sont utilisés dans le chapitre V-2 dans le but de cloner le gène *LpMNR2* et de l'exprimer dans la levure.



### 2.3. Matériel végétal utilisé

Des plantes ligneuses et herbacées ont été sélectionnées afin de tester l'étendue du spectre d'hôtes des DSE. Les effets de ces souches fongiques ont été mesurés sur différents paramètres de la plante hôte associée (biomasse, paramètres physiologiques) (**Figure II-5**). Les chapitres faisant référence à ces expérimentations sont les suivants : III-1 et IV. Les cultures des plantes étudiées ont été réalisées à partir de graines ou de vitroplants.

#### 2.3.1. Les graines

Des graines de bouleau (*Betula pendula* Roth), d'eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill), de ray-grass (*Lolium perenne* L.) et de tabac (*Nicotiana tabacum* L.) ont été utilisées dans cette étude. Elles sont désinfectées avant le semis :

- Les graines de bouleau, d'eucalyptus et de ray-grass ont été désinfectées par une première étape d'incubation dans de l'éthanol à 70% (v/v) pendant 5 min. Elles ont ensuite été immergées pendant 20 min dans du NaOCl à 5% (v/v), puis rincées soigneusement à l'eau distillée stérile.

- Les graines de tabac ont été désinfectées par voie gazeuse. Elles ont été placées durant 4h dans une enceinte hermétique en présence d'une atmosphère gazeuse issue d'une solution contenant du NaOCl 9% (v/v) et de l'acide chlorhydrique à 0,23% (v/v).

### 2.3.2. Les vitroplants de peuplier

Les peupliers utilisés dans ce manuscrit sont des vitroplants issus du clone 717-1B4 (*Populus tremula* x *P. alba*). Cette technique de culture permet l'obtention de plants aseptisés de taille homogène. Les plants sont cultivés sur un milieu Murashige et Skoog (MS) modifié dont la composition est détaillée dans le **Tableau II-6**, et leur bouturage est assuré en conditions stériles toutes les six semaines.

Pour les expériences en conditions non stériles, les plants sont acclimatés dès qu'ils atteignent un âge de trois semaines (*i.e.* lors de l'apparition de deux feuilles et des premières racines). La phase d'acclimatation se déroule en deux temps. Les plants sont tout d'abord transplantés dans un mélange de terreau/perlite (50/50%) et sont conservés dans une enceinte hermétique permettant de créer une hygrométrie très élevée. Après deux semaines d'incubation, les plantules sont progressivement acclimatées à l'atmosphère ambiante. Les plants sont alors utilisables pour les expériences en pots.

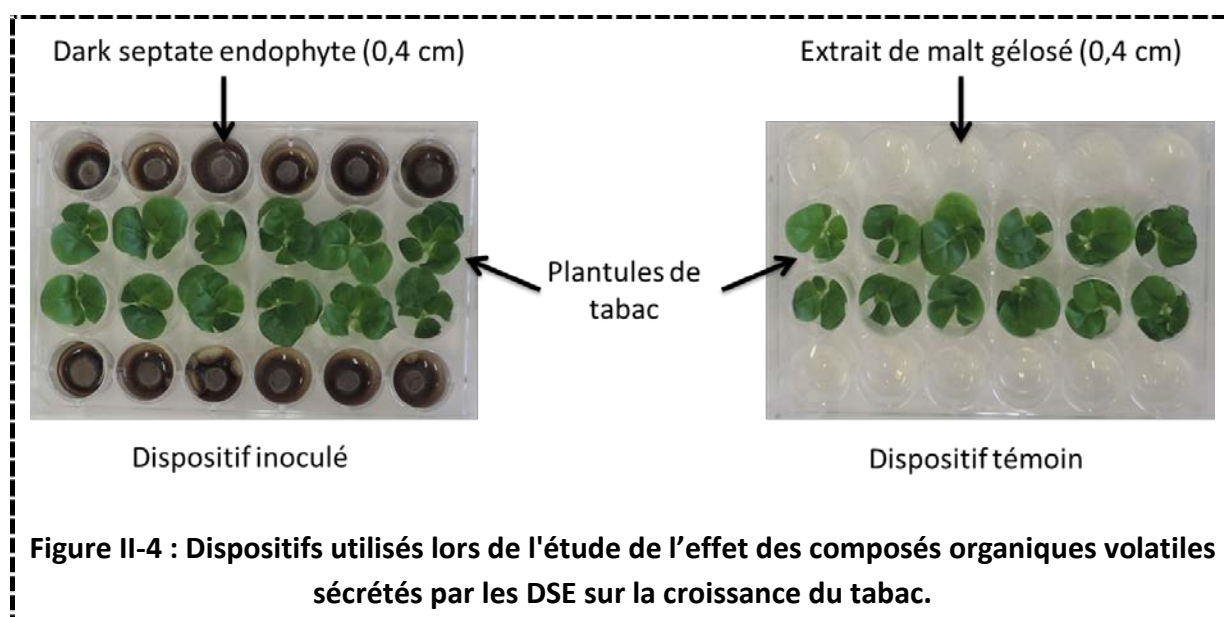
## 2.4. Culture des souches fongiques en présence de plantes

### 2.4.1. En condition *in vitro*

L'effet des molécules organiques volatiles (COV) (sécrétées par les DSE) sur la croissance des plantes a été évalué en utilisant le protocole de Paul et Park (2013). Des microplaques stériles de 24 puits ont été utilisées pour cette expérience. Le design expérimental est présenté par la **Figure II-4**. Un millilitre de milieu MS modifié (**Tableau II-6**) a été coulé dans les chacun des douze puits centraux. Puis, des plantules de tabac préalablement désinfectées ont été déposées. Les douze puits restants ont été remplis avec 1 ml de MEA et inoculés (dispositifs inoculés) ou non (dispositifs témoins) par des implants fongiques de 0,4 cm de diamètre (un implant par puits). Les dispositifs témoins ont reçu des implants gélosés de MEA. Les dispositifs ont été scellés hermétiquement et incubés un mois en chambre de culture avec les conditions suivantes de luminosité et de température: 14 h de jour à 23°C et 10 h d'obscurité à 18°C, intensité lumineuse de 660  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . Lors de la récolte, la masse fraîche des parties aériennes des plants inoculés est comparée à celles des plants témoins.

**Tableau II-6 : Composition du milieu Murashige et Skoog (d'après Murashige et Skoog 1962)**

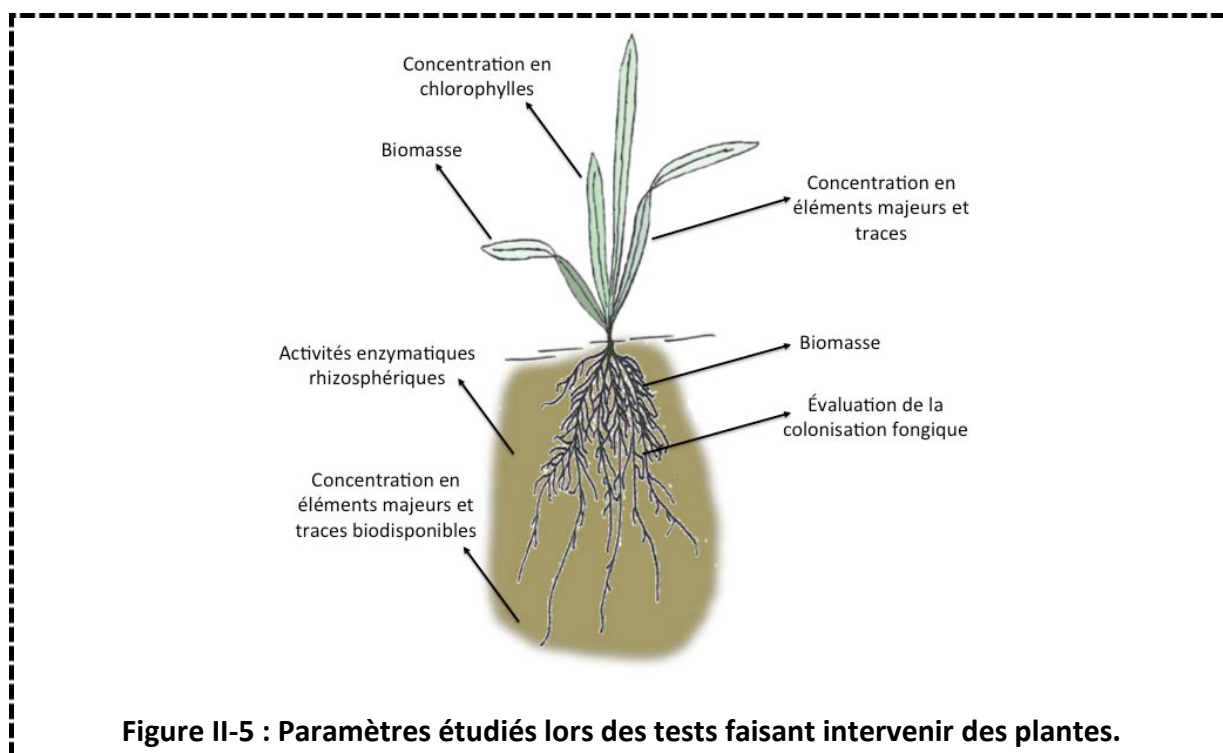
| Composés                                                                               | Concentration finale |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Solution de macroéléments 10 X (M0654, Sigma)                                          | 50 ml/l              |
| Solution de microéléments 10 X (M0529, Sigma)                                          | 100 ml/l             |
| Saccharose                                                                             | 20 g/l               |
| Ajuster le pH à 5,9                                                                    |                      |
| Agar                                                                                   | 7 g/l                |
| Autoclaver 20 min à 120°C                                                              |                      |
| Les composés suivants sont filtrés à 0,2 µm et ajoutés après stérilisation du milieu : |                      |
| Myoinositol                                                                            | 100 mg/l             |
| L-glutamine                                                                            | 200 mg/l             |
| Biotine                                                                                | 0,5 mg/l             |
| Panthocyanate de calcium                                                               | 1 mg/l               |
| L-cystéine chlorohydrate                                                               | 1 mg/l               |
| Acide nicotinique                                                                      | 1 mg/l               |
| Pyridoxine-HCl                                                                         | 1 mg/l               |



#### 2.4.2. Test de colonisation en milieu contrôlé

L'effet des champignons DSE a été évalué sur le peuplier, le bouleau, le ray-grass et l'eucalyptus, tandis que celui de la souche endomycorhizienne a été évalué sur le ray-grass. Pour ce faire, 10% (v/v) d'un inoculum perlite (§ 3.1.2) ont été mélangés soit (i) à 90% (v/v) de perlite stérilisée, soit (ii) à 90% (v/v) de sol stérilisé.

Selon les plantes une culture allant de deux semaines à deux mois a été menée avant que les paramètres présentés dans la **Figure II-5** ne soient mesurés.



Les biomasses fraîches (MF) et sèches (MS) sont déterminées par pesée avant et après passage à l'étuve pendant une nuit à 50°C.

### 3. Méthodes et analyses

#### 3.1. Méthodes microbiologiques

##### 3.1.1. Milieux de culture pour les expérimentations réalisées en conditions *in vitro*.

Afin de permettre le développement de l'ensemble des souches fongiques, trois milieux de culture ont été utilisés : le milieu malt (MEA), le milieu Pachlewski (Pachlewski et Pachlewska 1974) et le milieu minimum M9 (**Tableau II-3**). Suivant l'objectif poursuivi lors des différentes expériences menées, plusieurs composés ont été additionnés à ces milieux : (i) des ETM en vue de tester la tolérance des souches au stress métallique (Chapitre III-1 et V), (ii) des antibiotiques en vue de sélectionner des cellules/colonies ayant intégré des gènes de résistance (Chapitre V) ou (iii) des inhibiteurs permettant l'identification de métabolismes particuliers (Chapitre V). Les détails concernant ces additifs sont renseignés dans les parties « *Materials and methods* » associées à chacun de ces chapitres.

##### 3.1.2. Préparation des inocula pour les expériences *in planta*

Dans les chapitres III-1 et IV, l'effet de l'inoculation de souches fongiques sur le développement du peuplier, du bouleau, de l'eucalyptus et du ray-grass a été évalué.

L'inoculum endomycorhizien a été fourni par la société Agronutrition<sup>15</sup> sous formes d'une suspension de spores. Concernant les souches DSE, un protocole de préparation de l'inoculum fongique a été adapté de celui décrit par Likar et Regvar (2013). L'inoculum est préparé dans des pots en verre de 500 ml dans lesquels 250 ml de perlite sont mélangés à 250 ml de milieu MEA. L'ensemble est stérilisé pendant 20 minutes à 115°C. Après refroidissement des pots, sept implants gélosés fongiques de 0,8 cm de diamètre sont mélangés à la perlite. Les pots sont incubés à l'obscurité durant deux semaines à 24°C et sont agités tous les deux jours afin d'assurer un développement homogène de l'inoculum.

### **3.1.3. Isolement de souches fongiques à partir de racines et identification**

L'isolement des souches fongiques colonisant les racines des plantes a été réalisé en suivant le protocole détaillé par Lacercat-Didier *et al.* (2016) (**Annexe 1**). Les racines sont soigneusement lavées à l'eau afin de retirer les particules de sol. Elles sont ensuite désinfectées dans de l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pendant trente secondes, puis rincées avec de l'eau stérile. Les échantillons sont ensuite découpés en fragments de 1 à 3 cm, et les plus fins sont déposés sur un milieu MEA supplémenté avec 100 mg/l d'ampicilline et 100 mg/l de chloramphénicol (afin d'éviter les développements bactériens). Les boîtes sont incubées à 24°C et à l'obscurité, l'apparition des isolats est suivie hebdomadairement. Chaque nouvel isolat est alors repiqué sur milieu MEA avant d'être identifié au niveau moléculaire.

#### **3.1.3.1. L'agrotransformation des souches fongiques par *A. tumefaciens***

L'agrotransformation d'un champignon est une technique se résumant à l'insertion de l'ADN de transfert (ADN-T), porté par un plasmide contenu dans *A. tumefaciens*, dans l'ADN de la cellule fongique. Cette insertion est aléatoire et permet d'obtenir des mutants d'insertion pouvant potentiellement perdre une fonction donnée (gène interrompu par exemple).

#### **3.1.3.2. Induction des bactéries et agrotransformation des mycélia**

Deux organismes sont nécessaires à l'agrotransformation : *A. tumefaciens* et le champignon à transformer. Des implants de tailles homogènes (2 mm<sup>2</sup>) de champignons sont disposés dans des boîtes de Pétri contenant un milieu MEA ou Pachlewski recouvert d'une membrane de cellophane préalablement stérilisée. Les membranes ont été traitées avant autoclavage en les incubant pendant 10 min dans une solution bouillante d'EDTA 10mM. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 24°C jusqu'à obtenir des colonies de 4-5 mm de diamètre (2-3 jours) (**Figure II-6 ①**).

Des pré-cultures d'*A. tumefaciens* EHA101 sont agitées à 150 rpm pendant une nuit à 28°C dans un milieu LB sélectif (spectinomycine à 100 µg/mL). Elles sont ensuite

---

<sup>15</sup> <http://www.agronutrition.com/>

centrifugées 5 min à 5000 rpm et le culot est suspendu avec du milieu LB additionné d'acétosyringone (40 µg/mL) afin d'obtenir une  $DO_{600nm}$  proche de 0,1. Ces nouvelles cultures sont ensuite incubées jusqu'à atteindre une  $DO_{600nm} = 0,8$  (**Figure II-6 ②**). L'acétosyringone est un composé phénolique permettant d'activer les gènes de virulence de la bactérie et qui vont conduire à la réplication et au transfert final de l'ADN-T dans la cellule fongique.

Les colonies fongiques sont ensuite transférées sur milieu MEA ou Pachlewski additionné d'acétosyringone à une concentration finale de 0,2 µM. Une goutte de 50 µL de la culture bactérienne est ensuite déposée sur chaque colonie fongique. Les boîtes sont finalement incubées pendant quatre jours à 23°C (**Figure II-6 ③**).

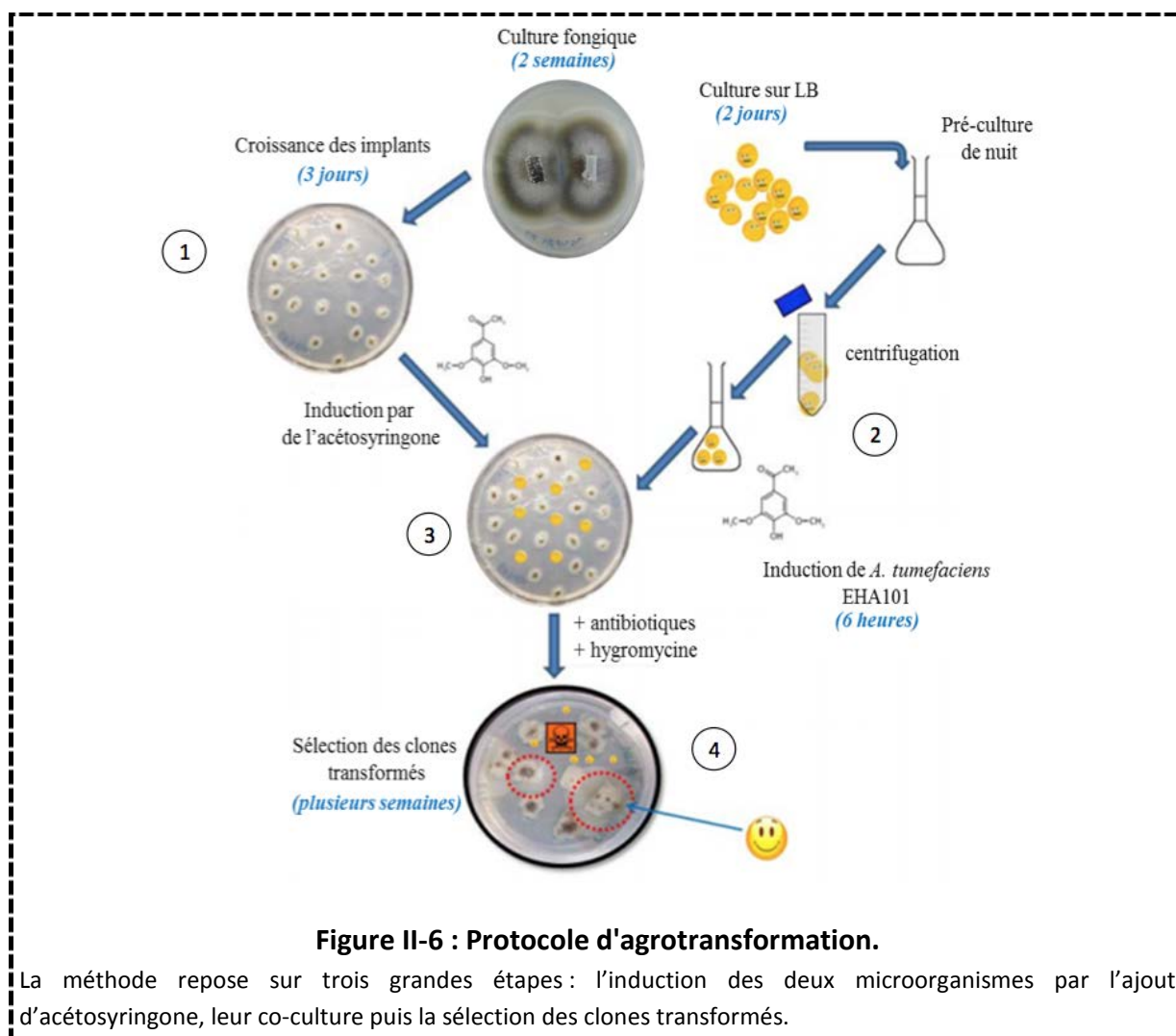
### **3.1.3.3. Sélection et vérification des transformants**

Après la phase de co-culture, les colonies fongiques sont transférées sur milieu MEA ou Pachlewski additionné d'hygromycine (250 µg/ml), de gentamycine (250 µg/ml), d'ampicilline (100 µg/ml) et de tétracycline (12,5 µg/ml). L'hygromycine permet la sélection des transformants ayant intégré l'ADN-T dans leur génome, la tétracycline, la gentamycine et l'ampicilline permettent, quant à elles, l'arrêt de croissance d'*A. tumefaciens* (**Figure II-6 ④**). Les boîtes sont stockées une nuit à 4°C puis incubées à 24°C pendant 5 semaines. La reprise de croissance des implants dénote l'apparition de transformants. Les clones obtenus sont alors repiqués sur milieu MEA ou Pachlewski.

Les amplifications par PCR des gènes *HPH* et *GFP*, localisés sur l'ADN-T, sont réalisées afin de vérifier la présence de l'ADN-T, dans son intégralité, dans l'ADN fongique. Une amplification de la région SpectR est également réalisée afin de s'assurer de l'absence d'*A. tumefaciens* dans les colonies des mutants isolés.

### **3.1.3.4. Stabilité mitotique**

Afin de s'assurer que l'ADN-T inséré est génétiquement stable au cours des générations, le test suivant est réalisé. Des mutants des différentes souches transformées ont été choisis de façon aléatoire. Ces derniers ont dans un premier temps été cultivés sur milieu MEA ou Packlewski, puis repiqués sur ce même milieu additionné d'hygromycine à une concentration finale de 250 µg/mL. Ce processus de culture en alternance en présence ou non du marqueur de sélection est répété six fois.



## 3.2. Analyses chimiques

### 3.2.1. Analyses des composés d'origine fongique

#### 3.2.1.1. Analyse des composés organiques volatiles par SPME GCMS

Les composés organiques volatiles (COV) émis par les champignons sont d'abord extraits par microextraction sur phase solide (SPME) puis sont analysés grâce à un chromatographe en phase gazeuse couplé à une détection par spectrométrie de masse, selon une adaptation du protocole de Demyttenaere *et al.* (2004). A cette fin, 7 ml de milieu MEA sont placés dans un flacon de 20 ml, puis inoculés avec un implant fongique de 0,8 cm de diamètre. L'ensemble est fermé hermétiquement et incubé pendant un mois. Les témoins consistent en des flacons dans lesquels des implants stériles de milieu MEA ont été ajoutés sur le milieu de culture. Avant extraction des COV, l'échantillon est incubé à 25°C pendant une heure afin de faciliter la « mise en solution » des composés dans le flacon. L'extraction est ensuite faite en plongeant une fibre de 100 µm munie d'un revêtement de polydiméthylsiloxane (SUPELCO) pendant 15 min à 25°C. Lors de cette période, les analytes se partagent entre l'échantillon et la fibre. Une fois l'extraction terminée, la fibre est retirée

de son aiguille et est désorbée dans l'injecteur de la GC-MS pendant 2 min à 250°C. L'analyse est ensuite effectuée par GC-MS, en utilisant l'He comme gaz vecteur à un débit constant de 1 ml/min. La colonne capillaire est une HP-5 MS (Agilent) : 30 m × 250 µm ID., 0.5-µm. Le chromatographe (6890 GC Plus, Agilent) est couplé à un détecteur par spectrométrie de masse (5973 MSD, Agilent). L'analyse qualitative des composés est effectuée en mode SCAN et en mode SPITLESS par le balayage des fragments m/z compris entre 50 à 300 avec un pas de 150 et une ionisation de 70 eV.

Les métabolites sont ensuite identifiés individuellement, en comparant leur spectre de masse et leur indice de rétention (Kovats) avec la base de données de l'Institut National des Standards et Technologies des États-Unis<sup>16</sup> (NIST).

### **3.2.1.2. Analyse de la teneur en composés indoliques libérés dans le milieu de culture**

La teneur en composés indoliques (majoritairement sous forme d'auxine (AIA)) secrétés dans le milieu de culture par les souches fongiques est mesurée par la méthode de Salkowski (1885). Après deux semaines de croissance dans du milieu M9 liquide, la culture est centrifugée à 4500 rpm pendant 5 min. Le surnageant est récupéré et 1 ml de ce milieu est mélangé à 3 ml de réactif de Salkowski (12 g/l de FeCl<sub>3</sub>; 7,9 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Salkowski 1885). Une incubation de 20 min est réalisée à l'obscurité afin de permettre un changement de couleur proportionnel à la concentration en composés indoliques. Le dosage colorimétrique est effectué par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 540 nm. Les valeurs sont ensuite comparées à celles d'une gamme étalon préparée en effectuant une dilution d'AIA commerciale (Sigma Aldrich, I3750).

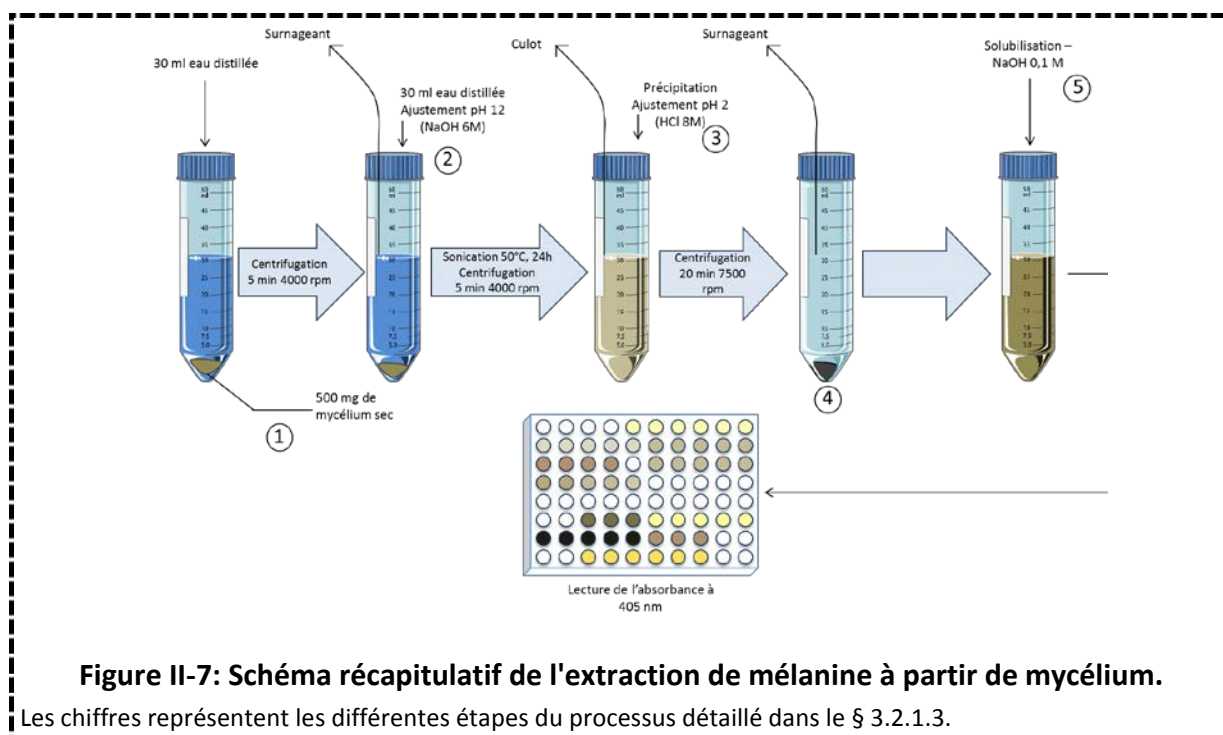
### **3.2.1.3. Analyse de la teneur en mélanine des souches fongiques**

Afin de déterminer quelle est la teneur en mélanine dans le mycélium d'une souche donnée, cette dernière est extraite des hyphes en adaptant le protocole de Zou *et al.* (2010). Un demi-gramme de mycélium, sec et broyé, est lavé à l'eau distillée (**Figure II-7 ①**), puis il est remis en suspension dans 30 ml d'eau dont le pH est ajusté à 12. L'échantillon est soumis à une sonication de 40 Hz, à 50°C, pendant une journée (**Figure II-7 ②**). Cette seconde étape vise à déstructurer les cellules et permettre la libération de la mélanine dans le milieu. L'ensemble est ensuite centrifugé à 4000 rpm pendant 5 min puis le surnageant est conservé. Ce dernier est ajusté à pH 2 afin de précipiter sélectivement la mélanine (**Figure II-7 ③**). Cette dernière est ainsi récupérée après une centrifugation de 20 min à 7500 rpm (**Figure II-7 ④**).

---

<sup>16</sup> <https://www.nist.gov/>

Le dosage de ce pigment est réalisé en le resolubilisant dans une solution de NaOH 0,1 M. L'absorbance est mesurée à 405 nm et est comparée à celle d'une gamme étalon réalisée à partir de mélanine synthétique (Sigma Aldrich, M8631) (**Figure II-7 ⑤**).



Cette technique de dosage a été utilisée afin d'étudier l'effet de la mélanine sur l'efficacité de l'agrotransformation des DSE (Chapitre V-1) et afin d'étudier le rôle de ce pigment dans la tolérance aux ETM de ces champignons (Chapitre V-3).

### 3.2.2. Analyses chimiques concernant les végétaux

#### 3.2.2.1. Extraction et dosage des chlorophylles

Les concentrations en chlorophylles sont mesurées à partir du protocole détaillé par Ni *et al.* (2009). Les pigments sont extraits à partir de 300 mg de broyat de feuilles fraîches et de 5 ml d'acétone (80% v/v). L'ensemble est ensuite centrifugé, le surnageant est analysé par spectrophotométrie à 645 et à 663 nm. L'étalonnage du spectrophotomètre est réalisé à partir d'acétone (80%). Les teneurs en chlorophylles (mg/g) sont obtenues via l'application de l'équation suivante :

$$\text{Chlorophylles}(\text{mg/g}) = \left( \frac{[8,02 * A_{663} + 20,20 * A_{645}] * V}{1000} \right) * M$$

Où V est le volume de l'extrait obtenu après centrifugation et M est la masse de feuilles fraîches utilisées pour le dosage.

Dans un souci de ne pas biaiser les mesures effectuées, toutes les feuilles choisies avaient la même orientation vis à vis de la lumière et avaient le même âge (paramètre évalué en fonction du nombre de nœuds sur la tige pour les peupliers et les bouleaux).

### **3.2.2.2. Analyses des teneurs en azote des tissus végétaux par analyseur CHNS**

L'azote total est mesuré à partir de 1 mg de matériel végétal finement broyé. La poudre est introduite dans une capsule d'étain qui est ensuite chauffée à 940°C dans un analyseur CHNS (FlashEA 1112, ThermoFisher Scientific). Un étalon est réalisé à partir d'une référence certifiée dont la composition en azote est parfaitement connue (feuilles de bouleau, B2166, Elemental microanalysis).

### **3.2.3. Analyses des concentrations en éléments minéraux des végétaux et des souches fongiques**

La mesure des concentrations en éléments majeurs (*e.g.* P, S, K) et traces (*e.g.* Cd, Zn, As) a été réalisée à partir de 200 mg de matière sèche (*e.g.* mycélium, matériel végétal) finement broyée. Les poudres sont digérées dans 4 ml de HNO<sub>3</sub> et 2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans un micro-onde (MARS 5) pendant 15 min, à 170°C et à 20 bars. Le mélange est ensuite refroidi pendant 30 min. Les solutions sont alors analysées par spectrométrie d'émission atomique à source de plasma à couplage Inductif (ICP-AES). Un calibrage spécifique est réalisé en utilisant des solutions étalons pour chacun des composés à doser. Ces solutions sont préparées par dilution dans la même matrice chimique que celle des échantillons. Deux standards sont utilisés afin de vérifier la qualité des mesures : du tabac (INCT OBTL5, ichtj, Pologne) et du ray-grass (CD281 O204, ERM®, Belgique).

### **3.2.4. Mesure des activités enzymatiques du sol**

L'activité de deux enzymes hydrolytiques a été étudiée dans le cadre de cette thèse pour représenter l'activité globale de la rhizosphère et le cycle du phosphore. L'activité globale a été évaluée par la mesure de l'hydrolyse de la fluorescéine diacétate (FDA). Ce substrat peut être hydrolysé par un grand nombre d'enzymes comme les protéases, les estérases et les lipases, et sa dégradation permet d'avoir une mesure des activités enzymatiques globales dans les sols (Green *et al.* 2006). La phosphatase alcaline (cycle P) permet d'obtenir des informations de l'activité microbienne liée au cycle du phosphore (Marx *et al.* 2001). La mesure des activités s'effectue de la façon suivante : les sols utilisés sont conservés à 4°C. Avant chaque mesure, des suspensions de sols sont réalisées : 2,5 g de sol frais sont resuspendus dans 50 mL du tampon approprié à chaque enzyme puis placés dans un agitateur orbital (Stuart Scientific SI50) à 250 rpm pendant 10

min. Ils sont ensuite soniqués pendant 2 min à 40 Hz (la sonication permet de solubiliser les enzymes fixées au complexe argilo-humique ou simplement à la fraction minérale du sol). Les tampons utilisés pour les mesures des activités d'hydrolyse de la FDA et de la phosphatase alcaline sont respectivement un tampon phosphate (60 mM) ajusté à pH 7,6 et un tampon phosphate (100 mM) ajusté à pH 7,5.

Neuf réplicats biologiques et trois réplicats de mesures sont ensuite réalisés : 50 µl de la suspension de sol sont d'abord placés dans des microplaques de 96 puits (Greiner bio-one, Ref 655076). Puis, la solution substrat de la FDA (fluorescéine [3',6'-diacétyl fluorescéine], Sigma Aldrich) ou de la phosphatase alcaline (4-méthylumbelliferyl phosphate, Sigma Aldrich) est ajoutée pour atteindre un volume final de 200 µl. Les microplaques sont ensuite placées à 28°C à l'obscurité. Les mesures de fluorescence sont réalisées avec un spectrophotomètre (Safas Monaco Xenius SP2000 XC) toutes les heures, pendant douze heures. Les longueurs d'ondes utilisées pour les émissions et pour l'excitation du signal sont respectivement de 523 nm / 490 nm pour la FDA et de 450 nm / 330 nm pour la phosphatase alcaline. Des témoins ont été préparés sans sol afin d'évaluer la fluorescence non induite par le contact avec le sol. L'activité est calculée d'après la pente obtenue, en phase linéaire de la courbe de réponse (concentration de fluorochrome = f(temps)) et est comparée à celle obtenue à partir d'une gamme étalon réalisée avec de la fluorescéine (F2456, Sigma Aldrich) pour l'activité FDA et avec du 4-méthylumbellifère (M1381, Sigma Aldrich) pour l'activité phosphatase alcaline.

### **3.3. Analyses de biologie moléculaire : extractions et analyses des acides nucléiques**

#### **3.3.1. Extraction de l'ADN génomique par l'utilisation de kits**

L'ADN génomique fongique est extrait à partir de 100 mg de mycélium ou de racines en utilisant le kit DNeasy Plant (Qiagen®) et en suivant le protocole du fabricant. Brièvement, l'échantillon est tout d'abord broyé à l'azote liquide afin de faciliter l'extraction de l'ADN. Une étape de lyse chimique et de précipitation s'ensuit, puis l'ADN est fixé sur une colonne de silice. Ce dernier est ensuite purifié par deux étapes de lavage avec un tampon contenant de l'éthanol, puis il est élué par une solution de 10 mM TrisHCl, 0,5 mM EDTA (pH 9). L'efficacité des extractions d'ADN génomique a été vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose (1%) dans du tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE) 1% (m/v). L'ADN doit apparaître sous forme d'une bande large, de taille comprise entre 20 et 25 kb. Après coloration du gel au GelRed, l'ADN a été visualisé sous UV au transilluminateur GelDoc (Biorad). La concentration et l'absorbance des extraits à 260 et 280 nm ont été mesurées à partir de 3 µl, au spectrophotomètre (UV1800, Shimadzu), à l'aide d'un module Tray cell. La pureté des acides nucléiques a été estimée en calculant le ratio A260/A280 (révélateur de la contamination en protéines) qui doit être compris entre 1,8 et 2,0. Si ce rapport est supérieur à 1,8, la préparation est considérée comme exempte de protéines.

### 3.3.2. Purification de l'ADN

L'ADN peut être purifié afin d'éliminer des composés inhibiteurs (enzymes, sels) pour la suite des manipulations. Le kit Nucleospin Gel and PCR clean up (Macherey-Nagel) permet de purifier l'ADN génomique ou des produits PCR directement ou à partir de gels 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 15 µl de tampon d'élution sans DNase.

### 3.3.3. Amplification de l'ADN par PCR

Au cours de cette thèse, deux grands types de PCR ont été utilisés. La PCR dite « classique » qui permet d'amplifier un fragment défini et la TAIL-PCR qui repose sur trois étapes d'amplification et qui permet d'identifier une zone précise (l'ADN-T) dans l'ADNg fongique et d'identifier la région flanquante à cet ADN-T. Toutefois l'ensemble de ces PCR a été réalisé avec le même thermocycleur : My iQ (Biorad) et les amplifications ont été vérifiées par migration sur un gel d'agarose à 1%.

Suivant la taille des amplicons, des propriétés des amorces et du type de PCR réalisée, deux enzymes ont été utilisées : la Taq polymérase (Thermo Fisher Scientific) et la Phire II hot start polymérase (Thermo Fisher Scientific). Les conditions d'amplifications et les compositions des mélanges réactionnels sont données dans les **Tableau II-7** et **Tableau II-8**. La spécificité de la réaction PCR repose sur la spécificité de l'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 (16 nucléotides); une absence de complémentarité entre les amorces; un Tm théorique proche pour que la température d'hybridation choisie soit adéquate pour les 2 amorces. Le Tm est la température de fusion qui correspond à la température pour laquelle deux brins d'ADN sont associés par 50 % de leurs séquences complémentaires. La formule permettant de calculer la valeur du Tm est la suivante:  $Tm = 2(A+T) + 2(G+C)$ . Les amorces nucléotidiques utilisées dans ce manuscrit sont répertoriées dans le **Tableau II-12**.

**Tableau II-7 : Conditions de PCR pour les amplifications utilisant la Phire II polymérase.**

| Composition du milieu réactionnel |          | Conditions d'amplification |        |                                        |        |
|-----------------------------------|----------|----------------------------|--------|----------------------------------------|--------|
| Composés                          | Quantité | Etapes                     | Durée  | Température                            | cycles |
| Eau stérile                       | 16 µl    | Dénaturation initiale      | 45 sec | 98°C                                   | 1      |
| Tampon 5X                         | 5 µl     |                            |        |                                        |        |
| dNTP (10 mM)                      | 0,5 µl   | Dénaturation               | 5 sec  | 98°C                                   | 40     |
| Amorce F+R (10 µM)                | 0,5 µl   | Hybridation                | 5 sec  | Variable suivant les couples d'amorces |        |
| Phire II polymérase               | 0,5 µl   | Élongation                 | 10 sec | 72°C                                   |        |
| ADN (20 ng)                       | 2        |                            |        |                                        |        |
|                                   |          | Élongation finale          | 1 min  | 72°C                                   | 1      |

F+R désignent respectivement les amorces sens et antisens ; Le MgCl<sub>2</sub> nécessaire à l'enzyme polymérase est inclut dans le tampon.

**Tableau II-8 : Condition PCR pour les amplifications réalisées avec la Taq polymerase.**

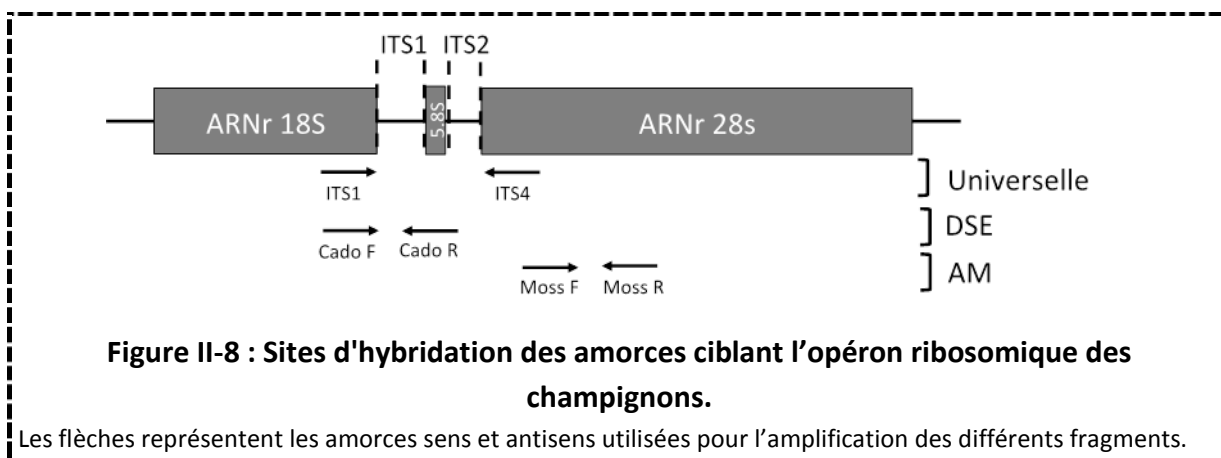
| Composition du milieu réactionnel |          | Conditions d'amplification |        |                                        |        |
|-----------------------------------|----------|----------------------------|--------|----------------------------------------|--------|
| Composés                          | Quantité | Etapes                     | Durée  | Température                            | Cycles |
| Tampon 10 X                       | 3 µl     | Dénaturation initiale      | 3 min  | 95°C                                   | 1      |
| dNTP (10 mM)                      | 0,3 µl   |                            |        |                                        |        |
| Amorces F+R (10 µM)               | 0,6 µl   | Dénaturation               | 30 sec | 95°C                                   | 35     |
| MgCl <sub>2</sub> (25mM)          | 1,8 µl   | Hybridation                | 30 sec | Variable suivant les couples d'amorces |        |
| Taq polymérase                    | 0,3 µl   | Élongation                 | 2 min  | 72°C                                   |        |
| ADN {20 ng}                       | 2 µl     |                            |        |                                        |        |
| Eau stérile                       | 21,1 µl  | Élongation finale          | 7 min  | 72°C                                   | 1      |

F+R désignent respectivement les amorces sens et antisens.

### 3.3.3.1. Les PCR « classiques »

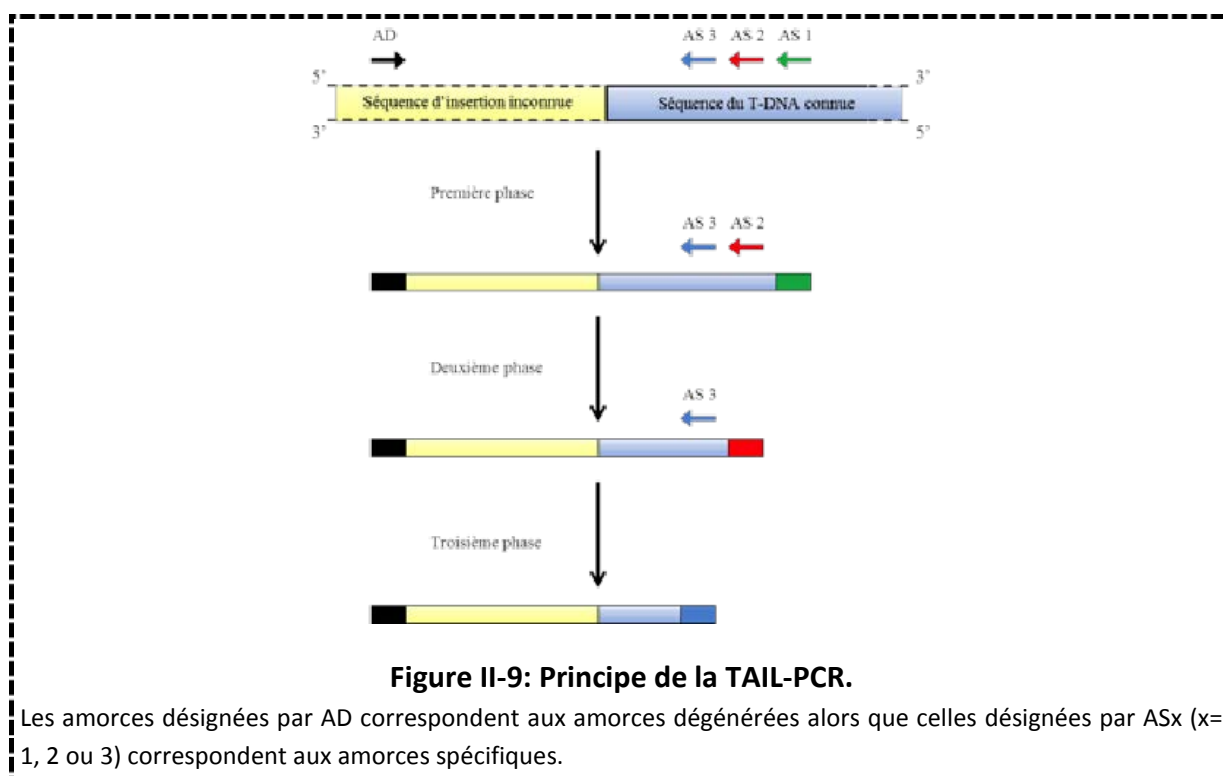
Au cours de ce travail, la PCR « classique » a été utilisée à plusieurs fins, résumées brièvement dans les points suivants :

- L'identification taxonomique des souches fongiques (§ 3.1.3). La région *ITS* de l'ADNg des souches fongiques isolées de racines de plantes se développant sur sites pollués a été amplifiée en utilisant les amorces ITS1 et ITS4 et l'enzyme Taq polymérase.
- L'insertion de l'ADN-T dans l'ADNg fongique a été vérifiée en amplifiant les régions *HPH* et *GFP* de l'ADN-T avec respectivement les amorces HphR / HphF et GfpR / GfpF (Chapitre V) et la Phire II polymérase. En parallèle, une partie de la séquence du gène de résistance à la spectinomycine a été amplifiée dans les mêmes conditions avec les amorces Spect R/ Spect F pour vérifier l'absence de contamination bactérienne dans les cultures fongiques transformées.
- Afin d'identifier le contenu plasmidique d'une colonie bactérienne, une méthode rapide d'analyse consiste à effectuer la réaction de PCR sur une colonie sans extraction d'ADN au préalable. La colonie est prélevée à l'aide d'un cône de micropipette stérile. Afin de permettre une lyse cellulaire efficace, l'étape de dénaturation initiale est portée à 10 min. Les PCR sur colonies ont été réalisées en utilisant les couples d'amorces M13-40 / M13-26 ou P2R / P2F et en utilisant la Taq polymérase).
- Les amplifications du gène *LpMNR2* à partir de l'ADNg de la souche *Leptodontidium* sp. Me07 ont été réalisées à partir des amorces MNR2f/MNR2r CorR en utilisant la polymérase Phusion haute-fidélité. Cette enzyme possède les mêmes conditions d'amplification et les mêmes proportions de mélanges réactionnels que la Phire II polymérase. Cependant, elle a la particularité de posséder une activité « *proofreading* » qui assure une répllication fidèle et de haute qualité.



### 3.3.3.2. PCR asymétrique thermique entrelacée (TAIL-PCR)

La TAIL-PCR est une technique d'amplification de type hémi-spécifique utilisant des amorces spécifiques (AS dans la **Figure II-9** et le **Tableau II-12**) à une séquence connue et des amorces dégénérées (AD dans la **Figure II-9** et le **Tableau II-12**) qui s'hybrident sur des séquences à identifier. Cette technique permet de localiser le lieu d'insertion d'un transgène (ici un ADN-T) dans le génome et d'identifier le gène potentiellement muté. Elle se déroule en trois phases composées de différents cycles d'amplification (**Figure II-9** et **Tableau II-10**). Ces derniers diffèrent de par leur température d'hybridation qui contrôle l'amplification de produits spécifiques ou non spécifiques.



### 3.3.4. Amplification de l'ADN par PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR)

La PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) a été utilisée au cours du travail de thèse afin de quantifier les proportions de champignons endomycorhiziens (AM) et de DSE colonisant les différents échantillons de racines (Chapitre IV-2). La qRT-PCR permet de comparer deux échantillons : un échantillon de référence dont le nombre de copies de gène est connu, et l'échantillon de l'expérimentation dont on cherche à connaître la quantité d'ADN. A cette fin, la technique « Taqman » a été employée. Cette méthode utilise une sonde spécifique oligonucléotidique marquée par deux fluorochromes : le quencher et le reporter. Lors de l'étape d'hybridation, l'émission du reporter est atténué par la proximité du quencher. Cependant lors de l'élongation, l'activité exonucléase 5'→3' de la Taq polymérase va entraîner une dégradation de la sonde, séparant le quencher du reporter. Cette séparation entraîne la libération de la fluorescence. L'augmentation du signal

correspondant à la composante du fluorochrome reporter est proportionnelle au nombre de copies polymérisées à chaque cycle de la PCR.

Les amorces et la sonde AM ont été obtenues à partir de Thonar *et al.* (2012) et amplifient une portion de 122 paires de bases située dans la région 28S (**Figure II-8**) et sont désignées par moss-R, moss-F et moss-P (avec R=reverse, F=forward et P=sonde) dans le **Tableau II-12**. A l'inverse, les amorces spécifiques du DSE étudié (*Cadophora* sp.) ont été conçues par nos soins lors de cette thèse. La région ITS a été choisie comme site d'hybridation pour les amorces. L'alignement de séquences de *Cadophora* sp. obtenues à partir de la base de données du NCBI a permis d'identifier les zones conservées permettant la conception des amorces sens (Cado-R) et antisens (Cado-F) ainsi que de la sonde fluorescente (Cado-P). Ainsi les amorces permettent l'amplification d'une zone de 78 paires de bases dans la région ITS de l'ADNg (**Figure II-8**). La fiabilité des sondes et leur précision ont été évaluées en effectuant des tests de spécificités croisées avec différentes souches de DSE et d'AM ainsi que différentes plantes (*e.g.* poireau, ray-grass, peuplier).

Le kit iTaq™ universal probes supermix kit (Biorad) et un thermocycleur CFX96™ (Biorad) associé à son logiciel de traitement de données (Biorad CFX Manager, version 2.0) ont été utilisés pour la réalisation de l'ensemble des réactions de qRT-PCR. Le mélange réactionnel ainsi que le programme utilisé pour les qRT-PCR sont résumés dans le **Tableau II-9**. Les expériences sont menées en simplex, *i.e.* chaque PCR ne comporte qu'un seul couple d'amorces.

**Tableau II-9 : Conditions de qRT-PCR pour l'amplification des régions ITS (DSE) et 28S (AM)**

| Composition du milieu réactionnel |               | Conditions d'amplification                                     |        |             |       |
|-----------------------------------|---------------|----------------------------------------------------------------|--------|-------------|-------|
| Composés                          | Quantité      | Étapes                                                         | Durée  | Température | Cycle |
| Tampon iTaq Supermix              | 10 µl         | Dénaturation initiale                                          | 3 min  | 94 °C       | 1     |
| Sonde (10 µM)                     | 0,4 µl        | Dénaturation<br>Hybridation<br>Élongation<br>Élongation finale | 15 sec | 94°C        | 40    |
| ADN                               | 1,3 µl (1 ng) |                                                                | 20 sec | 60°C        |       |
| Amorce R + F (10 µM)              | 1,2 µl        |                                                                | 20 sec | 72°C        |       |
| Eau stérile                       | 5,2 µl        |                                                                | 2 min  | 72°C        |       |
| Albumine de sérum bovin (BSA)     | 0,4 µl        |                                                                |        |             |       |
| DMSO                              | 0,2 µl        |                                                                |        |             |       |
| T4 polymérase                     | 0,08 µl       |                                                                |        |             |       |

F+R désignent respectivement les amorces sens et antisens ; Le tampon contient également le MgCl<sub>2</sub>, les dNTP et l'enzyme polymérase.

**Tableau II-10: Conditions de TAIL-PCR**

| Composition mélange réactionnel |                                             |         | Conditions d'amplification |                                                    |        |
|---------------------------------|---------------------------------------------|---------|----------------------------|----------------------------------------------------|--------|
| Composé                         | Quantité                                    |         | Etape                      | Description                                        | Cycles |
| Phase 1 de la TAIL-PCR          | Eau stérile                                 | 10,4 µl | Dénaturation               | 1 min à 93°C ; 1 min à 95°C                        | 1      |
|                                 | Tampon 10 X                                 | 2 µl    | Forte stringence           | 30 sec à 94°C ; 1 min à 62°C ; 2 min 30 sec à 72°C | 5      |
|                                 | MgCl2 (25mM)                                | 1 µl    | Stringence                 | 2 min 30 à 72°C                                    | 1      |
|                                 | dNTP (10 mM)                                | 0,4 µl  |                            |                                                    |        |
|                                 | ADx (20 µM)                                 | 4 µl    | Forte stringence           | 10 sec à 94°C ; 1 min à 68°C ; 2 min 30 sec à 72°C | 15     |
|                                 | LB1 / RB1 (10 µM)                           | 1 µl    | Forte stringence           | 10 sec à 94°C ; 1 min à 68°C ; 2 min 30 sec à 72°C |        |
|                                 | Taq polymérase (5U/µl)                      | 0,2 µl  | Faible stringence          | 10 sec à 94°C ; 1 min à 44°C ; 2 min 30 sec à 72°C |        |
|                                 | ADN (20 ng µl)                              | 1 µl    | Élongation finale          | 5 min à 72°C                                       | 1      |
| Phase 2 de la TAIL-PCR          | Eau stérile                                 | 10,4 µl | Forte stringence           | 10 sec à 94°C ; 1 min à 64°C ; 2 min 30 sec à 72°C | 12     |
|                                 | Tampon 10 X                                 | 2 µl    | Forte stringence           | 10 sec à 94°C ; 1 min à 64°C ; 2 min 30 sec à 72°C |        |
|                                 | MgCl2 (25mM)                                | 1 µl    | Faible stringence          | 10 sec à 94°C ; 1 min à 44°C ; 2 min 30 sec à 72°C |        |
|                                 | dNTP (10 mM)                                | 0,4 µl  |                            |                                                    |        |
|                                 | AD (20 µM)                                  | 3 µl    | Élongation finale          | 5 min à 72°C                                       |        |
|                                 | LB1 / RB1 (10 µM)                           | 1 µl    |                            |                                                    |        |
|                                 | Taq polymérase (5U/µl)                      | 0,2 µl  |                            |                                                    |        |
|                                 | Produit PCR de la phase 1 (dilution 1 :100) | 2 µl    |                            |                                                    |        |
| Phase 3 de la TAIL-PCR          | Eau stérile                                 | 27 µl   | Faible stringence          | 10 sec à 94°C ; 1 min à 44°C ; 2 min 30 sec à 72°C | 20     |
|                                 | Tampon 10 X                                 | 5 µl    |                            |                                                    |        |
|                                 | MgCl2 (25mM)                                | 2,5 µl  | Élongation finale          | 5 min à 72°C                                       | 1      |
|                                 | dNTP (10 mM)                                | 1 µl    |                            |                                                    |        |
|                                 | ADx (20 µM)                                 | 7,5 µl  |                            |                                                    |        |
|                                 | LB1 / RB1 (10 µM)                           | 2,5 µl  |                            |                                                    |        |
|                                 | Produit PCR de la phase 2 (dilution 1 :100) | 4 µl    |                            |                                                    |        |

### 3.4. Techniques de clonage

Le principe général de la technique de clonage est présenté par la **Figure II-10**. Un insert (séquence ou gène d'intérêt) est intégré dans un vecteur par ligation (**Figure II-10 ②**), dans certains cas une étape préliminaire de préparation du vecteur et/ou de l'insert est nécessaire (**Figure II-10 ①**). Ensuite une transformation de bactéries permet d'intégrer un produit de ligation par cellule bactérienne et d'y multiplier le vecteur (**Figure II-10 ③**). Une PCR sur colonies permet ensuite de vérifier l'insertion du fragment d'intérêt. Enfin, une extraction d'ADN plasmidique permet de récupérer les vecteurs ayant intégré l'insert et les plasmides sont ensuite séquencés.

La technique de clonage a tout d'abord été utilisée lors de l'identification des souches fongiques, pour cela les fragments ITS amplifiés par PCR ont été clonés dans le plasmide pGEM-T puis envoyés à séquencer. Le clonage a également été utilisé dans le but d'étudier le rôle du gène *LpMNR2* dans la tolérance aux ETM. Pour cela le gène *LpMNR2* issu de la souche *Leptodontidium* sp. Me07 a été cloné dans les vecteurs pYES2 et pYES2-GFP.

#### 3.4.1. Préparation du vecteur

Le plasmide pGEM®-T (Promega) utilisé pour le clonage des fragments PCR est fourni dans le kit pGEM-T Vector Systems (Promega). Pour les vecteurs pYES2 et pYES2-GFP, ceux-ci sont tout d'abord linéarisés par l'utilisation d'enzymes de restriction. Le protocole employé ainsi que les enzymes utilisées sont détaillées dans le **Tableau II-11**. Le vecteur digéré est ensuite purifié sur gel d'agarose en suivant le protocole décrit dans le § 3.3.2.

#### 3.4.2. Préparation du fragment à cloner

Les produits d'amplification destinés à être clonés dans les vecteurs pGEM®-T sont purifiés en suivant le protocole détaillé dans le §3.3.2. Dans certains cas, les produits PCR à cloner ont au préalable besoin d'être digérés afin de pouvoir avoir des extrémités compatibles avec celles du vecteur. Dans le but d'insérer le gène *LpMNR2* dans le plasmide pYES2-GFP, le produit PCR correspondant a été digéré par les enzymes *Bam*HI et *Hind*III (Thermofisher Scientific) en suivant le protocole détaillé dans le **Tableau II-11**.

**Tableau II-11 : Conditions de digestion par les enzymes FastDigest *Bam*HI et *Hind*III.**

| Composition du mélange réactionnel |             |                | Condition de digestion |        |             |
|------------------------------------|-------------|----------------|------------------------|--------|-------------|
| Composé                            | Plasmide    | Produit PCR    | Etape                  | Durée  | Température |
| Eau stérile                        | 15 µl       | 17 µl          | Incubation             | 5 min  | 37°C        |
| Tampon FastDigest 10 X             | 2 µl        | 2 µl           | Inactivation           | 10 min | 80°C        |
| ADN                                | 2 µl (2 µg) | 10 µl (0,2 µg) |                        |        |             |
| Enzyme <i>Bam</i> HI               | 1 µl        | 1 µl           |                        |        |             |
| Enzyme <i>Hind</i> III             | 1µl         | 1 µl           |                        |        |             |

|              |       |       |  |
|--------------|-------|-------|--|
| Volume total | 20 µl | 30 µl |  |
|--------------|-------|-------|--|

**Tableau II-12 : Amorces nucléotidiques utilisées lors de cette thèse.**

| Nom               | Séquence 5' -> 3'                   | Utilisation                            | Tm (°C) |
|-------------------|-------------------------------------|----------------------------------------|---------|
| ITS1              | TCCGTAGGTGAACCTGCGG                 | Identification taxonomique             | 57,0    |
| ITS4              | TCCTCCGCTTATTGATATGC                | Identification taxonomique             | 53,0    |
| AD1               | NGTCGASWGANAWGAA                    | TAIL-PCR                               | 46,6    |
| AD2               | TGWGNAGSANCASAGA                    | TAIL-PCR                               | 49,2    |
| AD3               | AGWGNAGWANCAWAGG                    | TAIL-PCR                               | 46,6    |
| LB1               | TGTCAGGGTCAGGACGGTCGGTGGTCGTCT      | TAIL-PCR                               | 73,6    |
| LB2               | AAAAGTCAGCTCCGGCACCTTATCCTTG        | TAIL-PCR                               | 66,6    |
| LB3               | GTCGACATCAACAATGTCCGACACACCACT      | TAIL-PCR                               | 68,1    |
| M13-40            | GTTTTCCAGTCACGAC                    | Clonage dans PGEM-T                    | 55,0    |
| M13-26            | CAGGAAACAGCTATGAC                   | Clonage dans PGEM-T                    | 55,0    |
| MNR2 <sub>f</sub> | cccAAGCTTATGTCTGACCAAGAGAGCAACA     | Obtention de la séquence MNR2          | 68,2    |
| MNR2 <sub>r</sub> | cccGGATCCccGATGTTATCTCATCTTCCTCGCAA | Obtention de la séquence MNR2          | 73,1    |
| CorA1             | GACTGGAAGAGCTCAATCTTCTC             | Obtention de la séquence MNR2          | 57,3    |
| CorA2             | GGATGGTGTGGTGGTTGAACAT              | Obtention de la séquence MNR2          | 62,6    |
| CorA3             | AAGAAGAGTAAGAGGAAGTATAG             | Obtention de la séquence MNR2          | 46,7    |
| CorA4             | CGGGATTCAATCACTACTCGGTTT            | Obtention de la séquence MNR2          | 63,2    |
| P2R               | TAACCTCTTCCTTTTCGGTTAGA             | Amplification PYES2 et PYES2GFP        | 58,1    |
| P2F               | CTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAA           | Amplification PYES2 et PYES2GFP        | 57,1    |
| Spectr            | TTATTTGCCGACTACCTTGGTGAT            | Vérification de l'insertion de l'ADN-T | 59,3    |
| Spectf            | ATGAGGgAAGCGGTGATCGCCGAA            | Vérification de l'insertion de l'ADN-T | 66,1    |
| Hphr              | CTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGT            | Vérification de l'insertion de l'ADN-T | 64,4    |
| Hphf              | ATGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGT          | Vérification de l'insertion de l'ADN-T | 68,0    |
| Gfpr              | TCACTTGACAGCTCGTCCATG               | Vérification de l'insertion de l'ADN-T | 60,3    |
| Gfpf              | ATGAGCAAGGGCGAGGAACTGTTC            | Vérification de l'insertion de l'ADN-T | 64,4    |
| Moss-F            | GGAAACGATTGAAGTCAGTCATACCAA         | qRT-PCR                                | 61,9    |
| Moss-R            | CGAAAAAGTACACCAAGAGATCCCAAT         | qRT-PCR                                | 61,9    |
| Moss-P            | FAM- AGAGTTTCAAAGCCTTCGGATTCGC-BHQ1 | qRT-PCR                                | 63,0    |
| Cado-F            | CCTTGAATAAATTACCTTTGTTGCTTTGG       | qRT-PCR                                | 61,0    |
| Cado-R            | CCTCTGGCGGGCACTCA                   | qRT-PCR                                | 60,5    |
| Cado-P            | FAM-CCGCCTCGTGCCAGTGGC-BHQ1         | qRT-PCR                                | 65,1    |

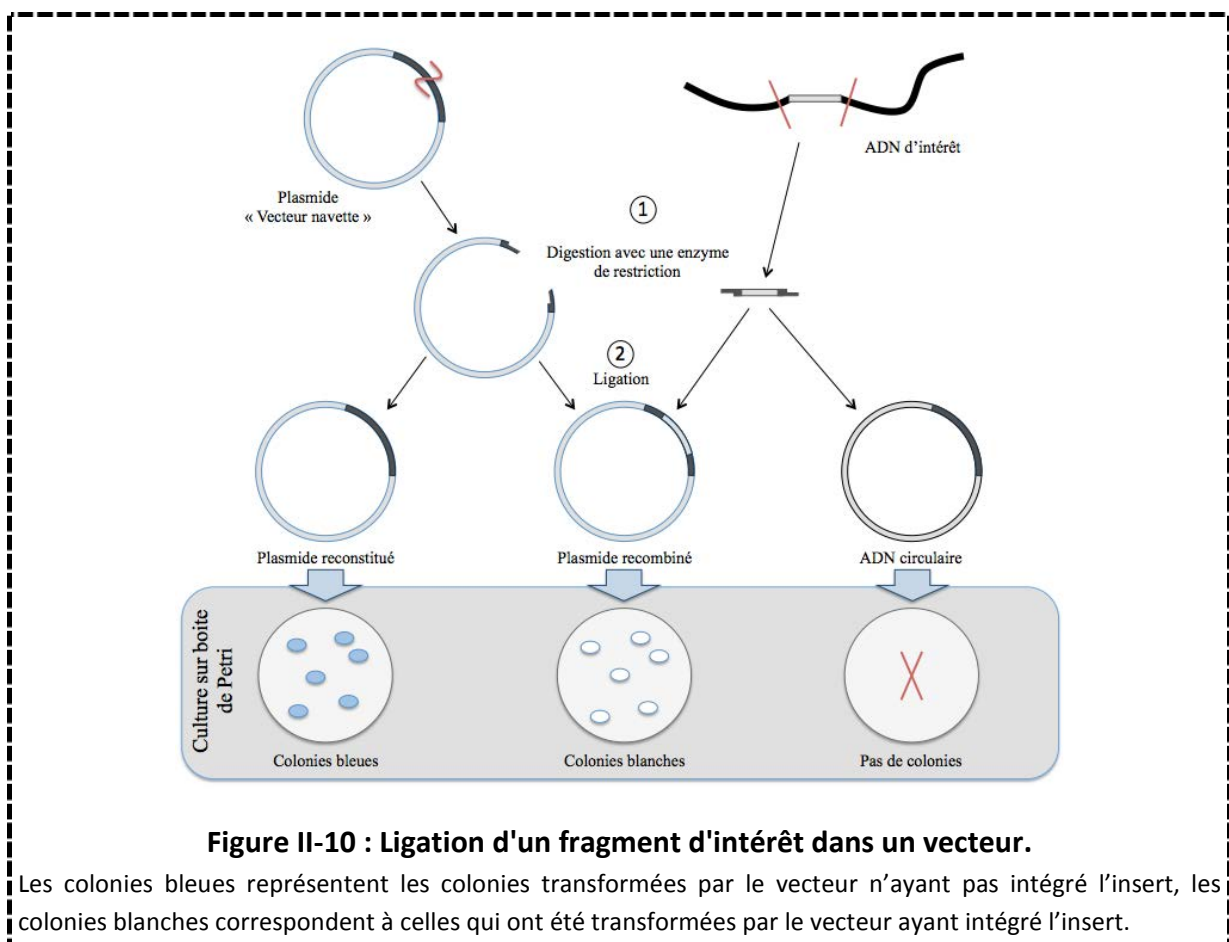
F et R désignent respectivement les amorces sens et antisens.

### 3.4.3. Ligation

Les ligations sont réalisées avec un rapport molaire insert/vecteur de 3 pour 1 et avec 50 ng de vecteur. La quantité d'insert requise est alors calculée à partir de la formule suivante :

$$\text{Quantité d'insert}(ng) = \frac{\text{Taille de l'insert}(kb)}{\text{Taille du vecteur}(kb)} \times \text{Quantité du vecteur}(ng) \times \frac{3}{1}$$

Une réaction de ligation classique nécessite 5 µl de tampon de ligation 2X, 1 µl de plasmide et 1 µl de T4 ligase 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 24°C pendant 1h30.



### 3.4.4. Transformation des levures et des bactéries.

Après clonage de fragments d'ADN dans un vecteur, il faut intégrer ce vecteur recombinant dans un micro-organisme afin de l'exprimer ou de l'amplifier. Cette intégration se fait par transformation génétique. Le principe est d'intégrer dans une cellule bactérienne (*E.coli*) ou eucaryote (*S. cerevisiae*) les vecteurs recombinants, *i.e* un insert d'ADN exogène, obtenus après clonage. Lorsque ce dernier est intégré dans une nouvelle cellule il va pouvoir s'y répliquer de façon autonome. Ce faisant il réplique également le fragment d'ADN qu'il

contient au site de polyclonage, ce qui permet d'amplifier ce fragment et de le purifier en grande quantité.

#### **3.4.4.1. Transformation des bactéries compétentes par choc thermique**

Les bactéries compétentes TOP10 (Invitrogen) sont décongelées minutieusement dans la glace pendant 10 min, 2  $\mu$ l de mélange de ligation sont ensuite ajoutés, puis les bactéries sont incubées 25 min sur de la glace afin de permettre le contact entre l'ADN et les bactéries. Un choc thermique est ensuite réalisé pendant 50 sec à 42°C permettant de faire rentrer l'ADN plasmidique dans les cellules, avant l'ajout en conditions stériles de 400  $\mu$ l de milieu SOC (**Tableau II-13**) pour les régénérer. Après une incubation de 1h30 à 37°C sous agitation (180 rpm), les bactéries sont étalées sur milieu LB supplémenté en antibiotique (ampicilline) afin de sélectionner uniquement les bactéries ayant intégré le plasmide. Lorsque le plasmide utilisé est le pGEM®-T, du X-gal à 50 mg/ml est également ajouté au milieu. Ce dernier est un analogue du galactose qui est transformé en un produit bleu lors de la réaction enzymatique catalysée par la  $\beta$ -galactosidase. Ce composé permet de distinguer les bactéries qui ont intégré le plasmide contenant l'insert par discrimination des colonies blanches (gène *lacZ* interrompu par l'ADN inséré) et des colonies bleues (gène *lacZ* fonctionnel). La transformation des cellules est confirmée par une sous-culture sur milieu sélectif (ampicilline) et par une PCR sur colonie.

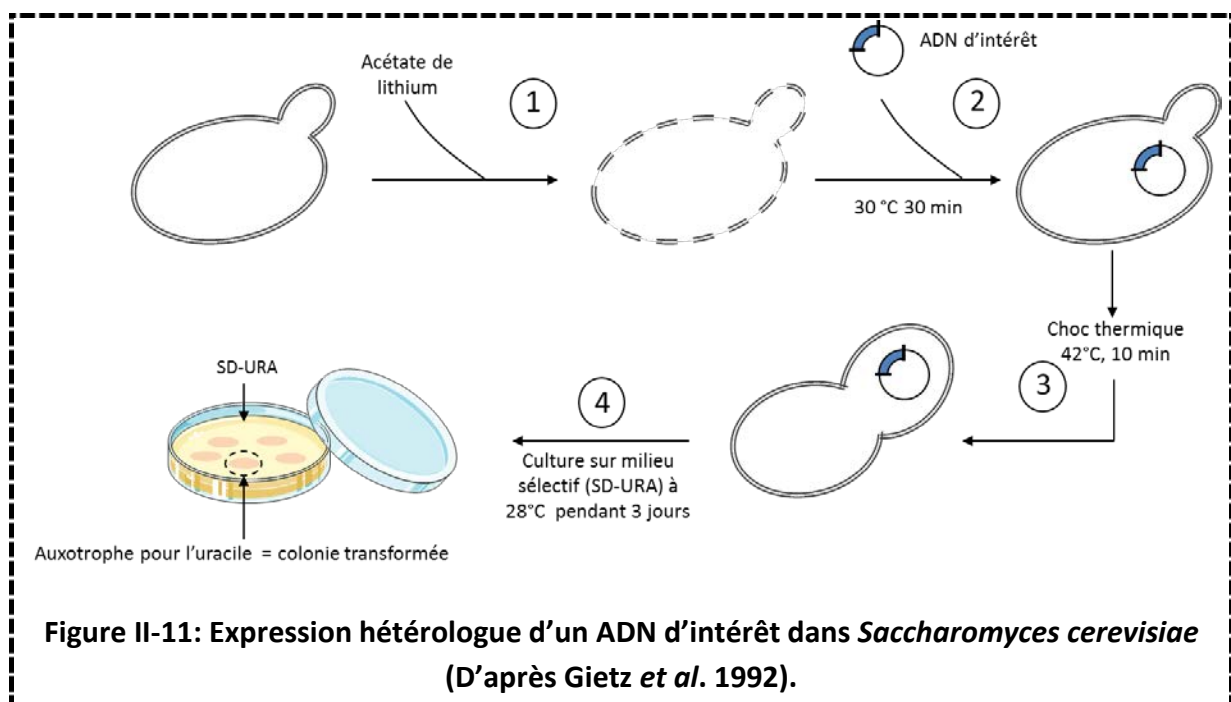
**Tableau II-13 : Composition du milieu SOC.**

| Composés                  | Concentration |
|---------------------------|---------------|
| Bactotryptone             | 20 g/l        |
| NaCl                      | 0,5 g/l       |
| Extrait de levures        | 5 g/l         |
| KCl                       | 0,2 g/l       |
| MgSO <sub>4</sub>         | 10 mM         |
| MgCl <sub>2</sub>         | 10 mM         |
| Glucose                   | 20 g/l        |
| Autoclaver 20 min à 120°C |               |

#### **3.4.4.2. Expression hétérologue dans *S. cerevisiae***

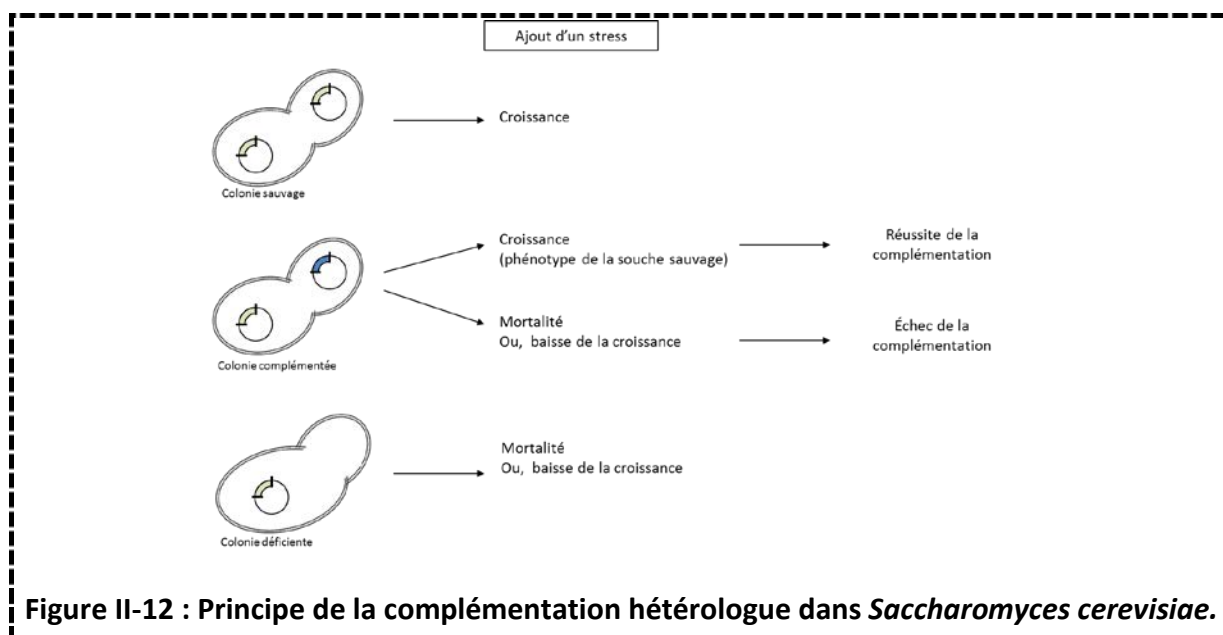
La transformation des cellules de levures par des plasmides d'expression est réalisée après le traitement des cellules à l'acétate de lithium (AcLi) d'après la méthode de Gietz (1992). Afin de rendre les cellules compétentes le protocole suivant a été ainsi utilisé. Les levures sont mises en cultures à 30°C sous agitation à 150 rpm. Lorsque la DO<sub>600nm</sub> atteint la valeur de 0,6 la culture est centrifugée pendant 10 min à 4000 rpm. Les cellules sont ensuite resuspendues et lavées deux fois dans 1 ml d'eau stérile. Le culot de cellules est ensuite

resuspendu dans 1 ml de tampon Tris-EDTA / acétate de lithium pH 7,5 (TE/AcLi) puis lavé deux fois dans ce même tampon (**Figure II-11 ①**). Les cellules sont finalement resuspendues dans le tampon TE/AcLi. Pour la transformation, les cellules compétentes (50  $\mu$ l) sont utilisées et mises en contact avec 5  $\mu$ l d'ADN de sperme de saumon soniqué à 10 mg/ml, 1  $\mu$ g de plasmide et 300  $\mu$ l d'une solution de TE/AcLi/PEG (**Figure II-11 ②**). Le mélange est incubé pendant 30 min sous agitation (150 rpm) à 30°C. Les cellules subissent ensuite un choc thermique de 15 min à 42°C (**Figure II-11 ③**), avant d'être centrifugées 5 min à 4000 rpm pour éliminer le PEG puis remises en suspension dans 400  $\mu$ l d'eau stérile. Elles sont ensuite étalées sur milieu SD dépourvu d'uracile (SD-URA) (**Figure II-11 ④**) et mises en culture à 28°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 le plasmide utilisé pourront se développer sur ce milieu SD-URA.



### 3.4.5. Complémentation fonctionnelle

Le principe de la complémentation fonctionnelle consiste à utiliser un mutant de levure portant une déficience intéressante qui sera transformé avec un plasmide contenant la séquence d'intérêt manquante et qui devrait restaurer le phénotype sauvage à la souche mutante. Les différentes souches (sauvage, mutante transformée avec un vecteur vide (sans insert), mutante transformée avec le vecteur contenant le gène d'intérêt) sont soumises à une contrainte (stress métallique dans notre cas) dont la réponse phénotypique est alors comparée. Cette expérimentation peut se faire en milieu solide (tests en gouttes), ou en milieu liquide. Le principe général de la complémentation fonctionnelle en système hétérologue levure est donné dans la **Figure II-12**.



### 3.4.5.1. Tests en gouttes

Les levures transformées par les différents gènes sont cultivées sur milieu SD-URA. Lorsqu'elles sont en phase exponentielle de croissance ( $DO_{600nm} = 0,6$ ), elles sont concentrées à  $DO_{600nm} = 1$ , puis des dilutions au  $10^{ème}$ ,  $100^{ème}$  et  $1000^{ème}$  sont réalisées avec du milieu SD-URA. Des gouttes de 5  $\mu$ l de chaque dilution et de la solution mère sont ensuite déposées sur différents milieux SD-URA, permettant de mettre en évidence une complémentation fonctionnelle par le gène porté par le plasmide. Dans chaque test, la souche sauvage et la souche délétée, toutes deux transformées par le vecteur vide, sont utilisées respectivement comme témoins positif et négatif de croissance.

### 3.4.5.2. Localisation subcellulaire de protéines par fusion GFP

Dans le but de localiser une protéine d'intérêt chez la levure, des clonages semblables à ceux décrit précédemment (§ 3.4) ont été effectués dans le plasmide PYES2-GFP contenant la protéine rapportrice GFP. Les colonies obtenues sont cultivées dans un milieu SD-URA contenant du galactose. Ce dernier permet l'induction du promoteur *pGAL1* et ainsi l'expression du gène d'intérêt. Afin de mettre spécifiquement en évidence la vacuole, les cellules sont incubées dans une solution à 2  $\mu$ M du fluorochrome FM4-64 (Fisher Scientific) pendant 30 min, puis les cellules sont lavées avec du milieu et mises à incuber à 28°C pendant 1 h avant d'être observées en microscopie à épifluorescence, selon le protocole détaillé dans le paragraphe § 3.5.

### **3.4.6. Analyses bioinformatiques et phylogénétiques**

L'étude de la taxonomie des champignons et des traits moléculaires permettant la tolérance aux ETM chez ces organismes nécessite l'utilisation de différents outils bioinformatiques.

#### **3.4.6.1. Analyses par BLAST**

Afin de déterminer si les ADN séquencés correspondent à des séquences nucléotidiques ou protéiques connues, ceux-ci sont comparés avec les séquences des protéines et d'ADN enregistrées dans les bases de données. Pour cela, nous avons fait appel aux serveurs du "National Center for Biotechnology Information, the National Library of Medicine NIH Bethesda, MD, USA" (NCBI)<sup>17</sup> et du « Joint Genome Institute » "JGI"<sup>18</sup>. La comparaison de nos séquences avec celles présentes dans les banques de données est réalisée à l'aide de l'algorithme BLAST.

#### **3.4.6.2. Caractérisation des séquences protéiques *in silico***

La caractérisation de la protéine résultant de la traduction de la séquence nucléotidique est réalisée à l'aide d'outils répertoriés dans le serveur "EXpert Protein Analysis SYstem" (EXPASY) du "Swiss Institute of Bioinformatics"<sup>19</sup>. Notamment, les outils PROSITE et ProtParam ont été utilisés afin d'étudier les caractéristiques structurales des protéines d'intérêt (e.g. point isoélectrique, domaines transmembranaires, motifs).

#### **3.4.6.3. Construction d'arbres phylogénétiques**

Les alignements de séquences nucléotidiques nécessaires à la construction des arbres phylogénétiques ou à la conception des amorces de PCR ont été réalisés avec le logiciel MEGA 6 en utilisant le mode par défaut tandis que les alignements de séquences protéiques ont été réalisés sur ce même logiciel en utilisant la matrice de calcul BLOSUM 62. Ce logiciel a également été utilisé pour la construction d'arbres phylogénétiques. Les modèles Neighbor joining et Maximum likelihood ont été utilisés pour les séquences nucléotidiques alors que le modèle UGPMA a été préféré pour les séquences protéiques. Pour l'ensemble des arbres, les tests de bootstrap ont été réalisés à partir de 1000 permutations. Les séquences utilisées pour la construction des arbres phylogénétiques et des alignements de séquences sont issues des bases de données NCBI et JGI.

---

<sup>17</sup> <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<sup>18</sup> <http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>

<sup>19</sup> <https://www.expasy.org/>

### 3.5. Analyses microscopiques

#### 3.5.1. Préparation des échantillons

Pour l'observation par microscopie de la colonisation racinaire par les champignons endophytes et mycorhiziens, des racines sont collectées sur l'ensemble des systèmes racinaires puis lavées à l'eau. Les racines sont ensuite décolorées par un traitement au KOH (5% v/v) à 90°C pendant 15 min, rincées à l'eau puis neutralisées durant une nuit dans de l'acide chlorhydrique (1%).

La coloration au bleu trypan des structures fongiques a été effectuée en utilisant le protocole de Phillips et Hayman (1970). Les racines sont incubées à température ambiante dans une solution de bleu trypan pendant 4 h puis stockées dans une solution de conservation (50 ml HCl 1%, 400 ml H<sub>2</sub>O, 50 ml de glycérol) jusqu'à leur observation.

Un marquage de certaines racines avec le fluorochrome WGA-AF<sup>®</sup>488 (Invitrogen) a également été effectué. Les racines sont ainsi incubées 15 min à l'obscurité et à 37°C dans une solution contenant 5 µg/ml de WGA-AF<sup>®</sup>488, puis sont rincées et conservées dans du tampon HBSS (KCl 400 mg/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 60 mg/l, NaHCO<sub>3</sub> 350 mg/l, NaCl 8 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 48 mg/l, glucose 1 g/l) jusqu'à leur observation.

#### 3.5.2. Estimation de la colonisation fongique par la méthode de Trouvelot

La fréquence de colonisation (F%), l'intensité de colonisation par des hyphes intraradiculaires (H%), et l'intensité de colonisation par des arbuscules (A%) ou des microscélérotés (MS%) sont déterminées au microscope photonique à partir de trente échantillons racinaires de 1cm par modalité en utilisant le protocole de quantification de Trouvelot (1986).

#### 3.5.3. Observations microscopiques

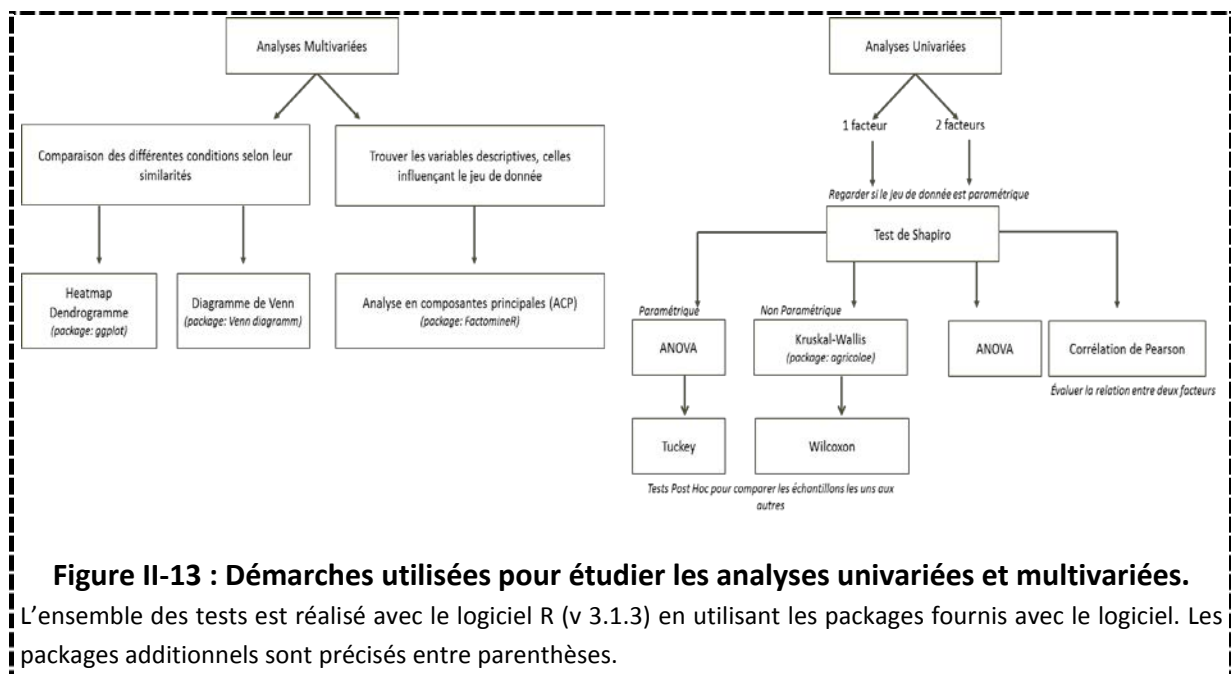
Toutes les observations microscopiques ont été réalisées avec soit :

- Un microscope optique (Nikon Eclipse E600) équipé d'un ensemble de filtres standards à fluorescence (FITC, excitation : 495-565 nm et émission : 515-555 nm, G2A, excitation : 510-560 nm et émission >590 nm) dont les photographies ont été prises avec un appareil photo Nikon D70. Le microscope optique a été utilisé pour observer les échantillons racinaires et les levures. Pour les échantillons colorés au bleu trypan, les observations ont été réalisées en lumière blanche. Cependant pour les observations des signaux GFP et FM4-64, les filtres G2A et FITC ont respectivement été utilisés (Chapitre V-2).
- Un microscope confocal (AGR-3Q-BLD, Rainbow, Radiance Biorad) équipé d'un laser UV et d'un laser Argon (excitation : 488 et émission 500-550 nm) et d'un laser UV (excitation : 405 nm et émission 420-470 nm) a également été utilisé

dans nos études. Le microscope confocal permet d'observer un échantillon à différentes profondeurs. Dans cette thèse, ce microscope a permis de localiser précisément les sites de colonisation des champignons dans les différents tissus racinaires (*e.g.* endoderme, cylindre central, cortex). Les échantillons observés ont préalablement été marqués avec du WGA-AF®488. Les images sont analysées grâce au logiciel Image J (v.1.43u)<sup>20</sup>.

### 3.6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques liées aux travaux de thèse ont été réalisées à l'aide du logiciel R (v 3.1.3). Les résultats sont considérés comme significatifs pour une valeur seuil de  $\alpha = 0,05$ . La démarche utilisée lors de cette thèse pour étudier les données est résumée par la **Figure II-13**.

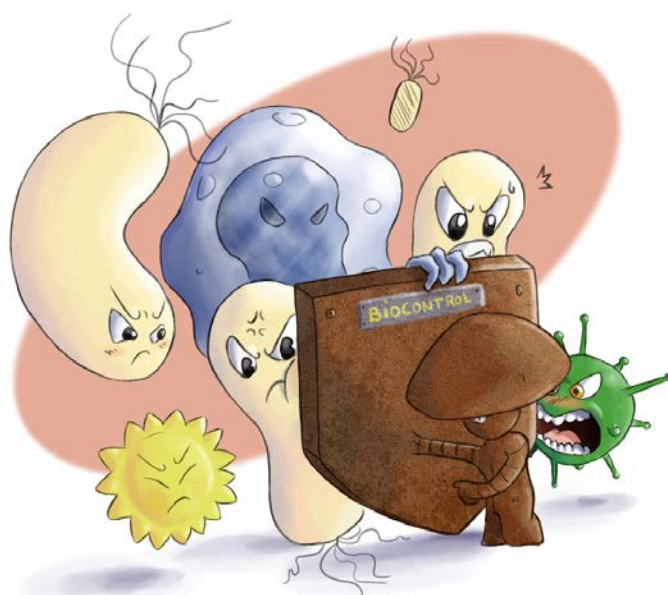
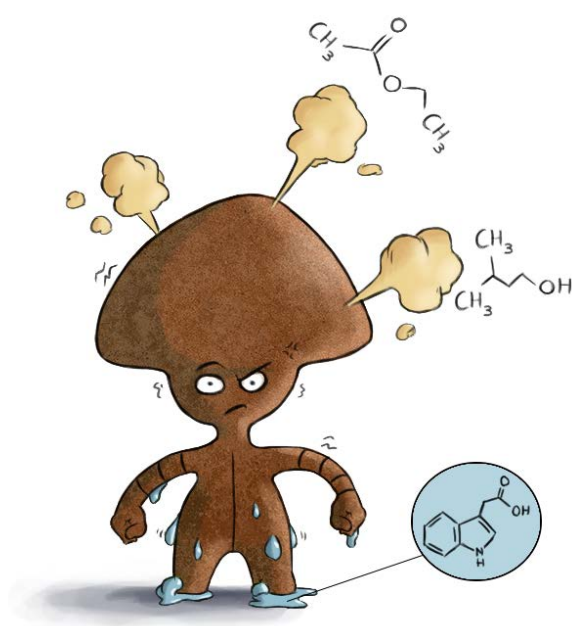


Pour le cas particulier où les paramètres étudiés sont dépendants les uns des autres, un test paramétrique d'analyse de covariance (ANCOVA) est réalisé à la place du test ANOVA.

<sup>20</sup> <https://imagej.nih.gov/ij/>

### III. Identification et caractérisation de souches fongiques DSE

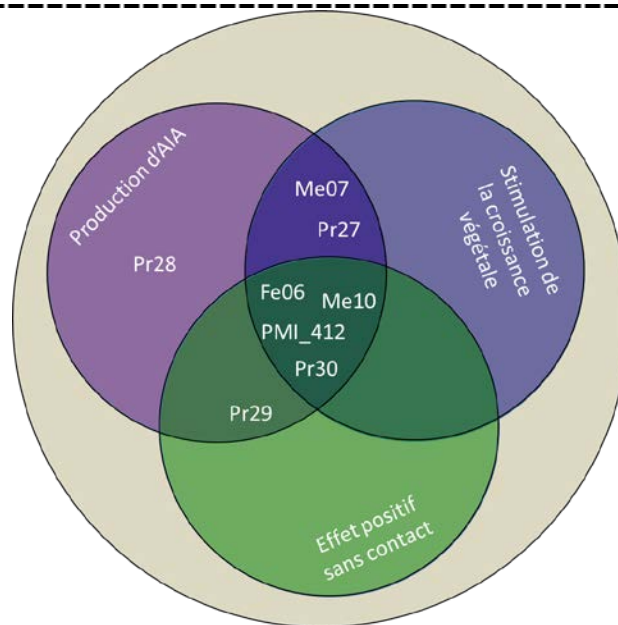
---





D'après la littérature, les DSE sont particulièrement abondants dans les environnements stressants tels que les sites pollués aux ETM. L'abondance de ces champignons dans les racines des plantes se développant dans ces milieux suggère qu'ils pourraient jouer un rôle dans l'établissement et la croissance de leurs plantes-hôtes. Cependant, les études réalisées à ce jour ne portent que sur quelques souches et quelques plantes, et très peu de connaissances sur le rôle écologique des DSE ont été acquises, particulièrement dans des contextes de sols pollués par des ETM.

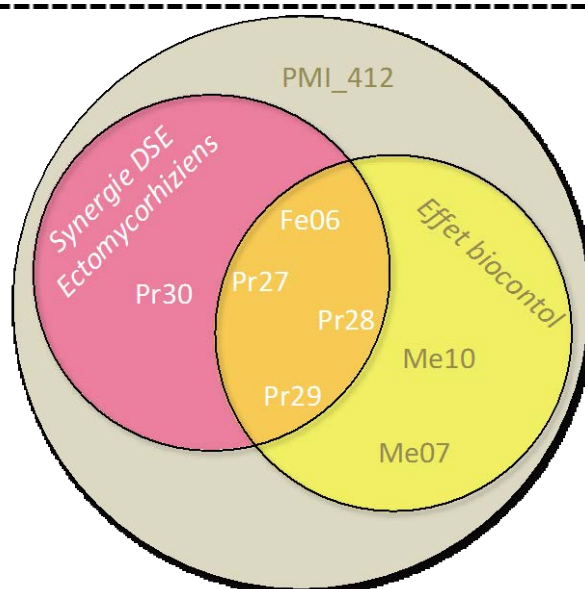
Le troisième chapitre de ce manuscrit avait pour objectifs d'isoler, d'identifier et de caractériser un ensemble de souches de DSE issues de racines de peupliers se développant dans des sols contaminés par les ETM. Sept souches DSE appartenant aux genres *Cadophora*, *Leptodontidium*, *Phialophora* et *Phialocephala* ont été obtenus. Les souches *Piriformospora indica*, et *Leptodontidium* sp. PMI\_412 dont les génomes ont récemment été séquencés (Bonito *et al.* 2016; Gill *et al.* 2016) ont été ajoutées à notre étude en tant que modèles. Les résultats obtenus montrent que ces souches de DSE sont capables de se développer sur une large gamme de composés carbonés, y compris des composés pariétaux (*e.g.* cellulose, amidon). Elles colonisent uniformément le bouleau, l'eucalyptus et le ray-grass lors d'expériences de resynthèse en conditions contrôlées. Des stimulations de la croissance racinaire et/ou aérienne sont observées et sont plante- et souche- dépendantes. Une souche de *Leptodontidium* et une souche de *Phialophora mustea* stimulent considérablement la croissance végétale. Toutefois, nous n'avons pas observé de corrélation entre le niveau de colonisation racinaire par les DSE et la stimulation de croissance. Toutes les souches produisent de l'auxine et six ont également la capacité de stimuler la croissance via l'émission de molécules organiques volatiles (COV). Pour identifier ces composés, des mesures par SPME-GC/MS ont été réalisées sur une souche de *Cadophora* sp. et une souche de *Leptodontidium* sp., capables de promouvoir la croissance végétale sans contact physique. D'autre part, les souches fongiques présentent une croissance jusqu'à des concentrations importantes de différents ETM. Les résultats majeurs, obtenus dans ce chapitre III-1 sont résumés dans le diagramme de Venn présenté dans la **Figure III-1**.



**Figure III-1 : Résumé des capacités des DSE à synthétiser de l'auxine, des molécules organiques volatiles phytostimulantes et à stimuler la croissance végétale.**

Le chapitre III-1 a mis en évidence que certaines souches de **DSE présentent des activités de stimulation de la croissance des plantes (PGP)**. Cependant, différentes études ont mis en évidence que les DSE sont associés, *in planta*, avec de nombreux **autres microorganismes** comme les champignons ectomycorhiziens, les champignons endophytes ou les champignons pathogènes. Cependant, les interactions se déroulant dans ces associations sont très peu connues. De plus, les champignons endo- et ectomycorhiziens sont des partenaires importants de la croissance végétale en améliorant la nutrition minérale et la croissance. Dans le chapitre III-2 en utilisant un test de co-culture simple et reproductible, nous avons étudié les stimulations/inhibitions s'exerçant dans un grand nombre d'associations incluant huit souches de DSE, un endophyte, deux champignons ectomycorhiziens (*Paxillus involutus* et *Hebeloma cylindrosporum*) et trois souches de phytopathogènes (*Phytophthora citricola* ; *Pythium ultimum* et *Heterobasidion annosum*). Pour l'étude de ces interactions, deux paramètres ont été utilisés : le diamètre de la souche et le ratio entre le rayon interne et le rayon externe des colonies. Ces indicateurs renseignent sur la croissance des souches et sur leur forme. Les résultats ont mis en évidence que les souches peuvent croître (i) en synergie, (ii) sans relation particulière ou (iii) en antagonisme. Cette relation est souche-dépendante. Les interactions entre les souches peuvent faire intervenir différents phénomènes comme des déformations de la colonie et des sécrétions de métabolites. Notamment, trois souches fongiques appartenant aux genres *Cadophora*, *Leptodontidium* et *Phialophora* ont permis la diminution de croissance des souches phytopathogènes.

La capacité des souches DSE à s'associer avec des souches ectomycorhiziennes ou à diminuer la croissance des souches pathogènes est résumée dans le diagramme de Venn présenté dans la **Figure III-2**.



**Figure III-2 : Résumé des capacités des DSE à s'associer avec des souches ectomycorhiziennes et à diminuer la croissance de souches phytopathogènes *in vitro*.**

Ce chapitre est divisé en deux parties : la partie I-1 fait l'objet d'une **publication** dans *FEMS microbiology ecology* (doi.10.1093/femsec/fiw144), référencée dans la suite du manuscrit par « Berthelot *et al.* 2016 ». La partie III-2 fait l'objet d'une publication à **soumettre**.



## 1. Plant growth promotion, metabolite production and metal tolerance of dark septate endophytes isolated from metal-polluted poplar phytomanagement sites

### Abstract

Numerous studies address the distribution and the diversity of dark septate endophytes (DSEs) in the literature, but little is known about their ecological role and their effect on host plants, especially in metal-polluted soils. Seven DSE strains belonging to *Cadophora*, *Leptodontidium*, *Phialophora*, and *Phialocephala* were isolated from roots of poplar trees from metal-polluted sites. All strains developed on a wide range of carbohydrates, including cell-wall related compounds. The strains evenly colonized birch, eucalyptus, and ryegrass roots in re-synthesis experiments. Root and shoot growth promotion was observed and was both plant- and strain-dependent. Two *Phialophora* and *Leptodontidium* strains particularly improved plant growth. However, there was no correlation between the level of root colonization by DSEs and the intensity of growth promotion. All strains produced auxin and six also stimulated plant growth through the release of volatile organic compounds (VOCs). SPME-GC/MS analyses revealed four major VOCs emitted by *Cadophora* and *Leptodontidium*. The strains exhibited growth at high concentrations of several metals. The ability of metal-resistant DSE strains to produce both soluble and volatile compounds for plant growth promotion indicates interesting microbial resources with high potential to support sustainable production of bioenergy crops within the context of the phytomanagement of metal-contaminated sites.

### 1.1. Introduction

Dark septate endophytes (DSEs) are polyphyletic ascomycetes mainly characterized by brown to blackish mycelium. Due to their singular morphology, they were initially described as ‘mycelium radialis atrovirens’ (MRA) or ‘pseudomycorrhizal’ fungi (Melin 1921), and later introduced as fungi with sterile and dark septate – DS hyphae – that occur in roots of various plants (Read and Haselwandter 1981). DSEs are widespread: they have been observed in more than 600 plant species spanning 100 plant families. They colonize both herbaceous and woody plants, and more particularly roots of metal hyperaccumulators, halophytes, orchids, or marine macrophytes (Mandyam and Jumpponen 2005). They occur in diverse habitats such as arid, arctic, boreal, alpine, temperate forest, or tropical ecosystems (Jumpponen and Trappe 1998a; Mandyam and Jumpponen 2005). Pathogenic or beneficial interactions between DSEs and host plants have been discussed in a number of studies (Mandyam and Jumpponen 2005; Newsham 2011; Mayerhofer *et al.* 2013). These studies concluded that responses to DSEs were variable and depended on the host-symbiont combination. Several studies suggest that DSEs produce a variety of extracellular enzymes that break down complex forms of carbon, nitrogen and phosphorus commonly present in soils, and thus potentially provide originally unavailable nutrients for plants

(Jumpponen and Trappe 1998a; Jumpponen *et al.* 1998; Caldwell *et al.* 2000; Usuki and Narisawa 2007; Upson *et al.* 2009; Mandyam *et al.* 2010).

DSEs have received much attention in the recent years because they colonize plants growing in stressed environments such as elevated CO<sub>2</sub>, poor nutrient, and high salinity (Alberton *et al.* 2009; Sonjak *et al.* 2009). Moreover, abundant and diverse DSEs have been found associated to the roots of a large range of plant species growing on metal-contaminated soils (Vrålstad *et al.* 2002; Ruotsalainen *et al.* 2007; Regvar *et al.* 2010; Deram *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2013). Interestingly, mycorrhizal colonization by *Salix caprea* decreased under metal pollution whereas DSE colonization was not affected (Likar and Regvar 2009). Similarly, mycorrhizal colonization of herbaceous species drastically decreased in highly polluted soils whereas infection by DSEs remained unchanged (Ruotsalainen *et al.* 2007; Deram *et al.* 2011). Despite these numerous indications about the worldwide distribution and diversity of DSEs in the literature, little is known about their ecological role and their effect on host plants in polluted soils.

DSEs could be considered for the phytomanagement of metal-contaminated soils by trees and their associated microorganisms. For that purpose, there is a need to take into account (i) the wide range of plants potentially colonized by DSEs, especially trees with high biomass productivity, (ii) their growth promotion capabilities, and (iii) their tolerance to metal pollution. As compared to mycorrhizal fungi or clavicipitaceous endophytes, only a limited number of DSEs have been characterized. Among the few studies about the mechanisms involved in plant growth promotion and tolerance to stress, very few address DSEs. Thus, there is a need to better characterize the diversity, metabolism, and interactions of DSEs with host plants to investigate their potential use in phytomanagement studies.

In the present work, we first isolated fungal endophytic strains including non DSEs (Lacercat-Didier *et al.* 2016) and DSEs from poplar trees grown on different phytomanagement plots of metal-contaminated sites. Here, based on their taxonomy, we focused our work on DSE *sensu stricto* (Jumpponen and Trappe 1998a) belonging to four genera (*Phialophora*, *Cadophora*, *Leptodontidium* and *Phialocephala*) of the Helotiales. The main objectives of this study were (i) to study their ability to metabolize various carbon sources, and to grow in the presence of different metals, (ii) to investigate their ability to colonize different plant species, (iii) to demonstrate the production of plant-growth-promoting (PGP) metabolites such as auxin and volatile organic compounds (VOCs), and (iv) to determine their overall impact on plant growth in mesocosm experiments.

## **1.2. Materials and methods**

### **1.2.1. Isolation and culture of root-colonizing DSE fungi**

Root samples were collected from poplar trees growing in three metal-polluted sites in France: Fresnes-sur-Escaut (Nord; N 50°25'46'' E 3°35'4''), MetalEurop (Pas-de-Calais; N 50°26'17'' E 3°03'54''), and Pierrelaye (Val d'Oise; N 49°1'21'' E 2°9'1''). Sediments from the

dredging of the Escaut river have been dumped at the Fresnes-sur-Escaut site for several decades. The major pollutants of this site are Cd, Pb, and Zn (1.0, 57, and 191 mg of total element per kg of sediment, respectively, pH 7.8). The MetalEurop site is a former agricultural area that was strongly contaminated by Cd, Pb, and Zn (3.1, 176, and 294 mg of total element per kg of soil, respectively, pH 6.5) from atmospheric particles generated by the activity of the MetalEurop smelter (Sterckeman *et al.* 2002). The experimental site of Pierrelaye is an agricultural plain of ca 1,200 ha that was irrigated for almost one century by the non-treated waste waters from Paris, hence contamination of top soils by Cd, Pb, and Zn (1.5, 139, and 318 mg of total element per kg of soil, respectively, pH 7.4) (Lamy *et al.* 2006).

Roots were first washed with tap water, surface-sterilized by immersion in hydrogen peroxide (35% v/v) for 30 sec, and finally rinsed three times with sterile distilled water. Root segments (5 mm) were placed on malt extract agar (MEA, malt extract: 12 g/l; agar: 15 g/l, pH 5.5) at 24°C in the dark. Ampicillin (100 µg/ml) and chloramphenicol (100 µg/ml) were also added to the medium to avoid bacterial contamination. After two weeks of growth, mycelium growing out of the roots was isolated and sub-cultured in new MEA plates.

Two other endophytic strains from unpolluted soils (*Piriformospora indica* DSM 11827 and *Leptodontidium* sp. PMI\_412) were also included in our study. They were supplied by P. Franken (Humboldt University of Berlin, Germany) and by G. Bonito (Michigan State University, USA), respectively.

### **1.2.2. Molecular identification of DSEs**

Fungal DNA was extracted using a REDextract-N-Amp™ Plant PCR kit (Sigma-Aldrich, France) according to the manufacturer's protocol. The internal transcribed spacer (ITS) region was amplified using the primers ITS1 and ITS4 (White *et al.* 1990). Twenty microliters of a mixture containing 0.2 µM of each primer, 4 µl of genomic DNA, 5.2 µl of water and 10 µl of REDextract-N-Amp PCR ready mix were used for PCR amplification. The following PCR program was used: 3 min denaturation at 94°C, followed by 40 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, and 72°C for 1 min, and 10 min final extension at 72°C. PCR products were cloned into the pGEM-T® vector system I (Promega, France), and the corresponding plasmids were sequenced. The ITS sequences were used to retrieve similar sequences from the GenBank using the NCBI BLAST program. Sequence alignment was carried out using Clustal X. Bootstrap analysis was performed with 1,000 replications. The maximum likelihood tree was drawn with the kimura 2-parameter model and the neighbor-joining tree was drawn with the p differences model and gamma for rate heterogeneity using MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013).

### **1.2.3. Metal tolerance tests**

The sensitivity of the strains to different metals was evaluated by investigating the minimum inhibitory concentration (MIC) of As, Cd, Mn, and Zn on fungal growth. Pachlewski

medium (Pachlewski and Pachlewska 1974) was selected as the growth medium to have maximal metal availability and avoid metal precipitation. Plugs (4 mm) were cut from the edge of actively growing two-week-old colonies and placed on solid Pachlewski medium (pH 5.5) amended with metals at the following concentrations: 0 to 12 mM ZnCl<sub>2</sub> and MnCl<sub>2</sub>, 0 to 30 mM Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>, and 0 to 1.5 mM CdCl<sub>2</sub>. Growth was observed after two weeks of incubation at 24°C.

#### **1.2.4. Growth of DSE isolates on different carbon sources**

Determination of auxin The hydrolytic capacities of the fungi were determined in modified Pachlewski medium (NH<sub>4</sub>Cl 1.3 g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/l; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/l; thiamine hypochlorite 10 µg/l; pH 5.5) supplemented with the appropriate target substrates as the sole carbon source (8 g/l C). The monosaccharides glucose, fructose, xylose and mannitol, the disaccharides sucrose, maltose and cellobiose, and the polymers lignin, cellulose, starch and xylan were tested. Triplicate flasks were shaken at 140 rpm and incubated for two weeks at 24°C. Mycelia were harvested and their dry biomass was determined. Data were expressed relatively to growth values on glucose. To determine cellulase activity, fungal plugs (4 mm) were placed on minimal medium containing 5 g/l of carboxymethyl-cellulose (CMC) (Sigma-Aldrich, France) as the sole carbon source. After two weeks, the area of CMC hydrolysis was evaluated by flooding the plate with 3 ml of Congo red solution (0.1% w/v) for five min. Plates were subsequently washed three times with 15 ml of phosphate buffer (50 mM phosphate, 1 M NaCl; pH 7.0). Cellulase activity was estimated by calculating the “diameter of the hydrolytic zone” over “diameter of the colony” ratio.

#### **1.2.5. Auxin secretion by DSEs**

To estimate the ability of the strains to produce auxin (IAA), seven mycelial plugs (4 mm) were first grown in 50 ml of CM minimal medium (Hilbert *et al.* 2012). After one week of growth, the medium was supplemented with 2.5 mM tryptophan or not for three days, as previously described (Waqas *et al.* 2012). IAA concentrations were determined following the method of Salkowski (Salkowski 1885). Briefly, 3 ml of the culture were centrifuged, and 1-ml aliquots were mixed with 3 ml of Salkowski reagent (12 g FeCl<sub>3</sub> in 7.9 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). The mixture was incubated for 20 min in the dark, and then a colorimetric assay was performed at 540 nm. A standard curve was generated with commercial IAA (Sigma-Aldrich) in CM minimal medium with or without tryptophan. The experiment was repeated with three independent cultures.

#### **1.2.6. Emission of volatile organic compounds by DSEs and SPME-GC/MS analyses**

To study the emission of volatile organic compounds (VOCs) by DSEs, a *Nicotiana tabacum* assay was used according to a previously described test (Paul and Park 2013). *N. tabacum* seeds were surface-sterilized for four hours under a gaseous atmosphere produced by mixing NaClO 9% (v/v) and HCl 12% (v/v). After one week of growth on water agar (1%), tobacco seedlings were placed on MS agar (Murashige and Skoog 1962) amended

with 3% sucrose in 24-well plates (one seedling per well). Twelve wells on the longer side of the plate were dedicated to the culture of the DSE strains. These wells were filled with 1 ml of MEA medium and inoculated with 4-mm-diameter fungal plugs. Plates were prepared in triplicate per fungal strain. Controls consisted of plates inoculated with fungus-free MEA plugs. The plates were hermetically sealed and placed in a growth chamber with a photoperiod of 14 h light (660  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) and 10 h dark, and a temperature of 23/18°C (day/night). After one month of growth, shoot fresh weights were measured.

Twenty-milliliter glass vials filled with 7 ml of solid MEA medium were used to study VOC production by two selected DSE strains (Pr30 and Fe06). Each vial was inoculated with one 8-mm fungal plug, whereas control vials were inoculated with fungus-free MEA plugs. After inoculation, each vial was hermetically sealed and incubated for one month at 24°C in the dark. Each treatment was performed in six biological replicates. The volatile metabolites were extracted by headspace SPME using a 100  $\mu\text{M}$  PDMS fiber (SUPELCO™) for 15 min at 25°C, followed by 2 min desorption in the GC injector. GC/MS analyses were performed with an Agilent 6890 GC Plus coupled to a quadrupole mass spectrometer 5973 MSD (Agilent), and equipped with an HP-5 MS capillary column (30 m x 250  $\mu\text{m}$  i.d., 0.5  $\mu\text{m}$  thick film). Working conditions were as follows: injector at 250°C and transfer line to MS system at 250°C. The oven temperature was programmed as follows: initial temperature at 38°C for 4 min, then from 38°C to 100°C at a rate of 7°C/min, from 100 to 200°C at a rate of 23°C/min, and 200°C for 2 min. The carrier gas was He at 1.0 ml/min. Injection was performed in splitless mode and scan mode. Electron impact ionization was set to 70 eV, and the acquisition parameters (scanned  $m/z$ ) were 50/300 with a threshold of 150. The fungal metabolites were identified by comparing their mass spectra and Kováts retention indices with the US National Institute of Standards and Technology (NIST) Mass Spectral Library.

#### **1.2.7. Plant growth promotion experiment**

Fungal inocula were prepared by aseptically growing DSE strains in flasks containing 500 ml of perlite moistened with 250 ml of MEA medium, according to Likar & Regvar (2013). The flasks were incubated at 24°C in the dark for two weeks. They were shaken manually twice a week to allow for homogenous fungal growth. Controls contained fungus-free perlite. *Betula pendula*, *Eucalyptus globulus* and *Lolium perenne* were used as model plants. Seeds were surface-sterilized (5 min in 70% ethanol; 20 min in 5% NaClO) and carefully rinsed five times with sterile distilled water. Birch and eucalyptus seedlings were initially aseptically pre-grown in sterilized perlite for two weeks whereas ryegrass seeds were directly sown in pots. Plants were grown in a sterilized mixture of 90/10% (v/v) perlite/fungal inoculum for two weeks for ryegrass and eight weeks for birch and eucalyptus. Plants were irrigated alternatively with water and half-strength Ingestad solution. Fourteen independent replicates were performed for each plant/fungus combination. Plants were placed in a growth chamber with a 16/8 h photoperiod (260  $\mu\text{mol}$

m<sup>2</sup>/s<sup>2</sup>) of and a temperature of 23/18°C (day/night). At the end of the experiment, the plants were harvested, and roots were analysed for fungal colonization. Finally shoots and roots were dried at 50°C for two days and weighed.

#### **1.2.8. Microscopic observation of root colonization**

Root colonization by the DSE strains was assessed by using two protocols. Sub-samples of root systems were cleared in 5% KOH at 90°C for 15 min, neutralized in 1% HCl at 20°C overnight, and stained with trypan blue. The frequency of root colonization (F%), the intensity of root colonization by intraradical hyphae (H%), and intracellular microsclerotia (MS%) were determined under a microscope by examining thirty 1-cm long root fragments per sample, according to Trouvelot *et al.* (1986) and Likar and Regvar (2013).

Roots were also analyzed by confocal laser microscopy. Selected root segments were first cut into pieces of approximately 5 to 10 mm in length and were labelled with 5 µg/ml WGA-AF<sup>®</sup>488 (Invitrogen, France) for 10 min to visualize fungal structures. The autofluorescence of root cell walls was detected between 420 and 470 nm after UV laser irradiation at 405 nm. An argon laser was used to excite Alexa Fluor<sup>®</sup> 488, and fluorescence was detected between 500 and 550 nm. Image stacks were obtained using a Nikon eclipse TE2000U equipped with a confocal scanning head (AGR-3Q-BLD, Rainbow, Radiance Biorad) and a Plan APO x20/0.75 objective. All samples were scanned at an x/y scanning resolution of 512 x 512 pixels; the z direction step size was 2.2 µm. The image stacks were visualized and processed using the software program Image J (v.1.43u). The two detection channels of plant and fungal cell fluorescence were assigned different colors using RGB color tables to discriminate between the two organisms. Mycelia from two-week-old pure cultures were also stained with WGA-AF<sup>®</sup>488 and similarly studied by fluorescence microscopy.

#### **1.2.9. Statistical analyses**

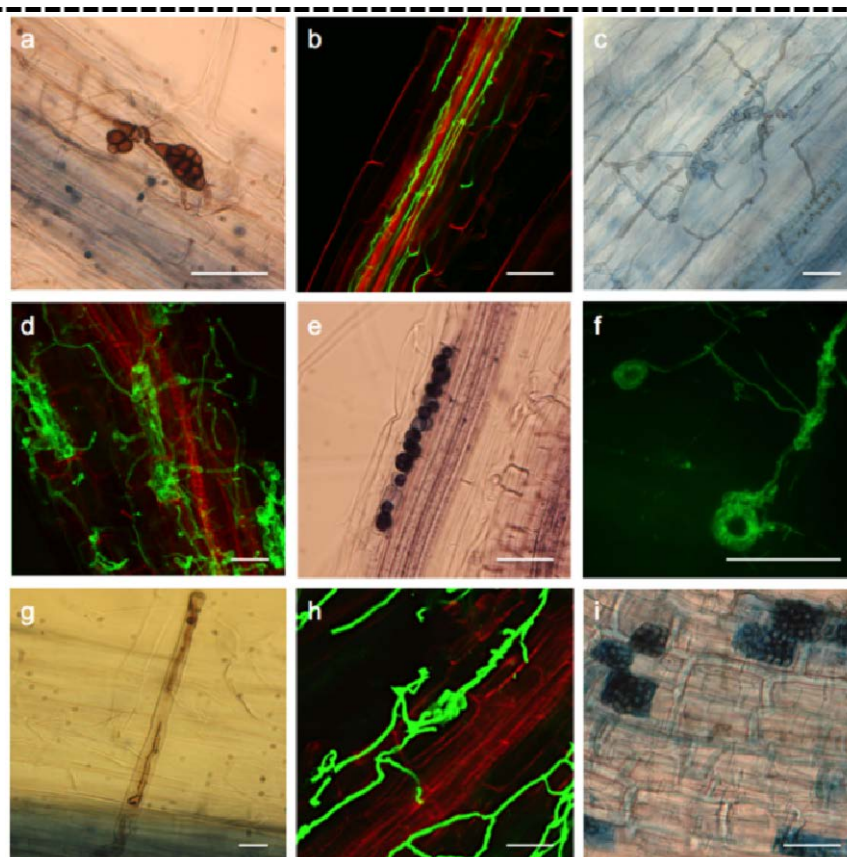
Statistical analyses were performed with R 3.1.3 (R Core Team 2013) software. Normality of the data was tested using a Shapiro-Wilk test. Data were then analyzed using one-way ANOVA or a one-way non-parametric Kruskal-Wallis test with an alpha level of 0.05. The effect of plants, strains and the interaction between these two factors on root colonization by DSEs was tested with a two-way analysis of variance (ANOVA). Pearson correlation coefficients were calculated to determine the relationship between root colonization by DSEs and plant growth. Percentage values were arcsin-transformed before statistical analyses.

### **1.3. Results**

#### **1.3.1. Isolation and identification of DSE strains**

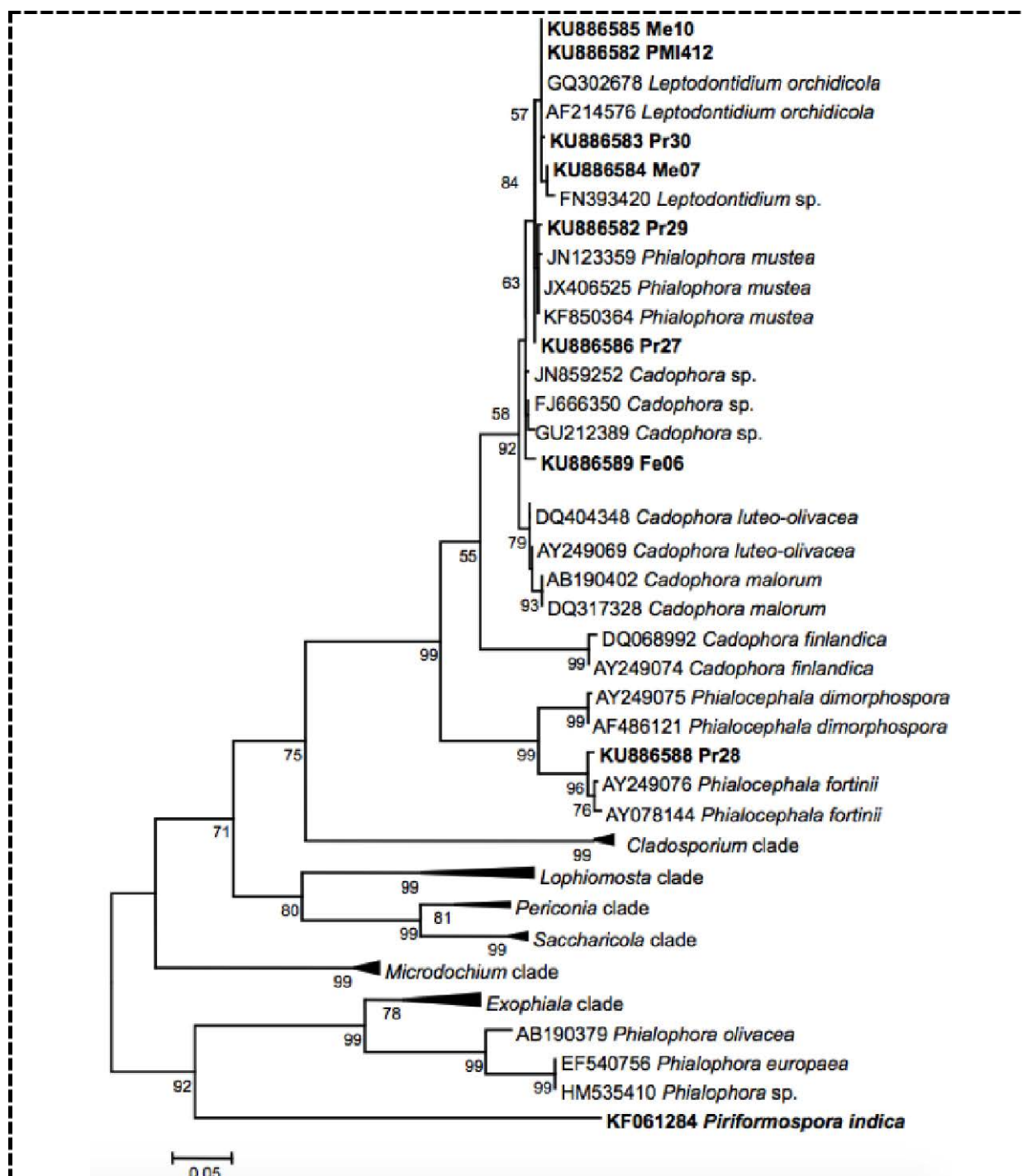
Seven DSE strains were isolated from the roots of poplar trees grown on metal-polluted sites: Me07 and Me10 from the MetalEurop site, Fe06 from the Fresnes-sur-Escaut site, and Pr27, Pr28, Pr29, Pr30 from the Pierrelaye site. The prefixes Me, Fe and Pr were

respectively assigned to MetalEurop, Fresnes-sur-Escout, and Pierrelaye. All strains produced round-shaped, fast-growing colonies on MEA plates. Pr27 and Pr29 produced yellow to orange colonies, whereas the other colonies were brown to black (**Table III-1**). All strains had typical dark septate hyphae (data not shown). Moreover, looping and twisting hyphae were observed for Pr27, Pr28, Pr30, and Fe06 (**Figure III-3**). Me10 sporulated *in vitro* after one week of growth.



**Figure III-3. Morphological characteristics of DSEs in roots or in pure cultures.**

Fungal structures presented in c-d-h, a-e-i and b-g were observed in roots of *E. globulus*, *B. pendula* and *L. perenne*, respectively. Trypan blue-stained roots were observed by optical microscopy (a-c-e-g-i), whereas WGA-AF488-stained roots and mycelia were observed by confocal microscopy. Green: fungal material ; red: autofluorescence of roots cells. Typical brain-like (a), loosely packed (c and h) and fully packed (d and i) microsclerotia were observed in the cortical cells of plants inoculated with Fe06, PMI\_412 and Pr27, Pr27 and Me10, respectively. Vascular cylinder colonized by hyphae of Pr30 (b). Chlamydospores (e) of *P. indica* DSM 11827 localized in cortical cells. Root hair colonized by Pr28 (g). Asexual looping structures (f) observed in Pr27 colonies growing on MEA plates. Scales bars = 25 µm.



**Figure III-4 : Maximum Likelihood phylogram showing the placement of strains based on ITS1-5.8S-ITS2 sequences.**

The evolutionary history was inferred using the maximum likelihood method based on the Tamura-Nei model. The percentage of trees (> 50%) in which the associated taxa clustered together is shown below the branches. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6 (Tamura *et al.* 2013). The strains used in the present study (in bold) were compared with known and selected fungal species from GenBank with high sequence similarities. The different clades are represented and are compressed for the sake of simplicity. The sequences contained within each genus are provided in **Annexe 2**.

The taxonomic identification of the strains was performed by analyzing their ITS1-5.8S rDNA-ITS2 regions. A maximum likelihood (ML) phylogenetic tree was drawn, including sequences from previously reported DSE strains as well as other endophytic strains **Figure III-4**. Me07, Me10, Pr30 clustered together with sequences of the previously described *Leptodontidium orchidicola* and the reference *Leptodontidium* sp. PMI\_412 strain. Pr27 and Pr29 had a very close evolutionary relationship with *Phialophora mustea* (JN123359). Pr28 matched with *Phialocephala fortinii* (AY078144) with 98% identity of their respective ITS sequences. Fe06 was assigned to the genus *Cadophora* (99% identity with *Cadophora* sp. JN859254). Additional phylogenetic analysis using the neighbor-joining (NJ) method was performed and gave congruent conclusions that confirmed the confidence level of the clustering (data not shown). Sequence data were deposited in GenBank under the following accession numbers: KU886589 (Fe06), KU886584 (Me07), KU886585 (Me10), KU886587 (PMI\_412), KU886586 (Pr27), KU886588 (Pr28), KU886582 (Pr29), and KU886583 (Pr30).

**Table III-1 : Colonization of *B. pendula*, *E. globulus* and *L. perenne* roots by DSEs.**

| Strains             | <i>B. pendula</i>         |                          |                         |         | <i>E. globulus</i>        |                          |                         |         | <i>L. perenne</i>        |                         |                         |         |
|---------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|---------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|---------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|---------|
|                     | Colonization              |                          |                         |         | Colonization              |                          |                         |         | Colonization             |                         |                         |         |
|                     | F%                        | H%                       | MS%                     | MS type | F%                        | H%                       | MS%                     | MS type | F%                       | H%                      | MS%                     | MS type |
| Fe06 (dark brown)   | 44.4 ± 8.0 <sup>du</sup>  | 7.5 ± 4.5 <sup>uc</sup>  | 3.4 ± 1.0 <sup>du</sup> | Lp, Fp  | 68.9 ± 5.9 <sup>l</sup>   | 2.7 ± 0.3 <sup>ul</sup>  | 1.4 ± 1.0 <sup>du</sup> | Fp      | 70.0 ± 8.2 <sup>d</sup>  | 5.0 ± 3.1 <sup>du</sup> | 11.3 ± 9.7 <sup>d</sup> | Bl      |
| Me07 (light gray)   | 44.4 ± 14.7 <sup>du</sup> | 2.7 ± 1.2 <sup>du</sup>  | 1.5 ± 1.0 <sup>d</sup>  | Lp      | 56.7 ± 3.3 <sup>duL</sup> | 1.2 ± 0.2 <sup>d</sup>   | 1.4 ± 1.0 <sup>d</sup>  | Lp      | 49.3 ± 20.3 <sup>d</sup> | 5.0 ± 3.1 <sup>du</sup> | 11.3 ± 9.7 <sup>d</sup> | Lp      |
| Me10 (dark gray)    | 60.0 ± 5.9 <sup>o</sup>   | 4.5 ± 1.7 <sup>auc</sup> | 4.3 ± 1.0 <sup>ao</sup> | Fp      | 60.0 ± 7.2 <sup>auc</sup> | 2.7 ± 0.4 <sup>dc</sup>  | 3.6 ± 1.1 <sup>ao</sup> | BL      | 62.2 ± 3.9 <sup>a</sup>  | 7.2 ± 1.9 <sup>ao</sup> | 10.0 ± 4.2 <sup>a</sup> | Lp, Fp  |
| Pr30 (dark gray)    | 56.7 ± 8.8 <sup>ao</sup>  | 2.0 ± 0.2 <sup>ao</sup>  | 2.2 ± 1.1 <sup>a</sup>  | Lp      | 56.7 ± 8.8 <sup>dc</sup>  | 6.1 ± 3.9 <sup>dc</sup>  | 2.1 ± 2.1 <sup>a</sup>  | BL      | 55.0 ± 12.2 <sup>a</sup> | 1.3 ± 0.2 <sup>a</sup>  | 3.1 ± 0.5 <sup>a</sup>  | -       |
| PMI_412 (dark gray) | 53.3 ± 6.7 <sup>ao</sup>  | 12.1 ± 3.0 <sup>c</sup>  | 18.3 ± 11 <sup>o</sup>  | Lp      | 66.7 ± 6.7 <sup>dc</sup>  | 1.3 ± 0.3 <sup>ao</sup>  | 4.6 ± 2.5 <sup>ao</sup> | Lp      | 66.7 ± 3.3 <sup>a</sup>  | 7.3 ± 2.5 <sup>o</sup>  | 7.0 ± 2.6 <sup>a</sup>  | Lp      |
| Pr28 (black)        | 66.7 ± 6.7 <sup>o</sup>   | 2.8 ± 0.2 <sup>auc</sup> | 4.8 ± 1.8 <sup>ao</sup> | Lp      | 55.0 ± 4.1 <sup>c</sup>   | 4.5 ± 0.4 <sup>auc</sup> | 9.7 ± 0.3 <sup>o</sup>  | Lp, Fp  | 56.7 ± 8.8 <sup>a</sup>  | 7.1 ± 2.7 <sup>o</sup>  | 4.7 ± 2.5 <sup>a</sup>  | Lp, Fp  |
| Pr27 (yellow-red)   | 33.3 ± 9.6 <sup>a</sup>   | 1.7 ± 0.7 <sup>a</sup>   | 5.6 ± 2.4 <sup>ao</sup> | Lp      | 55.0 ± 4.1 <sup>auc</sup> | 1.3 ± 0.3 <sup>a</sup>   | 0.5 ± 0.4 <sup>a</sup>  | Lp, BL  | 43.3 ± 16.7 <sup>a</sup> | 1.4 ± 1.0 <sup>a</sup>  | 1.2 ± 0.2 <sup>a</sup>  | Lp      |
| Pr29 (yellow-gray)  | 36.7 ± 12.6 <sup>d</sup>  | 2.3 ± 0.7 <sup>du</sup>  | 5.0 ± 2.5 <sup>du</sup> | Lp      | 53.3 ± 3.3 <sup>du</sup>  | 1.2 ± 0.2 <sup>d</sup>   | 1.4 ± 1.0 <sup>d</sup>  | Lp      | 40.0 ± 5.8 <sup>d</sup>  | 1.6 ± 0.3 <sup>d</sup>  | 4.2 ± 1.3 <sup>d</sup>  | Lp      |
| DSM 11827 (beige)   | 41.3 ± 7.9 <sup>d</sup>   | 4.1 ± 3.1 <sup>du</sup>  | NA                      | Ch      | 25.0 ± 4.1 <sup>d</sup>   | 1.0 ± 0.0 <sup>d</sup>   | NA                      | Ch      | nd                       | nd                      | nd                      | nd      |

Inoculated plants were grown for two weeks (ryegrass) or two months (birch & eucalyptus) on perlite substrate. Colonization frequency (F%), colonization intensity by hyphae (H%), and microsclerotia (MS%) are given as means (± SE) of 30 root fragments. Between brackets: color of fungal colonies growing on malt extract agar plates. BL: Brain-like sclerotia; Fp: Fully packed sclerotia; Lp: Loosely packed sclerotia; Ch: Chlamydospores; NA: not applicable; nd: not determined. Statistically significant differences (P<0.05, Kruskal-Wallis test) are indicated by different letters.

### 1.3.2. *Impacts of the carbon source and of metal on the growth of DSE isolates*

DSEs colonize root tissues, so they have access to a variety of carbon sources. We therefore investigated the use of various carbon compounds by the different strains. All strains produced measurable biomass on the soluble carbohydrates (**Table III-2**). However, their degradation ability was both carbon source- and strain-dependent. We used the *P. indica* DSM 11827 strain as a reference of endophytic fungi. Its growth was the highest on glucose and sucrose, but lower on the other carbon sources, especially on mannitol. The DSE strains displayed three distinct patterns. First, the carbon source did not significantly affect the growth of PMI\_412, Pr30, and Pr29. Second, growth of Pr28 on xylan and mannitol, as well as of Pr27 on fructose and mannitol was reduced by about 50% as compared to glucose. Finally, growth of Fe06, Me07, and Me10 was increased 1.7- to 2.3-fold by different carbon compounds. Fe06 growth was the highest on xylan, xylose and mannitol, whereas sucrose and maltose treatments significantly enhanced biomass production by Me07 and Me10, respectively.

The cellulose (Avicel), starch and lignin substrates were insoluble and adhered to mycelial pellets, artificially increasing mycelium weight at harvest. Therefore qualitative growth on cellulose, starch and lignin was solely evaluated, and was not compared to growth on other carbon sources (**Table III-2**). Whatever the strain, no growth was noted on lignin. Mycelial growth was evident for all strains on cellulose and starch, except Me07 on cellulose. To confirm the cellulolytic activity of the strains, an agar test was performed on plates containing carboxy-methyl cellulose (CMC). We measured the ratio of the diameter of the hydrolytic zone (degradation halo) over the diameter of the colony (**Table III-2**). Fe06 exhibited the highest cellulolytic ability with a ratio of 1.6, followed by Pr29, Pr28, PMI\_412 and DSM 11827 (1.3 to 1.5). No degradation halo was noted for Me07. Very low ratios (1.1) were recorded for Me10 and Pr30.

Since the DSE fungi were isolated from metal-contaminated soils, their metal tolerance was further assessed by determining MIC values for As, Cd, Mn, and Zn (**Table III-3**). Metal tolerance varied among strains and metal species. Me10, PMI\_412, and Pr30 were the least tolerant to As, with MICs ranging between 4 and 6 mM, whereas Me07 and DSM 11827 were the most tolerant with MICs of 25 and >30 mM, respectively. Me07 was also the most tolerant strain to Cd (MIC = 1.5 mM) and PMI\_412, Pr30, and DSM 11827 were the least tolerant ones. PMI\_412, Pr30, Pr28 were the most tolerant to Mn, and PMI\_412, Pr30, Pr28, and Pr27 were the most tolerant to Zn. Conversely, Pr27 and Pr29 were the least tolerant strains to Mn, and Pr29 the least tolerant to Zn.

**Table III-2: Utilization of different carbon substrates by the fungal strains.**

| Carbon sources         | Strains                      |                               |                                |                             |                              |                               |                               |                                |                               |
|------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
|                        | Fe06                         | Me07                          | Me10                           | PMI_412                     | Pr30                         | Pr28                          | Pr27                          | Pr29                           | DSM 11827                     |
| Cellulose <sup>1</sup> | +                            | -                             | +                              | +                           | +                            | +                             | +                             | +                              | +                             |
| Lignin <sup>1</sup>    | -                            | -                             | -                              | -                           | -                            | -                             | -                             | -                              | -                             |
| Starch <sup>1</sup>    | +                            | +                             | +                              | +                           | +                            | +                             | +                             | +                              | +                             |
| Xylan                  | 231 ± 34 <sup>e</sup>        | 100 ± 9 <sup>bd</sup>         | 108 ± 11 <sup>bd</sup>         | 96 ± 3 <sup>a</sup>         | 95 ± 8 <sup>a</sup>          | 49 ± 8 <sup>a</sup>           | 73 ± 14 <sup>abc</sup>        | 75 ± 12 <sup>bd</sup>          | 73 ± 13 <sup>bd</sup>         |
| Cellobiose             | 107 ± 5 <sup>bc</sup>        | 75 ± 15 <sup>a</sup>          | 69 ± 10 <sup>a</sup>           | 102 ± 17 <sup>a</sup>       | 81 ± 5 <sup>a</sup>          | 74 ± 5 <sup>b</sup>           | 73 ± 19 <sup>abc</sup>        | 73 ± 17 <sup>bd</sup>          | 60 ± 4 <sup>bc</sup>          |
| Maltose                | 116 ± 5 <sup>bd</sup>        | 109 ± 9 <sup>bd</sup>         | 166 ± 25 <sup>c</sup>          | 124 ± 9 <sup>a</sup>        | 112 ± 9 <sup>a</sup>         | 85 ± 2 <sup>dc</sup>          | 89 ± 18 <sup>dc</sup>         | 86 ± 2 <sup>bd</sup>           | 91 ± 4 <sup>d</sup>           |
| Sucrose                | 131 ± 36 <sup>d</sup>        | 190 ± 30 <sup>c</sup>         | 99 ± 15 <sup>bd</sup>          | 110 ± 11 <sup>a</sup>       | 112 ± 11 <sup>a</sup>        | 114 ± 7 <sup>c</sup>          | 100 ± 9 <sup>c</sup>          | 114 ± 15 <sup>d</sup>          | 103 ± 5 <sup>e</sup>          |
| Fructose               | 74 ± 2 <sup>a</sup>          | 125 ± 4 <sup>dc</sup>         | 96 ± 22 <sup>bd</sup>          | 103 ± 12 <sup>a</sup>       | 95 ± 5 <sup>a</sup>          | 82 ± 8 <sup>d</sup>           | 47 ± 2 <sup>a</sup>           | 69 ± 10 <sup>bd</sup>          | 84 ± 4 <sup>d</sup>           |
| Glucose                | 100 ± 3 <sup>bd</sup> (55.5) | 100 ± 19 <sup>bd</sup> (79.3) | 100 ± 15 <sup>bd</sup> (101.3) | 100 ± 3 <sup>a</sup> (92.3) | 100 ± 26 <sup>a</sup> (67.1) | 100 ± 19 <sup>dc</sup> (86.9) | 100 ± 11 <sup>c</sup> (111.1) | 100 ± 21 <sup>bd</sup> (130.6) | 100 ± 4.8 <sup>e</sup> (71.5) |
| Mannitol               | 188 ± 19 <sup>de</sup>       | 91 ± 2 <sup>bd</sup>          | 121 ± 1 <sup>dc</sup>          | 110 ± 11 <sup>a</sup>       | 90 ± 9 <sup>a</sup>          | 46 ± 5 <sup>a</sup>           | 55 ± 7 <sup>bd</sup>          | 64 ± 2 <sup>a</sup>            | 25 ± 2 <sup>a</sup>           |
| Xylose                 | 188 ± 24 <sup>de</sup>       | 101 ± 9 <sup>bd</sup>         | 81 ± 3 <sup>bd</sup>           | 106 ± 6 <sup>a</sup>        | 93 ± 5 <sup>a</sup>          | 73 ± 5 <sup>d</sup>           | 94 ± 6 <sup>c</sup>           | 90 ± 11 <sup>bd</sup>          | 65 ± 2 <sup>c</sup>           |
| CMC <sup>2</sup>       | Growth                       | 3.1 ± 0.12                    | 3.1 ± 0.05                     | 3.0 ± 0.10                  | 4.8 ± 0.10                   | 2.1 ± 0.47                    | 3.6 ± 0.03                    | 3.7 ± 0.1                      | 4.1 ± 0.27                    |
|                        | Halo                         | 4.9 ± 0.20                    | 3.0 ± 0.03                     | 3.4 ± 0.15                  | 5.6 ± 0.03                   | 2.2 ± 0.49                    | 5.0 ± 0.13                    | 4.3 ± 0.19                     | 5.3 ± 0.18                    |
|                        | Ratio                        | 1.6 ± 0.05 <sup>f</sup>       | 1.0 ± 0.01 <sup>a</sup>        | 1.1 ± 0.01a <sup>dc</sup>   | 1.3 ± 0.02b <sup>c</sup>     | 1.1 ± 0.05 <sup>bd</sup>      | 1.4 ± 0.02 <sup>de</sup>      | 1.2 ± 0.06 <sup>dc</sup>       | 1.3 ± 0.05 <sup>cd</sup>      |

Values (expressed as %) represent relative fungal growth after two weeks of culture on a specific carbon source as compared to growth on glucose used as a control. Values between brackets represent fungal dry biomass (mg) in minimum liquid medium supplemented with glucose. Statistically significant differences between carbon sources are indicated by different letters (P<0.05, Kruskal-Wallis test).

<sup>1</sup>Due to the non-solubility of the compounds, the degradation ability was considered as positive when the strain displayed more than 5 mm mycelial development around the initial plugs and formation of new small fungal pellets as compared to the negative control (glucose) (+: growth, -: absence of growth).

<sup>2</sup>Carboxy-methyl cellulose (CMC) solubilization by the endophytic strains was recorded on agar plates after two weeks of growth. The solubilization index was calculated as the “diameter of the solubilization halo” over “diameter of the colony” ratio. Values are the means of three replicates ± SE. Statistically significant differences (P<0.05, Kruskal-Wallis test) are indicated by different letters.

**Table III-3: Metal tolerance of the DSE strains.**

| Strains   | MIC (mM) |     |    |     |
|-----------|----------|-----|----|-----|
|           | As       | Cd  | Mn | Zn  |
| Fe06      | 10       | 0.6 | 9  | 9   |
| Me07      | 25       | 1.5 | 9  | 7   |
| Me10      | 6        | 0.5 | 6  | 5   |
| PMI_412   | 4        | 0.2 | 12 | >12 |
| Pr30      | 6        | 0.3 | 12 | 10  |
| Pr28      | 14       | 0.5 | 12 | 12  |
| Pr27      | 16       | 0.4 | 5  | 10  |
| Pr29      | 14       | 0.5 | 3  | 3   |
| DSM 11827 | >30      | 0.3 | 9  | 9   |

MIC is the minimum inhibitory concentration of metal that completely inhibited fungal growth.

### **1.3.3. Plant-growth-promoting properties**

IAA production by DSEs grown in liquid CM medium with or without tryptophan, the IAA precursor, was examined by colorimetric assays (**Table III-4**). No IAA was recovered in the tryptophan-free treatments. Conversely, all strains produced IAA in medium supplemented with tryptophan. Most of the strains produced similar concentrations of IAA. IAA production ranged between 106 µg/(g dry wt) for Pr27 and 581 µg/(g dry wt) for PMI\_412. However, statistically significant differences were only found for Pr30 and PMI\_412 relatively to Pr27.

**Table III-4: Plant growth-promoting properties of the DSE strains.**

| Strains   | IAA production <sup>1</sup> (μM/g dry wt) | Tobacco SFW <sup>2</sup> (mg) |
|-----------|-------------------------------------------|-------------------------------|
| Control   | -                                         | 75 ± 2 <sup>a</sup>           |
| Fe06      | 277 ± 35 <sup>ab</sup>                    | 95 ± 3 <sup>f</sup>           |
| Me07      | 245 ± 9 <sup>ab</sup>                     | 80 ± 5 <sup>ab</sup>          |
| Me10      | 262 ± 34 <sup>ab</sup>                    | 87 ± 2 <sup>d-f</sup>         |
| PMI_412   | 581 ± 26 <sup>6b</sup>                    | 90 ± 3 <sup>ef</sup>          |
| Pr30      | 401 ± 64 <sup>b</sup>                     | 91 ± 2 <sup>ef</sup>          |
| Pr28      | 296 ± 166 <sup>ab</sup>                   | 78 ± 2 <sup>a</sup>           |
| Pr27      | 106 ± 35 <sup>a</sup>                     | 81 ± 2 <sup>a-c</sup>         |
| Pr29      | 271 ± 23 <sup>ab</sup>                    | 88 ± 5 <sup>c-e</sup>         |
| DSM 11827 | nd                                        | 91 ± 4 <sup>ef</sup>          |

<sup>1</sup>IAA production was measured in liquid growth medium after two weeks of culture in minimal medium supplemented with tryptophan (n=3).

<sup>2</sup>Production of volatile organic compounds (VOCs) was determined by measuring the shoot fresh weight (SFW) of one-month-old tobacco seedlings in the absence or presence of DSEs (n=36).

Values are the means (± SE). Statistically significant differences (P<0.05 Kruskal-Wallis test) are indicated by different letters. nd: not determined.

Nine strains were screened for their growth promotion effect on *N. tabacum* seedlings (**Table III-4**). The partners were grown for one month in 24-well microplates without any physical contact. No strain showed deleterious effects on tobacco growth. Tobacco biomass was not affected by Pr28, Pr27, or Me07, but was significantly increased by the other strains (**Table III-4**). The highest growth promotion was recorded with Fe06 co-cultures, with a 21% increase in shoot biomass as compared to the fungus-free treatment. To determine the nature of the VOCs emitted by Pr30 and Fe06, SPME-GCMS analyses were performed with one month-old DSE cultures. The major VOCs (*i.e.* those with a relative proportion greater than 1%) are given in **Table III-5**. These compounds were absent from mock-inoculated vials. Altogether, seven major VOCs were identified by comparison with the NIST database. Ethyl acetate, 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol, and styrene were emitted by both strains. The relative proportion of each compound was similar between the two strains. Among these four compounds, ethyl acetate was the most produced. Pr30 emitted two other compounds. 1,3 cyclopentadiene, 1-3 bis was produced in the same proportion as ethyl acetate, whereas β-chamigrene was present in a similar proportion to styrene. These two compounds were not synthesised by Fe06, but Fe06 emitted a fifth compound (cyclohexene, 1-ethyl) in a similar proportion to n-methyl-1-butanol (n= 2 or 3).

**Table III-5: Identification of VOCs synthesized by strains Fe06 and Pr30 by SPME-GCMS.**

| Compounds                                                     | Pr30      |                         |         | Fe06           |                         |         | Molecular weight |
|---------------------------------------------------------------|-----------|-------------------------|---------|----------------|-------------------------|---------|------------------|
|                                                               | Retention | relative %              | Quality | Retention time | relative %              | Quality |                  |
| Ethyl acetate (C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ) | 1.9       | 33.6 ± 4.7 <sup>c</sup> | 43      | 1.9            | 40.0 ± 1.0 <sup>c</sup> | 78      | 88               |
| 3-methyl-1-butanol (C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O)         | 3.6       | 12.1 ± 2.0 <sup>b</sup> | 64      | 3.6            | 18.4 ± 5.0 <sup>b</sup> | 64      | 88               |
| 2-methyl-1-butanol (C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O)         | 3.7       | 13.3 ± 2.2 <sup>b</sup> | 83      | 3.7            | 19.8 ± 3.7 <sup>b</sup> | 83      | 88               |
| Styrene (C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> )                      | 7.4       | 4.1 ± 1.2 <sup>a</sup>  | 22      | 7.7            | 5.1 ± 1.1 <sup>a</sup>  | 64      | 104              |
| β-chamigrene (C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> )               | 9.7       | 3.0 ± 0.3 <sup>a</sup>  | 80      | -              | -                       | -       | 150              |
| 1,3-cyclopentadiene 1,3bis (C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> ) | 10.2      | 33.9 ± 3.1 <sup>c</sup> | 58      | -              | -                       | -       | 150              |
| Cyclohexene, 1-ethyl (C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> )        | -         | -                       | -       | 12.0           | 15.4 ± 3.6 <sup>b</sup> | 72      | 110              |

Fungi were grown for two weeks in glass vials containing MEA medium. The compounds corresponding to the major peaks (area > 1%) are presented as relative percentages. Values are means ± SE (n=9). Statistically significant differences (P<0.05. Kruskal-Wallis test) are indicated by different letters.

**Table III-6: Two-way ANOVA results comparing the effects of plant, strain, plant x strain interactions on root colonization by DSEs (colonization frequency (F%), colonization intensity by hyphae (H%), and microsclerotia (MS%)).**

|                | F%      |        | H%      |        | MS%     |        |
|----------------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|
|                | F value | Pr(>F) | F value | Pr(>F) | F value | Pr(>F) |
| Plant          | 1.54    | 0.227  | 2.13    | 0.131  | 2.56    | 0.089  |
| Strain         | 2.11    | 0.063  | 4.17    | 0.001* | 4.24    | 0.001* |
| Plant x Strain | 0.53    | 0.892  | 1.53    | 0.148  | 0.92    | 0.542  |

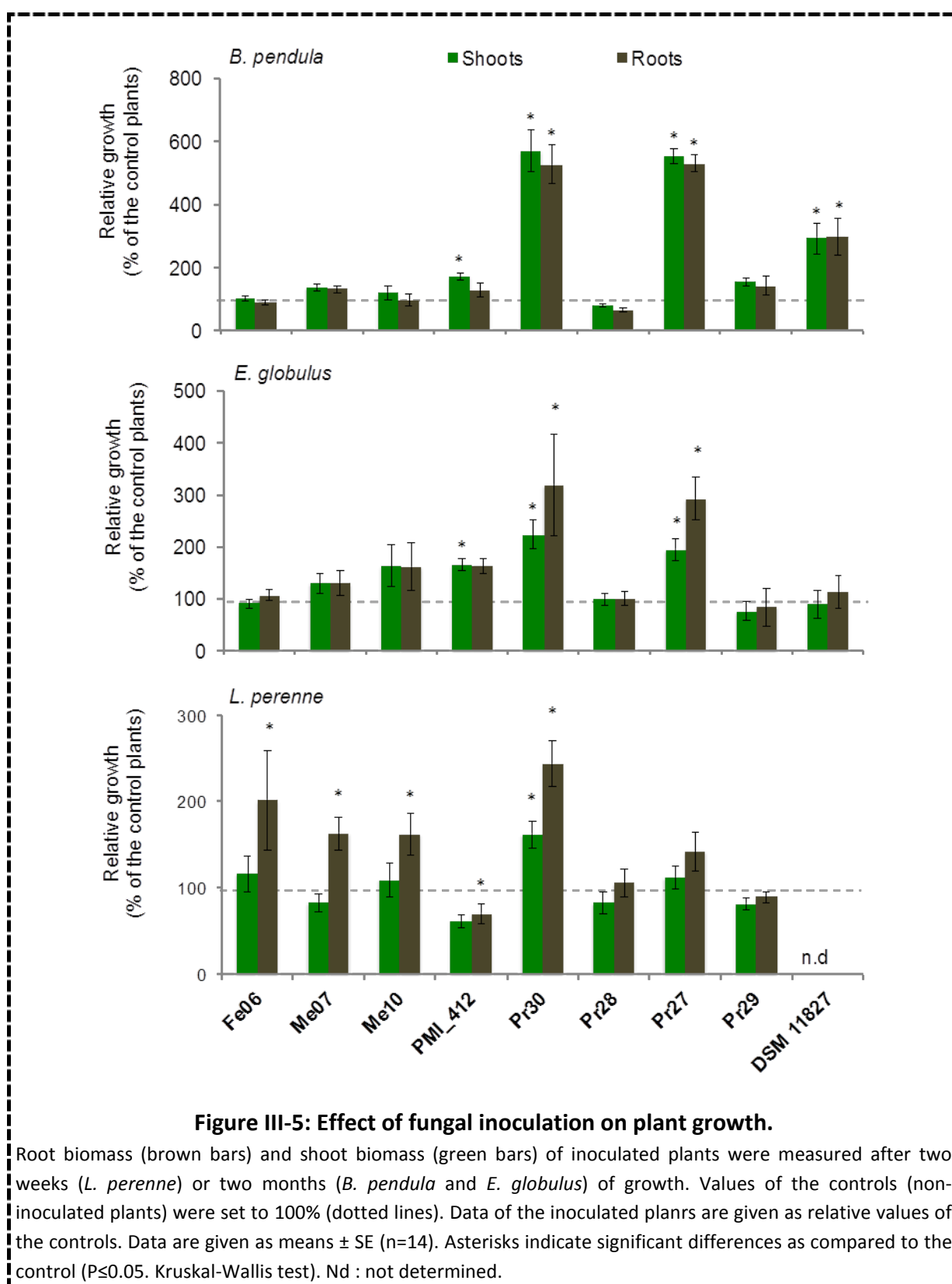
Significant differences are indicated by \*, P<0.01.

#### 1.3.4. Effect of DSEs on plant growth

To assess the effect of DSEs on plant growth, *B. pendula*, *E. globulus* and *L. perenne* were inoculated with each of the eight DSE strains and harvested after two (*L. perenne*) or eight weeks (*B. pendula*, *E. globulus*). *P. indica* was used as an endophytic reference. Microscopic observations of roots revealed the presence of fungal structures (**Figure III-3**) whereas the non-inoculated plants were fungus-free. All strains colonized the roots of the different plants (**Table III-1**), formed microsclerotia (**Figure III-3**), and spread in both the root epidermal and cortical cells. Three types of microsclerotia (**Figure III-3**), namely brain-like (**Figure III-3 a**), loosely packed (**Figure III-3 d, h**), and fully packed microsclerotia (**Figure III-3 i**) were identified in the roots of the different plants. Several strains produced different types of microsclerotia according to the plant species they colonized (**Figure III-3**). Hyaline and septate hyphae were also observed in the root hairs of ryegrass inoculated with Pr28 (**Figure III-3 g**) and Me07 (data not shown). Ryegrass roots inoculated with Me07 (data not shown) and Pr30 (**Figure III-3 b**) were also colonized by hyphae in vascular parenchyma tissues, but the cells were not degraded. Moreover microsclerotia formed by Me07 were also detected in these tissues. *P. indica* DSM 11827 formed typical chlamydospores in birch and eucalyptus roots (**Figure III-3 e**). Two-way ANOVA results revealed no significant differences among plant species or for the interaction between plant species and fungal strains for any of the three root colonization parameters (F%, H% and MS%) (**Table III-6**). However, there were significant differences among fungal strains for H% and MS% (**Table III-6**). All plants taken together, Pr28 and PMI\_412 were the best colonizing strains, while Pr27 was the least effective (Kruskal-Wallis test,  $P < 0.05$ ). Pr28- and Me10-inoculated plants displayed the highest colonization frequencies in birch roots (F% = 66.7% and 60%, respectively), whereas eucalyptus roots displayed the highest colonization frequencies when inoculated with Fe06 (**Table III-1**). Generally DSE-inoculated plants were more intensively colonized than *P. indica*-inoculated plants. The colonization frequency of ryegrass was similar with all DSEs. Results for microsclerotia indices (MS%) were similar. PMI\_412 significantly produced more microsclerotia than Me07 and Pr30 in birch roots. Similarly, more microsclerotia were observed in Pr28-inoculated eucalyptus roots than in Me07-, Pr30-, Pr27-, and Pr29-inoculated ones.

Shoot and root dry weights of birch and eucalyptus inoculated with Pr30 and Pr27 were three- to five-fold higher than those of the non-inoculated controls (**Figure III-5**). PMI\_412 also promoted birch and eucalyptus shoot growth, but to a lesser extent. The endophytic reference strain DSM 11827 promoted both shoot and root growth of birch, but did not affect eucalyptus growth. The other strains did not significantly alter tree seedling growth. In *L. perenne*, four strains had a positive effect on root growth, and Pr30 also significantly increased shoot growth. Root dry weight of ryegrass inoculated with Me07 and Me10 reached 160% of the non-inoculated control value set to 100%. Root growth of Fe06-inoculated seedlings was doubled as compared to the control. Conversely, inoculation with PMI\_412 significantly decreased root biomass of *L. perenne*. There was no correlation

between plant growth and root colonization intensity (Pearson test,  $P=0.5$  for F%;  $P=0.9$  for MS%, and  $P=0.9$  for H%).



## 1.4. Discussion

### 1.4.1. Isolation of metal-tolerant DSEs from poplar

DSEs represent a polyphyletic group of ascomycetes, with members distributed in the Helotiales, Pleosporales, Sordariales or Pezizales orders (Grünig *et al.* 2011). In the present study, the seven DSE strains isolated from poplar all belonged to the Helotiales order, but to two different groups. *Phialocephala* Pr28 belonged to the *Mollisia*, *Phaeomollisia* and *Vibrissea* (MPV) group, whereas the other six strains (as well as PMI\_412) belonged to another group clustering with the well-known *L. orchidicola* and several *Cadophora* species. Whereas strains belonging to the *Leptodontidium*, *Cadophora* and *Phialocephala* genera had a typical DSE grey to black phenotype on agar medium, the *Phialophora* strains had orange to red colors. However, the distinction based on the degree of pigmentation is often arbitrary because pigment strength varies greatly in some species (Hambleton and Sigler 2005), especially in mycelium of colonized roots (Yu *et al.* 2001; Barrow 2003). These four genera are known colonizers of tree roots, and to a lesser extent of herbaceous plants (Jumpponen and Trappe 1998a; Yu *et al.* 2001; Grünig *et al.* 2008; Peterson *et al.* 2008; Likar and Regvar 2009; Knapp *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2013; Op De Beeck *et al.* 2015). However, few studies have evidenced the presence of DSEs in poplar roots by microscopy (Beauchamp *et al.* 2005; Krpata *et al.* 2008; Gehring *et al.* 2014). Except *Cadophora*, *Exophiala* and *Leptodontidium* isolated from poplar roots (Bonito *et al.* 2016), molecular identification is still lacking, and DSE strains have not yet been isolated.

DSEs are abundant on highly metal-enriched locations. For example, *Phialophora* sp., *Phialocephala* sp. and *Leptodontidium* sp. were identified and/or isolated from Chinese and European metal-polluted sites (Ban *et al.* 2012; Likar and Regvar 2013; Zhang *et al.* 2013). Similarly, *Cadophora* sp. was also found in Zn/Cd-polluted soils, in pine roots from a Zn/Cd polluted site in Belgium, and in a metal-polluted soil in Austria (Utmazian *et al.* 2007; Op De Beeck *et al.* 2015). We also isolated DSEs from Cd-, Zn- and Pb-contaminated soils and tested their tolerance to these metals as well as to As and Mn. Although our work focused on only a few strains, we noted that metal tolerance was strain- and metal-dependent and did not seem to be related to the metal concentration in the soil of origin. Such variations between DSE strains have been reported in different studies (Zhang *et al.* 2008; Ban *et al.* 2012; Likar and Regvar 2013). These differences could be explained by the presence/absence of different tolerance mechanisms, e.g. efflux systems or vacuolar compartmentalization, or by various levels of expression of genes/proteins involved in these mechanisms (Ban *et al.* 2012; Zhan *et al.* 2014; Shen *et al.* 2015; Zhan *et al.* 2015). Several studies report that under severe metal contamination, the rate of root colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi decreases but remains unaffected for DSEs (Ruotsalainen *et al.* 2007; Likar and Regvar 2009; Deram *et al.* 2011). The relatively high metal tolerance of DSEs could be related to the high melanin content in their cell walls. Melanin contains carboxyl, phenolic, hydroxyl and amine groups that provide many potential binding or biosorption sites for metal ions, ensuing immobilization of metals on cell walls, and decreased metal toxicity (Fogarty and Tobin 1996; Bellion *et al.* 2006; Zhan *et al.* 2011).

However, DSEs and other endophytic strains forming white/cream colonies have comparable MIC values. This was the case for *P. indica* (this study) and endophytic *Helotiales* (Lacercat-Didier *et al.* 2016). Therefore the role of melanin in the high metal tolerance of dark-pigmented strains still requires further genetic evidence. Moreover, experiments are also needed to determine whether root colonization by DSEs is less affected by metal stress than AM or ECM symbiosis in the same soils.

#### **1.4.2. Degradation of cell-wall-related compounds**

The isolated DSEs usually grew better on a larger set of C compounds than the endophytic model *P. indica*. The best evidence was with mannitol, where *P. indica* growth was strongly limited as compared to DSEs. We also investigated the ability of the strains to degrade complex carbon compounds. Laccases are involved in lignin degradation. DSEs, especially *Periconia* and *Microdochium* can display high laccase activity (Mandyam *et al.* 2010). However, we found no evidence for lignin degradation in any of our strains. This inability could be explained by the lack of one or several enzymes of the lignin degradation pathway. Xylan is a hemicellulose compound that is degraded into xylose by xylanase activity and subsequently into glucose by xylosidase activity. All strains grew on xylan, xylose, and glucose as sole carbon sources, suggesting that these strains can entirely degrade xylan. All strains but Me07 degraded Avicel cellulose, CMC, and cellobiose. These results suggest the production of cellobiohydrolase, endoglucanases, and  $\beta$ -glucosidases enabling the complete hydrolysis of cellulose into glucose. Interestingly, the capacity of *Cadophora*, *Leptodontidium* PMI\_412, *Phialophora* and *Phialocephala* to grow on Avicel cellulose or to degrade CMC was similar to that of *P. indica*. However, complete hydrolysis of cellulose is expected, as these enzymes are presumably required for root cell penetration. *Leptodontidium* Me07 did not grow on Avicel cellulose and produced a minute CMC degradation halo. This result may reflect a difference in cellobiohydrolase or cellulase activity as compared to the other DSEs. Another possibility is that the forms of cellulose (Avicel, CMC) were not optimal for this strain. These fungi exclusively colonize root tissues, so their lifestyle requires several enzymes to degrade cell wall components (Rodriguez *et al.* 2009). But, as detailed below, re-synthesis experiments can best demonstrate the fungal capacity to enter root cells.

#### **1.4.3. Root colonization by DSEs and impact on plant growth**

Three types of microsclerotia were observed in roots: fully packed, loosely packed, and brain-like microsclerotia. Loosely packed microsclerotia were the most abundant structure across all treatments. We therefore report for the first time that a given DSE strain can form various types of microsclerotia when associated to different plant species, but also within a same plant species. Little information is available about the diversity and function of the different types of microsclerotia (Yu *et al.* 2001). Therefore more experiments are required to state which of the following factors – DSE strain, plant species, or environment –

is uppermost in shaping microsclerotium type. Root colonization by DSEs has been reported to cause a variety of host responses ranging from pathogenic to mutualistic interactions (Jumpponen 1998). A few studies report a positive impact of *Leptodontidium*, *Cadophora* and *Phialocephala* on the growth of woody and herbaceous plants (Andrade-Linares *et al.* 2011; Newsham 2011; Khastini *et al.* 2014). In our study, several *Leptodontidium* and *Cadophora* strains also enhanced plant growth. Additionally, *P. mustea* Pr27 promoted birch and eucalyptus growth. To our knowledge, this is the first report about plant growth promotion by *P. mustea*.

Surprisingly, two *Leptodontidium* strains (Me07 and Pr30) colonized the vascular stele of ryegrass, as in roots of *Salix glauca* and *Asparagus officinalis* colonized by *L. orchidicola* and *P. fortinii*, respectively (Fernando and Currah 1996; Yu, Nassuth and Peterson 2001). Necrosis of the stele tissues of *Salix* roots was evident, so the authors suggested a parasitic lifestyle for *Leptodontidium* in that association. However, in the present study, we did not notice any cell damage in ryegrass roots, and both strains enhanced ryegrass growth. Cumulatively, these results suggest that, under our experimental conditions, *Leptodontidium* acted more as a mutualistic fungus than as a parasite.

Plant growth promotion was strain-dependent since different host responses were observed as a result of inoculation by different *Leptodontidium* and *Phialophora* strains. Fernando and Currah (1996) also showed that inoculation by four strains of *L. orchidicola* induced variable effects on *Salix* and *Picea* growth. Inoculation of *Arabidopsis thaliana* with different strains of *Periconia* or *Microdochium* yielded similar results (Mandyam *et al.* 2013). We hypothesized that the different strains could colonize roots in quantitatively different manners and consequently produce different responses. This hypothesis prompted us to investigate the levels of root colonization by DSEs in the different plants. The three plant species were colonized whatever the DSE strain used in the inoculum. This experiment therefore demonstrates that DSEs have a broad host specificity spanning monocots and dicots, including woody species. Additionally, as observed previously on AM fungi, we found no correlation between plant growth and the intensity of root colonization by DSEs (Hildebrandt *et al.* 2007). This result suggests that growth promotion was more probably strain-dependent. However, additional experiments under different experimental conditions are needed to fully demonstrate this statement. More particularly, soil nutrient levels could influence plant responses when plants are associated to DSEs. DSEs could promote plant growth by enhancing nitrogen, carbon and/or phosphorus nutrition (Caldwell *et al.* 2000; Barrow and Osuna 2002; Mandyam and Jumpponen 2005; Usuki and Narisawa 2007; Upson *et al.* 2009). For example, in response to N fertilization, *Pinus contorta* growth response to *Phialocephala fortinii* inoculation switched from neutral to positive (Jumpponen *et al.* 1998).

#### **1.4.4. Plant-growth-promoting abilities**

To gain further insight into DSE-related growth promotion, we analyzed the ability of the strains to secrete IAA and to release VOCs. IAA production was monitored in the culture medium. The results suggested the existence of IAA biosynthesis pathways in all strains.

Several studies report that endophytic fungi produce IAA (e.g. *C. globosum*, *P. glomerata* sp., *Penicillium* sp., and *P. indica*) (Sirrenberg *et al.* 2007; Khan *et al.* 2012). Secretion of auxin by hyphae could contribute to increasing plant biomass (Khan *et al.* 2012; Waqas *et al.* 2012; Sukumar *et al.* 2013). Synthesis of fungal-derived IAA could play key roles in root and shoot development, increase the root surface absorption area with resulting better water and nutrient uptake, and promote root colonization by other fungi (Hilbert *et al.* 2012; Sukumar *et al.* 2013).

VOCs are low-molecular-weight compounds that can easily diffuse through the soil and the atmosphere. Their functions and exact mechanisms of action are poorly understood (Kramer and Abraham 2012; Lemfack *et al.* 2014). However, several authors suggest a major role of VOCs emitted by rhizospheric and endophytic fungi in plant growth promotion (Hung, Lee and Bennett 2013; Naznin *et al.* 2013; Paul and Park 2013). That is why we further tested whether DSEs could also promote plant growth by releasing VOCs. A microplate culture system was used to restrict physical contact between fungi and seedlings and only allow for gaseous exchanges. Interestingly, five strains enhanced the growth of tobacco seedlings, demonstrating that DSEs can also promote plant growth without any physical contact. This promoting effect could be explained by the release of phytostimulant VOCs and/or by the presence of additional respiration-derived CO<sub>2</sub> increasing photosynthesis (Jumpponen and Trappe 1998b; Naznin *et al.* 2013). Although we did not measure the final CO<sub>2</sub> concentration, it is unlikely that CO<sub>2</sub> concentrations alone accounted for the total increase in biomass accumulation. A more probable explanation is that growth promotion resulted from a combination between the VOCs released by the fungi and the elevated CO<sub>2</sub> concentration (Naznin *et al.* 2013). VOC nature was characterized for the two strains that best promoted tobacco growth. To our knowledge, this is the first detailed analysis of VOCs produced by DSEs. Both strains produced hydrocarbon-like molecules with C<sub>4</sub> to C<sub>15</sub> skeletons, and with alcohol derivatives such as 2-methyl-1-butanol and 3-methyl-1-butanol. These compounds were identified among the major VOCs emitted by different fungi and likely play key roles in plant growth promotion (Strobel *et al.* 2001; Naznin *et al.* 2013; Paul and Park 2013). However the complete set of VOCs differed between the two strains, suggesting that VOC emission is species- or strain-dependent, as demonstrated before for saprophytic, ECM, and endophytic fungi (Bäck *et al.* 2010).

### 1.5. Conclusion

In the context of fungus-assisted phytomanagement of polluted sites, we successfully isolated six plant-growth-promoting DSE strains from metal-contaminated sites. Based on their ability to colonize different plants, to promote plant growth, and on their metal tolerance, we suggest that DSE inoculants could be used to sustainably improve growth of trees or other bioenergy crops on rehabilitated brownfields. Further studies using DSE inoculation of birch and poplar in metal-contaminated soils are currently under way. More

generally, and due to the broad host specificity of these fungi, they could also be used as plant growth promoting fungi in horticulture or agriculture.

## 2. Identification of dark septate endophytes with synergistic effects on endophytic and ectomycorrhizal fungi and antagonistic effects on root phytopathogens

### Abstract

Dark septate root endophytes are widely distributed throughout the world and can promote plant growth. Therefore they are regarded as potential important plant allies especially in stressed environments. Previous studies reported that DSE are associated in roots with other microorganisms such as ectomycorrhizal (ECM), endophytic and pathogenic fungi or oomycetes. However, studies on the interactions between these microorganisms are still scarce. Using a simple and reproducible pairwise growth assay *in vitro*, we studied the synergistic/antagonistic interactions between eight DSE, the reference endophytic fungus *Piriformospora indica*, two ECM and three root pathogenic fungi. Interestingly, we identified several strains acting in synergy with others as well as strains that potentially could act as biocontrol agents. Notably three DSE strains belonging to *Cadophora* sp., *Leptodontidium* sp. and *Phialophora mustea* could decrease the growth of the root phytopathogens *Pythium ultimum*, *Phytophthora citricola* and *Heterobasidion annosum*. Our results highlight the importance to take into account both the synergistic and antagonistic interactions between DSE and ECM strains before selecting several strains to be pooled in a fungal inoculum.

### 2.1. Introduction

Dark septate endophytes (DSE) are ascomycetous fungi with black septate hyphae that are frequent root colonizers of healthy plants. They may promote plant growth and fitness through the improvement of plant nutrition and stress tolerance. For instance, DSE could increase the uptake of nitrogen and phosphorus by host plants, and improve their growth, chlorophyll concentration and transpiration rate (Caldwell, Jumpponen and Trappe 2000; Upson, Read and Newsham 2009; Likar and Regvar 2013). Moreover, they also play a key role in plant protection against abiotic (*e.g.* drought, salinity and pollution) and biotic stress (*e.g.* plant pathogens) (Mandyam and Jumpponen 2005; Likar and Regvar 2013). DSE are widespread: they have been observed in roots of more than 600 species spanning 100 plant families (Jumpponen and Trappe 1998a). They have been isolated from herbaceous to woody plants. Notably, DSE have been isolated from non-mycorrhizal plants but also in plants in symbiosis with arbuscular, ericoid, orchid or ectomycorrhizal fungi (Jumpponen and Trappe 1998a; Mandyam and Jumpponen 2005). Generally, they do not exhibit any host specificity. As DSE are common in roots of a large diversity of plants and environments, they usually interact with other root microorganisms. For instance, root observations related the presence of DSE together with plant growth promoting fungi (PGPF) such as mycorrhizal or endophytic fungi (Vaz *et al.* 2012; Massenssini *et al.* 2014; Op De Beeck *et al.* 2015).

However, previous studies almost entirely focused on a given fungus and its impact on plant growth and protection against different stress. Few studies highlighted the possible interactions between DSE and other root-inhabiting fungi (Reininger and Sieber 2012; Reininger, Grunig and Sieber 2012; Shahabivand *et al.* 2012; Della Monica *et al.* 2015). So far, interactions between fungi were studied mainly for mycorrhizal fungi, indicating inhibitory to synergistic effects, thus modifying their potential for plant growth promotion (Cano and Bago 2005; Fryar *et al.* 2005; Pereira *et al.* 2012). As a first step to select suitable fungal consortia for plant biomass improvement and protection, it is necessary to quantify the synergistic/antagonistic relationships occurring between these fungi. In the present study, we used a simple and easily reproducible *in vitro* assay to conduct dual co-cultures of DSE or DSE in combination with ectomycorrhizal (ECM), endophytic, or pathogenic fungi and study synergistic/antagonistic effects between these fungi.

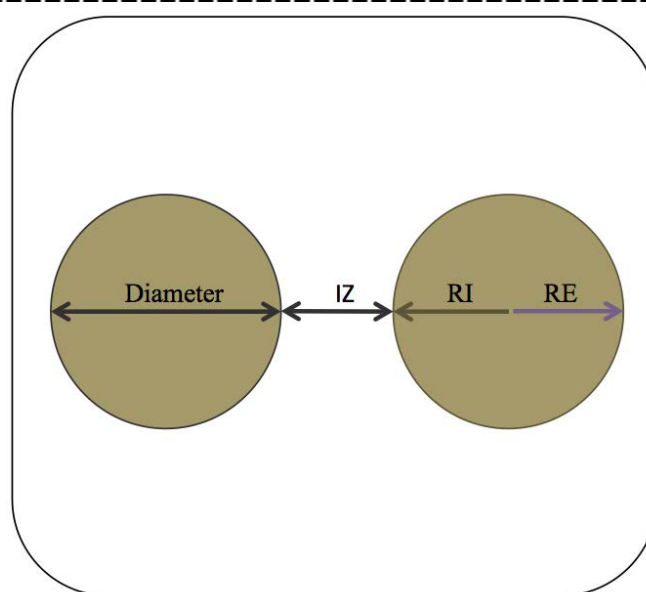
## **2.2. Material and methods**

### **2.2.1. Strains**

Twelve fungal strains and two Oomycetes were used in the present study (**Table III-7**). Details on the species, their origin and accession numbers are reported in **Table III-7**. The strains were cultured on malt extract agar (MEA) medium (malt extract 12g/l; 15g/l agar) at 24°C in the dark. In order to pinpoint the interactions between the fungi, co-cultures were carried out in Petri dishes (diameter of 13.5 cm) containing 45 ml of MEA medium. Each plate was inoculated with two 8 mm diameter discs of 2-week-old mycelia. The fungal plugs were deposited 4 cm from the border of the Petri dish (**Figure III-6**). Control plates consisted of two plugs of the same fungus. Four replicates per combination were set up. Due to the fast growth of the three pathogenic fungi, co-cultures involving these fungi were carried out with the same protocol as described above except that pathogenic fungal plugs were brought on agar medium one week after the other fungi. After two weeks of growth, the inhibition zone (defined as the distance between the two strains), the diameter, the internal and external radius of the colonies, and the ratio between the internal and the external radius were measured and compared to controls.

### **2.2.2. Statistical analyses**

Statistical analyses were performed with R 3.1.3 (R Core Team 2013) software. Normality of the data was tested using a Shapiro-Wilk test. Correlation between the measured parameters was evaluated with a PCA analysis using the FactomineR package. Data were then analyzed by one-way non-parametric Kruskal-Wallis test ( $\alpha = 0.05$ ). Percentage values were *arcsin* transformed before statistical analyses.



**Figure III-6: Parameters to evaluate the interactions between the fungal strains.**

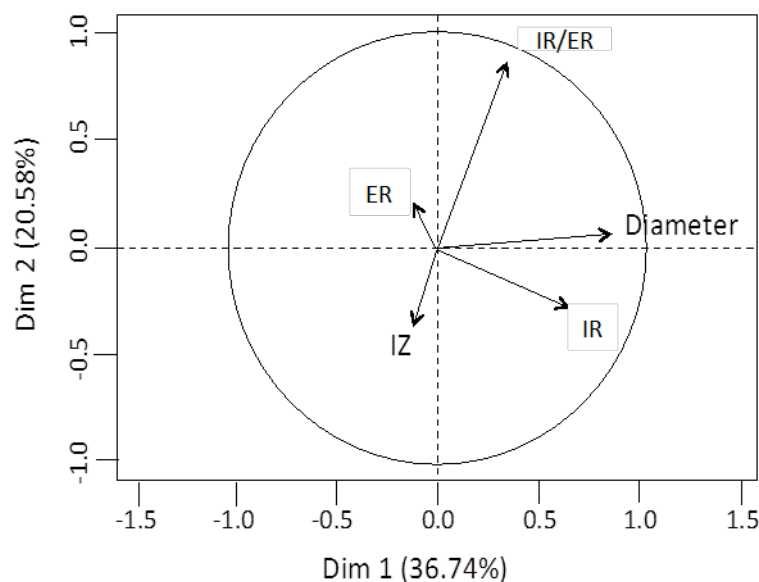
The scheme represents the experimental design of the pairwise assay with the parameters: IR and ER are respectively the internal and external radius, IZ is the inhibition zone between the two strains.

**Table III-7: Taxonomic affiliation of DSE, ECM and pathogenic strains.**

| Strains     | Taxonomic affiliation          | Lifestyle | Ac. number | References                     |
|-------------|--------------------------------|-----------|------------|--------------------------------|
| ATCC 200175 | <i>Paxillus involutus</i>      | ECM       | PRJNA60449 | (Kohler <i>et al.</i> 2015)    |
| D2          | <i>Hebeloma cylindrosporum</i> | ECM       | JQ751210   | (Debaud and Gay 1987)          |
| LNPV394     | <i>Heterobasidion annosum</i>  | Pathogen  | -          | -                              |
| Cit3        | <i>Phytophthora citricola</i>  | Pathogen  | -          | -                              |
| Pyint1      | <i>Pythium ultimum</i>         | Pathogen  | -          | -                              |
| Me07        | <i>Leptodontidium</i> sp.      | DSE       | KU886584   | (Berthelot <i>et al.</i> 2016) |
| Me10        | <i>Leptodontidium</i> sp.      | DSE       | KU886585   | (Berthelot <i>et al.</i> 2016) |
| Fe06        | <i>Cadophora</i> sp.           | DSE       | KU886589   | (Berthelot <i>et al.</i> 2016) |
| Pr27        | <i>Phialophora mustea</i>      | DSE       | KU886586   | (Berthelot <i>et al.</i> 2016) |
| Pr28        | <i>Phialocephala fortinii</i>  | DSE       | KU886588   | (Berthelot <i>et al.</i> 2016) |
| Pr29        | <i>Phialophora mustea</i>      | DSE       | KU886582   | (Berthelot <i>et al.</i> 2016) |
| Pr30        | <i>Leptodontidium</i> sp.      | DSE       | KU886583   | (Berthelot <i>et al.</i> 2016) |
| PMI_412     | <i>Leptodontidium</i> sp.      | DSE       | JX243932   | (Bonito <i>et al.</i> 2016)    |
| DSM 11827   | <i>Piriformospora indica</i>   | Endophyte | KF061284   | (Zuccaro <i>et al.</i> 2011)   |

### 2.3. Results and discussion

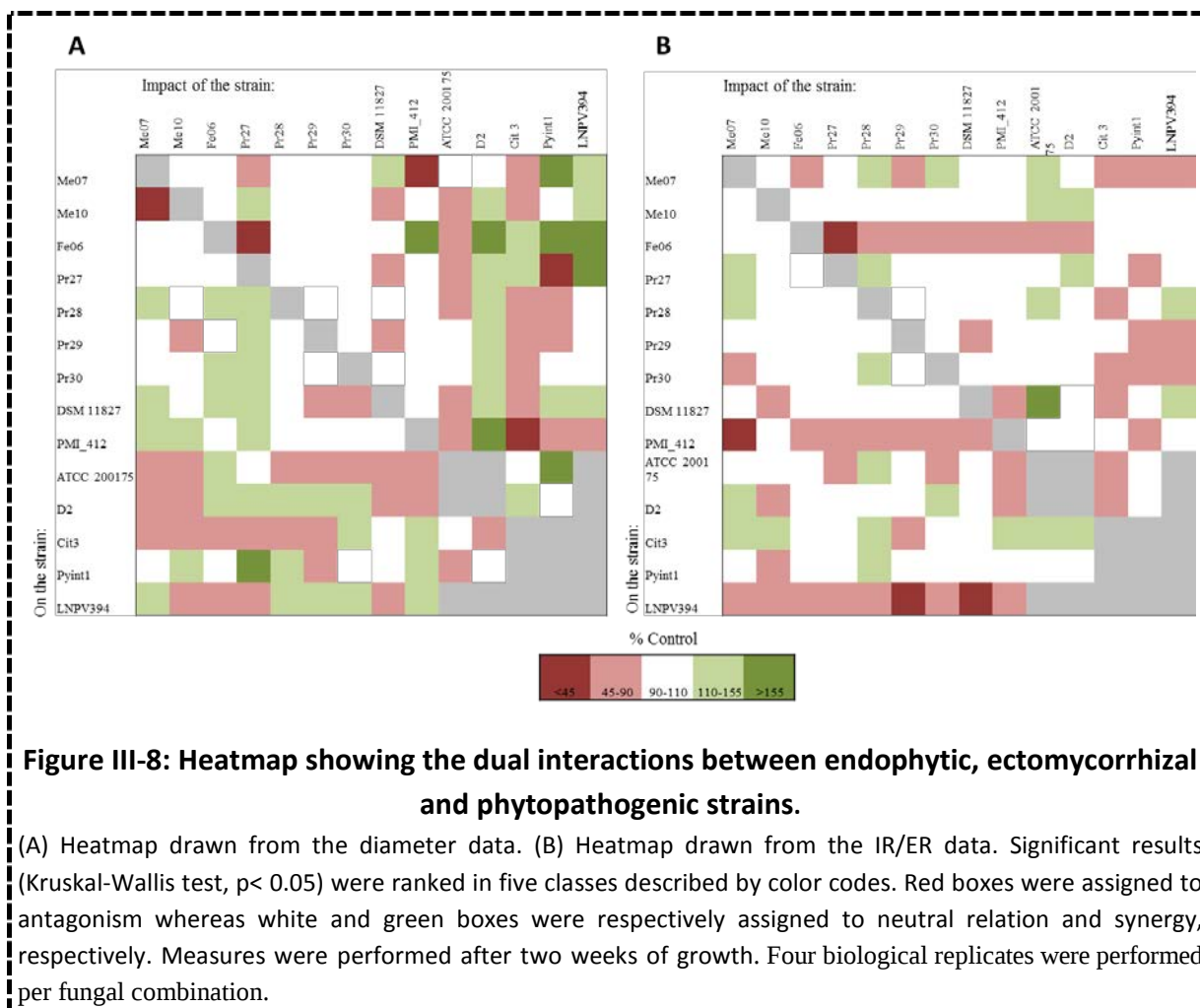
Studies on the interaction between microorganisms are common and involve several measures such as radial growth, colony diameters and inhibition zone (Tellenbach *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2014; Yan *et al.* 2015). However, the relative abundance of suggested indicators confuses the inter-comparison between different studies. In the present study, in order to standardize these analytical methods, the evolution of different shape parameters was evaluated for each strain (diameter, inhibition zone, internal and external radius) (**Figure III-8**) grown nearby another strain and compared to the control (dual inoculation of the same strain). Using a PCA analysis, we observed that the diameter and the internal/external radius ratio (IR/ER) were the best representative among the measured parameters for the whole experiment dataset (**Figure III-7**). Based on these observations, only these two parameters were considered and presented here after. The diameter was used as a proxy for the strain growth whereas the IR/ER emphasized the deformation of the fungal colonies.



**Figure III-7: PCA analysis of the distribution of the different studied parameters.**

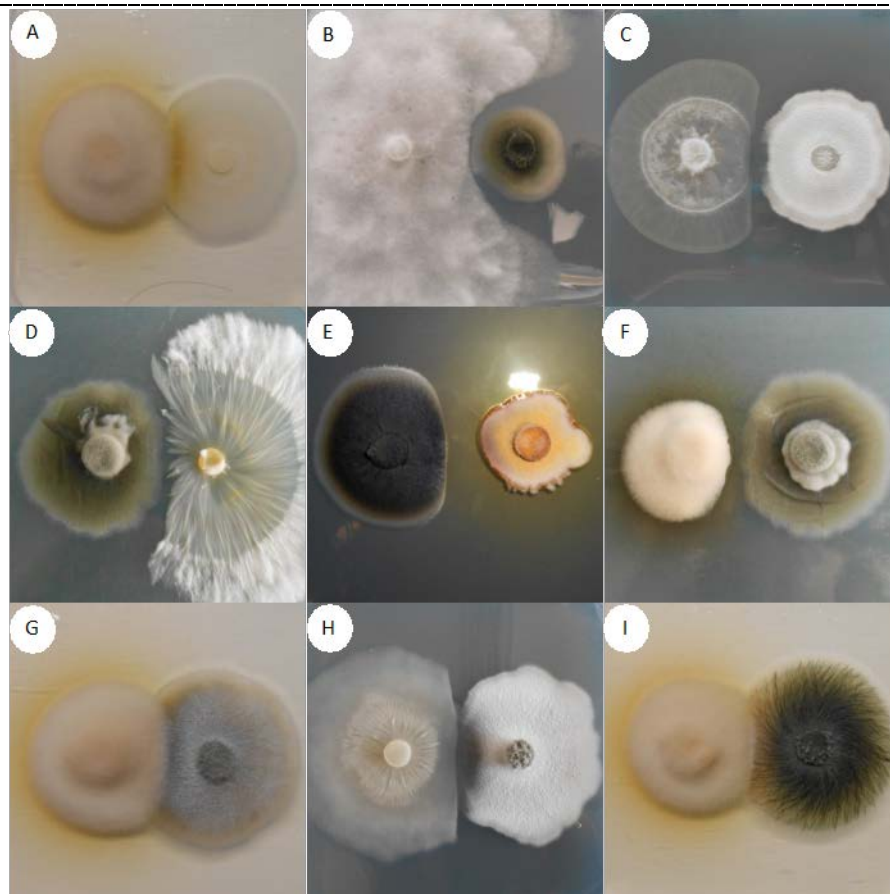
IZ: inhibition zone between the two colonies, ER: external radius, IR: internal radius, IR/ER: ratio of the internal radius to the external radius.

As shown in **Figure III-7** the parameters “IR/ER” and “diameter” were not correlated confirming the relevance to use both indices to assess growth evolution of the colonies. The results of the interactions between strains are depicted in **Figure III-8 A** (for diameter) and **Figure III-8 B** (for IR/ER). In most cases, interactions were observed without any physical contact (**Figure III-9**), but we also observed colony overgrowth (**Figure III-9**), and neighboring contacts but without overgrowth (**Figure III-9**).



Among a total of 110 combinations between endophytic and/or ectomycorrhizal strains, we obtained synergistic and antagonistic interactions that we defined as (i) reciprocal beneficial growth and (ii) reciprocal negative growth, respectively. A total of 27 antagonistic interactions and 29 synergistic interactions were observed when considering the colony diameter as the marker of the type of interaction. The intensity of the growth response as well as the type of interaction were strain-dependent. The interactions between *P. indica* DSM 11827 and *Leptodontidium* sp. Me07, *H. cylindrosporum* D2 and Fe06, Pr27, Pr28, Pr29 and Pr30 were synergistic whereas the associations between *P. involutus* ATCC 200175 and *Leptodontidium* sp. Me10, *P. indica* DSM 11827 and *Leptodontidium* sp. PMI\_412 showed antagonistic responses (**Figure III-9**). *P. mustea* Pr29, *Leptodontidium* sp. Pr30, and *P. fortinii* Pr28 affected only the growth of a few strains whereas *H. cylindrosporum* D2, *P. involutus* ATCC 200175, *P. indica* DSM 11827, *P. mustea* Pr27 or *Leptodontidium* sp. Me07 modified the growth of numerous strains. Moreover, the two ECM strains had an opposite behavior. *H. cylindrosporum* D2 had a positive impact on most of the strains whereas *P. involutus* ATCC 200175 inhibited the majority of the strains. Such

relations were previously reported *in vitro* and *in planta* with different groups of fungi. For instance, the DSE *Dreschlera* sp. inhibited *in vitro* the spore germination of the endomycorrhizal fungus *Gigaspora* sp. in pairwise assays (Scervino *et al.* 2009). Likewise, dual cultures between foliar ascomycetous endophytes such as *Cladopsorium cladosporioides* or *Phialophora* sp. resulted in neutral to pathogenic interactions (Yan *et al.* 2015). *In planta*, a negative effect of *Laccaria bicolor* was reported on several strains of *Phialocephala* sp. but not on the other strains of the same species, confirming the strain-dependent relation between these two species (Reininger and Sieber 2012).



**Figure III-9: Dual inoculations between endophytic, ectomycorrhizal, and phytopathogenic strains.**

The pictures show the co-culture of (A) *Paxillus involutus* ATCC 200175/ *Piriformospora indica* DSM 11827, (B) *Heterobasidion annosum* LNPV394/ *Cadophora* sp. Fe06, (C) *Phytophthora citricola* Cit3/*Phialophora mustea* Pr29, (D) *Leptodontidium* sp. PMI\_412/*Hebeloma cylindrosporum* D2, (E) *Cadophora* sp. Fe06/*Phialophora mustea* Pr27, (F) *Paxillus involutus* ATC200175/*Leptodontidium* sp. PMI\_412, (G) *P. involutus* ATC200175/*Leptodontidium* sp. Me10, (H) *Piriformospora indica* DSM 11827/ *Phialophora mustea* Pr29 and (I) *Paxillus involutus* ATC 200175/ *Leptodontidium* sp. Me07. Pictures were obtained after two weeks of growth at 24°C on MEA medium.

To test their ability to suppress biotic stress, putative antifungal effects of endophytic and ECM fungi were tested against three well known root pathogens, namely *Heterobasidion annosum* and the Oomycetes *Pythium ultimum* and *Phytophthora citricola*

(Figure III-9). As described above, the ability of endophytic and ECM fungi to decrease pathogen development was strain-dependent. Except *Leptodontidium* sp. Pr30 and *Leptodontidium* sp. PMI\_412, all the tested endophytic and ECM strains decreased the growth in diameter of at least one pathogen. Particularly, the DSE strains *Cadophora* sp. Fe06, *Leptodontidium* sp. Me10, *P. mustea* Pr29 and *P. mustea* Pr27 showed high anti-phytopathogenic capabilities against two of the tested strain. The ECM strains *H. cylindrosporum* D2, *P. involutus* ATCC 200175 and *Leptodontidium* sp. Me07 showed the same ability but to a lesser extent (only one strain affected). Overall, *P. ultimum* Pyint1 was more resistant to fungal inhibition than *P. citricola* Cit3 or *H. annosum* LNPV394. Indeed, only *P. mustea* Pr29 and *P. involutus* ATCC 200175 decreased the growth of *P. ultimum* Pyint1. Conversely, growth of *H. annosum* LNPV394 was altered by four strains (*Leptodontidium* sp. Me10, *Cadophora* sp. Fe06, *P. mustea* Pr27 and *P. indica* DSM 11827), and growth of *P. citricola* was impacted by seven strains (*Leptodontidium* sp. Me07, *Leptodontidium* sp. Me10, *Cadophora* sp. Fe06, *P. mustea* Pr27, *P. fortinii* Pr28, *P. mustea* Pr29 and *H. cylindrosporum* D2). Up to now, except for *Phialocephala fortinii* and *Paxillus involutus*, there was no study that examined the interaction between the root pathogens *P. citricola*, *H. annosum* and *P. ultimum* and endophytic or ectomycorrhizal fungi (Rasanayagam and Jeffries 1992; Tellenbach and Sieber 2012; Tellenbach *et al.* 2013; Terhonen *et al.* 2016). The present results confirmed that the inhibitory effects were strain-dependent and further extend our knowledge with DSE as potential antagonists of pathogenic fungi. Similar results were reported in the literature with *P. indica*, *Cadophora*, *Phialocephala* and *Leptodontidium* decreasing the growth of other phytopathogenic fungi (Andrade-Linares *et al.* 2011; Tellenbach *et al.* 2013; Khastini *et al.* 2014; Terhonen *et al.* 2016). For instance, in wheat, symptom severity of a typical leaf (*Blumeria graminis* f. sp. tritici), stem base (*Pseudocercospora herpotrichoides*), and root (*Fusarium culmorum*) pathogen was reduced significantly by the presence of *P. indica* (Serfling *et al.* 2007).

In our study, we also characterized the impact of the pathogenic strains on the growth of endophytic and ECM fungi, point that was usually occulted in previous studies. We observed different levels of growth inhibition between the pathogenic strains. For instance, *P. citricola* Cit3 decreased the growth of seven fungi out of eleven whereas *H. annosum* LNPV394 only altered the growth of a single strain. *Cadophora* sp. Fe06 was the only strain that was not inhibited by the three pathogenic fungi. This result might suggest adaptative mechanisms such as melanin impregnation or defense compounds (Kuo and Alexander 1967; Terhonen, Sipari and Asiegbu 2016). Notably, among the tested DSE, *Cadophora* sp. Fe06 was the highest pigmented strain. However, further investigations are needed to ascertain whether the high content of melanin in Fe06 represents a protective defense mechanism against these pathogenic fungi.

We also characterized the deformation of the colonies using the RI/RE indicator (**Figure III-9**). If the RI/RE=100%, the colony is circular (**Figure III-9** right hand strain), whereas if RI/RE >100 (**Figure III-9** left hand side strain) or <100 (**Figure III-9** left hand side strain) Deformed strain was obtained. For instance, a *moon shape* deformation was mainly observed with the co-culture involving the DSE strains *Cadophora* sp. Fe06, *P. mustea* Pr29, *P. mustea* Pr27 and *Leptodontidium* sp. PMI\_412 (**Figure III-9**). The strains *P. ultimatum* Pyint 1 and *P. citricola* Cit3 induced the highest strain deformations. Such deformations could result from three different mechanisms: competition for space, competition for nutrient, and antibiosis. Competition for space is the case where a fungus has a stimulated growth while another fungus is inhibited. This was the case for *P. indica* DSM 11827 (stimulated growth) in presence of *H. annosum* LNPV394 (inhibited growth) (**Figure III-9**). Competition for nutrients could also mediate the interactions between fungi. Several fungi are able to secrete siderophores or acidic compounds to mobilize and acquire nutrients, thus spatially limiting resources for other fungi. For instance, *Phialocephala* sp. was reported to synthesize the hydroxamate siderophore (Bartholdy *et al.* 2001). In addition to siderophore secretion, the release of antibiotic and secondary metabolites could also impact fungal growth. For instance *Cryptosporioides* sp. were reported to inhibit the growth of *H. annosum* through the release of cryptosporin (Terhonen *et al.* 2016). Likewise, the release of sclerin and sclerotinin A by *Phialocephala europea* decreased the growth of *P. citricola* (Tellenbach *et al.* 2013). In a previous work, fungal toxic volatile organic compounds (VOC), such as  $\beta$ -chamigrene and 1,3 cyclopentadiene 1,3bis, were isolated from the atmosphere of *Leptodontidium* sp. Pr30 (Berthelot *et al.* 2016). This finding suggests, as previously suggested for other fungi (Macías-Rubalcava *et al.* 2010; Kramer and Abraham 2012) that these molecules could be responsible for the inhibitory effects we observed. Likewise, *Fusarium oxysporium* is able to produce VOC which highly inhibit the growth of the pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea* (Zhang *et al.* 2014). In our study, yellow to brown halos surrounded the colonies of *Cadophora* sp. Fe06 and *P. mustea* Pr27, this result suggests that both strains produce secondary metabolites that could have inhibitory effects (**Figure III-9**). However, such compounds remain to be identified and tested for their inhibitory potential.

In some cases, we observed morphological changes such as mycelial color variation (**Figure III-9**) or hyphae deformation (**Figure III-9**), but no mycoparasitism was exhibited (data not shown). This variation in morphology has been already observed and could result from a variation of enzymatic activity of laccases or phenoloxidases but also from the release of acid compounds (Mucha 2011). For instance, the release of organic acids by *P. involutus* involved dwelling and altered morphology of *P. ultimatum* (Rasanayagam and Jeffries 1992).

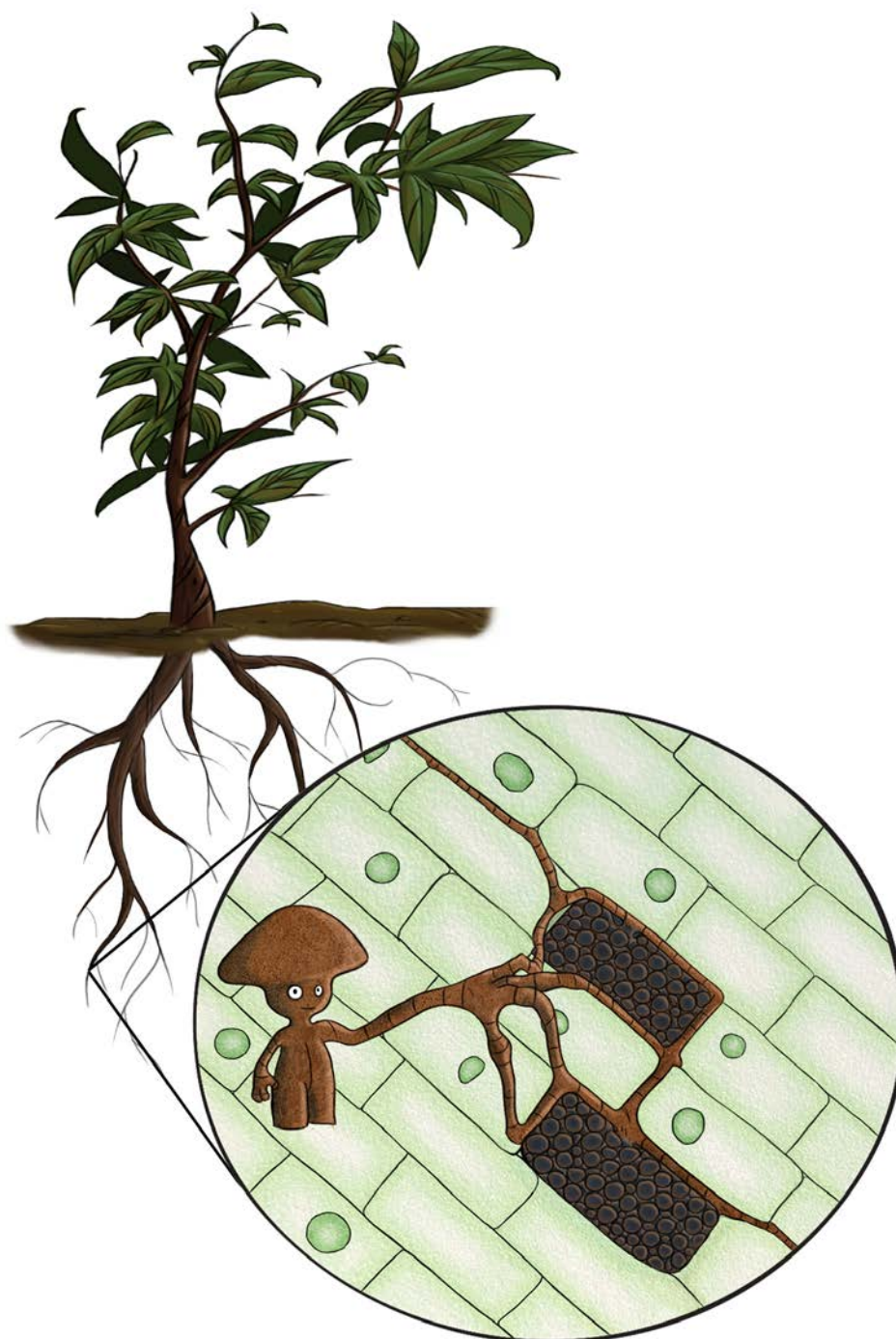
## 2.4. Conclusions

Our results confirmed the importance to take into account both the synergistic and antagonistic interactions between strains before selecting several strains to be pooled in a fungal inoculum. Interestingly, we identified several strains acting in synergy with others (e.g. *H. cylindrosporum* D2 with *Cadophora* sp. Fe06, *P. mustea* Pr29, *P. mustea* Pr29 and *P. mustea* Pr27), as well as strains that potentially could act as biocontrol agents (e.g. *H. cylindrosporum* D2, *Cadophora* sp. Fe06, *P. mustea* Pr29, and *P. mustea* Pr27). However, it is important to bear in mind that this strategy, while essential in such a primary step to choose the best compatible candidates among a large set of strains, does not reflect the complex soil/root environments. However, our results need to be validated *in planta* to evaluate the impact of such consortia on plant growth promotion and biocontrol potential as reported by (Reininger, Grunig and Sieber 2012). In conclusion, the addition of complementary functions mediated by different fungi (phosphate and nitrogen mobilization by mycorrhizal fungi, phytohormone production and biocontrol potential by endophytic fungi...) could represent an attractive strategy for conceiving effective fungal inocula.



## IV. Effet de souches DSE sur la croissance de plantes hôtes dans des sols pollués aux ETM.

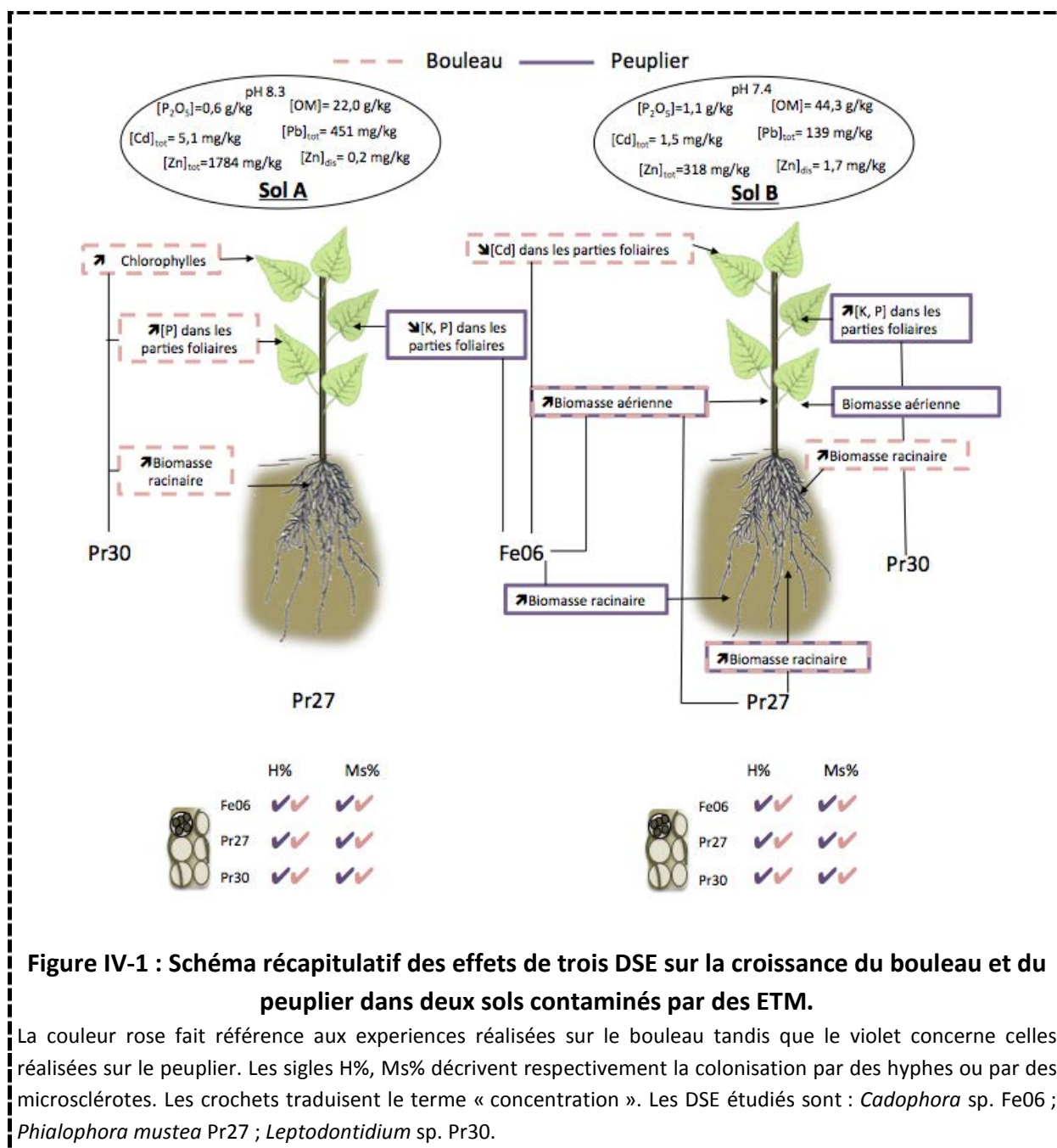
---





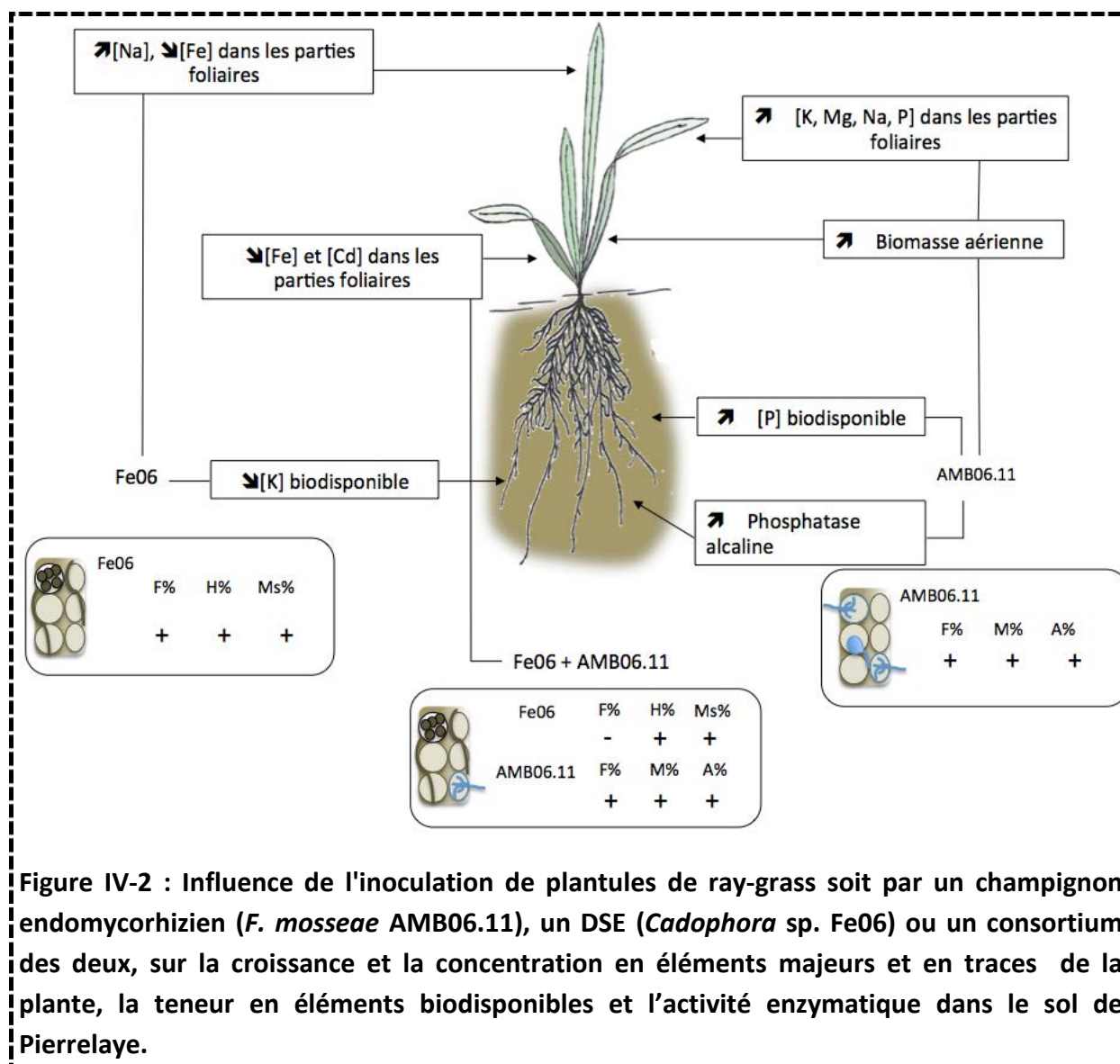
Les DSE sont abondants dans les environnements stressants, et tout particulièrement dans les sols pollués par des ETM. Cependant nos connaissances à propos des effets des DSE sur la croissance des végétaux dans ce type de sols sont pauvres. Dans le chapitre III, trois souches fongiques ont présenté des capacités à **promouvoir la croissance** de différentes plantes et à **s'associer entre elles**, ou avec des champignons **mycorhiziens**. Néanmoins, ces expériences réalisées à partir d'expérimentations *in vitro* ou en conditions contrôlées demandent maintenant à être confirmées **in planta en présence d'ETM**. Ainsi, le but de ce chapitre est d'évaluer les effets de l'inoculation de trois souches de DSE (*Leptodontidium* sp. Pr30 ; *Phialophora mustea* Pr27 et *Cadophora* sp. Fe06) sur la **croissance et la nutrition minérale** du peuplier et du bouleau dans deux sols pollués par des ETM. Ces plantes ont été choisies d'une part pour l'intérêt qu'elles représentent dans un contexte de phytomanagement (*e.g.* production de biochar, syngaz), leur croissance rapide et d'autre part pour leur rusticité (*e.g.* conditions climatiques, pollution). De plus, afin de prendre en compte l'influence des **propriétés édaphiques** sur l'effet des DSE, deux sols ont été utilisés dans cette étude. Ces derniers présentent des propriétés agronomiques différentes et des gradients de biodisponibilité des ETM contrastés. Ainsi, un test en mésocosme est conduit avec deux sols stérilisés et pollués par des ETM, **deux plantes et trois souches de DSE**. Après deux mois de croissance, la biomasse végétale, la colonisation par les souches DSE, la teneur en pigments et flavonoïdes, et en éléments majeurs et traces, dans les parties aériennes sont mesurées. Les trois souches fongiques colonisent les deux plantes dans les deux sols. Cependant, l'effet des souches DSE sur la croissance végétale est **influencé par les propriétés du sol**. En fonction du type de sol, de la souche fongique et de la plante, différents mécanismes permettent une augmentation de la croissance (*e.g.* promotion du taux de chlorophylles, augmentation du contenu en P et en K et diminution du Cd foliaire). Ces mécanismes et l'influence de la plante et du sol sont résumés dans la **Figure IV-1**.

Dans le **chapitre IV-1**, les souches *Leptodontidium* sp. Pr30 ; *P. mustea* Pr27 et *Cadophora* sp. Fe06 ont démontré leur capacité à promouvoir la croissance de plantes ligneuses en présence d'ETM dans certaines conditions environnementales. Cette première étude a permis de mettre en exergue (i) l'influence des propriétés du sol dans l'association sol-DSE-plantes et (ii) l'importance des tests préliminaires dans la sélection de souches fongiques. Néanmoins, en conditions *in situ*, les DSE ne sont pas les seuls symbiotes présents dans les racines. Ainsi, dans la continuité des tests préliminaires réalisés dans les **chapitres IV-1 et III-1**, nous avons étudié l'effet de l'**interaction** entre une **souche DSE** (Fe06) et une souche **endomycorhizienne** (*Funneliformis mosseae*) sur la **croissance du ray-grass en présence d'ETM**. Les souches fongiques utilisées dans ce test ont été sélectionnées à partir de leur capacité à coloniser les plantes dans des substrats contaminés ainsi que par leur capacité à diminuer la concentration en Cd dans les parties aériennes (Chapitre IV ; Marchal 2014).



Le sol de Pierrelaye a été choisi sur la base de sa fertilité tandis que le ray-grass est utilisé pour sa croissance rapide. L'expérience est menée selon quatre traitements : inoculation par *Cadophora* sp. ; *F. mosseae* (MA) ; *F. mosseae* et *Cadophora* sp. puis sans champignon (témoin). Après deux mois, nous avons noté que la biomasse du ray-grass était significativement augmentée par l'inoculation avec la souche MA ainsi que la concentration en Na, P, K et Mg comparées au témoin. De la même façon, la colonisation par le DSE augmente la concentration en Na dans les feuilles tandis que la double inoculation diminue la concentration en Cd dans les parties aériennes. La colonisation racinaire est suivie par qRT-PCR et par des observations microscopiques. Les résultats des deux méthodes sont convergents et montrent que le DSE n'a pas d'impact sur la colonisation endomycorhizienne

tandis que la colonisation par *F. mosseae* entraîne une diminution de la fréquence de colonisation par *Cadophora* sp.. L'hydrolyse de la fluorescéine diacétate (FDA) et l'activité phosphatase alcaline (PA) ont été mesurées. Aucune variation n'a été notée concernant la mesure de la FDA tandis que la colonisation MA engendre une augmentation de l'activité de la PA et de la concentration en phosphore labile dans le sol.



Ainsi, ce second chapitre est divisé en deux parties présentées sous forme d'articles en anglais. La première fait l'objet d'une publication acceptée chez *International Journal of Phytoremediation*, référencée dans la suite du manuscrit par **Berthelot et al. 2017a**. et la seconde fait l'objet d'une publication à **soumettre prochainement**.

## 1. Dark septate endophytic fungi improve poplar and birch growth in two trace element-contaminated soils

### Abstract

Dark septate endophytes (DSEs) are abundant in stressful environments, including trace element- (TE-) enriched soils. However, knowledge about the effects of DSEs on plant growth in such soils is poor compared to the well-known mycorrhizal fungi. The aim of this work was to evaluate the effects of three DSE strains isolated from TE-contaminated soils on the growth and mineral nutrition of *Betula pendula* and *Populus tremula x alba* grown on two contrasting TE-polluted soils. The three DSEs evenly colonized the two plant species in both soils. Nevertheless, plant responses to DSE inoculation varied from neutral to beneficial depending on soil properties. Depending on fungal strain and plant species, different factors seemed to contribute to plant growth promotion. *Phialophora mustea* Pr27 and *Leptodontidium* Pr30 decreased lipid peroxidation in birch shoots. Chlorophyll, K and P concentrations increased in the shoots of *Leptodontidium* Pr30-inoculated trees, whereas Cd concentration decreased in *Cadophora* Fe06-inoculated birch. The absence of a general DSE-mediated plant growth promoting behavior could represent a limiting factor for a generic use of DSEs in the tree-based phytomanagement of TE-contaminated soils. Our results suggest that the selection of strains adapted to particular edaphic conditions should not be overlooked within the framework of phytomanagement.

### 1.1. Introduction

Dark septate endophytes (DSEs) are conidial or sterile Ascomycetes characterized by brown to blackish mycelium. They have been observed in more than 600 plant species and 100 plant families (Mandyam and Jumpponen 2005). They are found worldwide, in various habitats, but are especially common in stressful environments such as dry regions, saline, and polluted sites (Mandyam and Jumpponen 2005; Sonjak et al. 2009). They are notably abundant in trace element- (TE-) polluted areas. For instance, they colonize plant roots in Pb and/or Zn polluted sites (Zhang et al. 2008; Likar and Regvar 2009; Deram et al. 2011) and Ni/Cu smelter areas (Ruotsalainen et al. 2007).

Although DSEs are abundant in stressed environments, their effects on plant physiology are not well known and remain under debate (Mandyam and Jumpponen 2005; Mayerhofer et al. 2013). Recently, Newsham (2011) conducted a meta-analysis and concluded that DSEs should be considered as mutualistic fungi. In contrast, another meta-analysis showed that DSEs could be regarded as casual root colonizers as a result of neutral or negative relationships (Mayerhofer et al. 2013). As a matter of fact, several DSE fungi may be beneficial for their host plants by facilitating P, N, and C uptake (Caldwell et al. 2000; Barrow and Osuna 2002; Newsham 2011), by releasing metabolites (e.g. gibberellin, auxin) and by protecting plants against biotic (pathogen) and abiotic stress (TE, salinity, drought) (Mandyam and Jumpponen 2005; Waqas et al. 2012; Likar and Regvar 2013).

DSEs could promote plant growth in TE-enriched soils. They could limit metal toxicity to the host by limiting root-to-shoot TE translocation and by increasing chlorophyll concentrations and transpiration rates (Wang et al. 2016; Likar and Regvar 2013). Due to their relatively high tolerance level to TEs, DSEs could dominate, and sometimes replace, arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the roots of plants growing on TE-polluted soils (Ruotsalainen et al. 2007; Regvar et al. 2010; Deram et al. 2011). For instance, DSE colonization of *Arrhenaterum elatius* was not affected when Cd concentrations increased in the soil, while AM colonization dwindled (Deram et al. 2011). However, current studies almost entirely focus on a single combination of a selected fungus, a plant species, or a soil, occulting the potential variability of responses occurring from the interactions between these different factors.

Phytomanagement can be used to reduce metal dispersion from TE-contaminated soils into the atmosphere, the soil, and groundwater. This approach is economically attractive because it produces nonedible biomass for commercial products such as bioenergy, biofuels, building and construction materials, or timber (Evangelou and Deram 2014). Phytomanagement can be assisted by beneficial microorganisms such as mycorrhizal fungi and bacteria (Rajkumar et al. 2012). They can help plants to face several limitations such as slow growth and low biomass due to TE phytotoxicity (Mench et al. 2010). Poplar and birch are often considered for phytomanagement because they are TE-tolerant, fast growing, and able to grow on low fertile soils (Migeon et al. 2009; Bojarczuk et al. 2014). Moreover, they form interactions with mycorrhizal fungi but also with different types of endophytic fungi including DSEs (Hashimoto and Hyakumachi 2001; Krpata et al. 2008; Bonito et al. 2016). However, these studies describe the diversity of root fungal populations associated to birch or poplar, but few of them investigate the role of DSE on birch and poplar growth (Hashimoto and Hyakumachi 2001; Reininger et al. 2012), and poplar/DSE re-synthesis experiments are still lacking.

The objective of this study was to assess the potential benefits of DSEs to plants in TE-contaminated soils. To take into account the potential variability between soils, plants and fungi, we chose two soils displaying contrasted properties and two trees species. Three DSE strains belonging to *Cadophora* sp., *Leptodontidium* sp., and *Phialophora mustea*, isolated from TE-contaminated soils (Berthelot et al. 2016), were inoculated to *Betula pendula* and *Populus tremula* x *alba* in a mesocosm experiment involving two different TE-contaminated soils. Root colonization, plant growth, leaf pigments, malondialdehyde concentrations, and shoot concentrations of macroelements and TE were measured in DSE-inoculated and control plants.

## 1.2. Materials and methods

### 1.2.1. Soil physico-chemical properties

Two metal-contaminated soils were used. The medium polluted soil originated from the experimental site of Jeandelaincourt (Meurthe-et-Moselle - France; N 48°50'38" E 6°14'34") and was highly contaminated by TEs from industrial sludge amendments (**Table IV-1**). The low polluted soil was sampled at the experimental site of Pierrelaye (Val d'Oise - France; N 49°1'21" E 2°9'1"). This site is located on a former agricultural plain that was irrigated with the non-treated waters from the city of Paris for almost one century. As a result, topsoils grew contaminated mostly by Cd, Pb, and Zn (**Table IV-1**). The physico-chemical characterization of the soils was performed by the SADEF laboratory (Aspach-le-bas, France) (COFRAC certificate N° 1-0751). Soils characteristics are summarized in **Table IV-1**.

**Table IV-1: Physico-chemical characteristics of the soils.**

| Parameter (unit)                                    | Norms               | Medium polluted soil | Low polluted soil |
|-----------------------------------------------------|---------------------|----------------------|-------------------|
| pH <sub>H2O</sub>                                   | NF ISO 10390        | 8.3 ± 0.0            | 7.4 ± 0.0         |
| CEC <sub>Metson</sub> (cmol <sup>+</sup> /kg)       | NF X 31-130         | 84 ± 1               | 82 ± 7            |
| P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (Joret-Hebert) (g/kg) | NF X 31-161         | 0.6 ± 0.0            | 1.1 ± 0.1         |
| Carbonates (g/kg)                                   | NF ISO 10693        | 12.0 ± 0.3           | 5.7 ± 0.7         |
| Total N (g/kg)                                      | NF ISO 11261        | 0.8 ± 0.0            | 2.7 ± 0.2         |
| Organic matter (g/kg)                               |                     | 22.0 ± 0.3           | 40.3 ± 3.3        |
| Total organic C (g/kg)                              | NF ISO 14235        | 12.7 ± 0.2           | 31.2 ± 2.2        |
| C/N                                                 |                     | 15.9 ± 0.2           | 11.5 ± 0.5        |
| Fractions (%)                                       | NF31-107            |                      |                   |
| <2 µm                                               |                     | 14.3 ± 0.3           | 3.7 ± 0.3         |
| 2-50 µm                                             |                     | 24.6 ± 0.4           | 8.6 ± 1.1         |
| 50-2000 µm                                          |                     | 61.0 ± 1.1           | 87.9 ± 4.0        |
| Metal content (total)                               | ISO 2236; ISO 14869 |                      |                   |
| Cd (mg/kg)                                          |                     | 5.1 ± 0.2            | 1.5 ± 0.4         |
| Pb (mg/kg)                                          |                     | 451 ± 17             | 139 ± 21          |
| Zn (mg/kg)                                          |                     | 1784 ± 85            | 318 ± 31          |
| Metal content (DTPA-extractible)                    | NF ISO 14970        |                      |                   |
| Cd (mg/kg)                                          |                     | 3.61 ± 0.24          | 1.25 ± 0.00       |
| Pb (mg/kg)                                          |                     | 172.0 ± 4.8          | 38.9 ± 0.0        |
| Zn (mg/kg)                                          |                     | 64.0 ± 18.4          | 214.5 ± 0.0       |

Values are means ± SE (n=3).

### 1.2.2. DSE strains from TE-polluted soils

In a previous work, DSE strains were isolated from poplar roots that grew in TE-polluted soils. The best three metal-tolerant strains – Fe06, Pr27, Pr30 - were used in the present study (for details, see Berthelot et al. 2016). The three DSE strains, Fe06 (KU886589), Pr27 (KU886586), and Pr30 (KU886583), were identified by ITS sequencing analyses (Berthelot et al. 2016). Neighbor-Joining analysis clustered Fe06 with *Cadophora* sp. (99% identity with *Cadophora* sp. JN859254). Pr27 was very closely related to *Phialophora mustea* (JN123359), and Pr30 clustered with several sequences of *Leptodontidium* sp. and *Leptodontidium orchidicola*.

### 1.2.3. Greenhouse experiment

Fungal inocula were prepared by aseptically growing strains in flasks containing 500 ml of perlite moistened with 250 ml of malt extract medium, according to Likar and Regvar (2013). The inoculated flasks were incubated at 24 °C in the dark for 2 weeks. Controls contained perlite with fungus-free agar plugs (mock controls).

Birch (*Betula pendula*) seeds were surface-sterilized (5 min in 70% (v/v) ethanol; 20 min in 5% (v/v) NaClO) and rinsed in sterile distilled water. The seedlings were aseptically pre-grown in sterilized perlite for two weeks. Three-week-old poplar (*Populus tremula* x *alba* INRA 717-1B4) plantlets were obtained *in vitro* by micropropagation in glass tubes containing Murashige & Skoog medium (pH 5.8) (Murashige and Skoog 1962). Poplars were planted in a 50/50% (v/v) perlite/loam mix, and acclimated for three weeks in a growth chamber under controlled conditions (23/18 °C, 16/8 h light/dark cycles) (260  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) before transplantation to the TE-contaminated soils.

The TE-contaminated soils were sterilized by three successive autoclaving steps (120°C for 20 min, 2-day intervals between each step). The following procedure was used to reintroduce the native bacterial microflora into the sterilized soils. Non-sterilized soils (125 g) were shaken in 250 ml of 0.9% NaCl solution for two hours. The suspension was subsequently filtered through a 5- $\mu\text{m}$  diameter nylon mesh to remove soil particles and fungal propagules. Birch and poplar were transplanted into pots containing 1 liter of a mix of 90% (v/v) of sterilized TE-polluted soil (A or B) and 10% (v/v) of perlite inoculum. Two ml of soil solution were added to each pot. Six replicates were performed for each treatment. The plants were grown for two extra months before harvest. The roots and shoots were analyzed for fungal colonization, malondialdehyde (MDA) and pigment concentrations, respectively, as described below. Finally, shoots and roots were dried at 50°C for 2 days and weighed.

### 1.2.4. Trace and major element concentrations in the leaves

To measure the concentrations of trace and major elements in the leaves, dried tissues were ground to a powder in a mortar. The powder was digested by  $\text{HNO}_3$  in a MARS 5

microwave (CEM®, Saclay, France) and solutions were analyzed by ICP-AES. Tobacco (INCT-OBTL-5, ichtj, Warsaw, Poland) and ryegrass (CD281 O204, ERM®, Geel, Belgium) standard references were submitted to the same digestion procedure and analyzed as part of the quality control of the protocol. Total nitrogen contents were analyzed using a CHNS analyzer (FlashEA 1112, ThermoFisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France). For elemental analysis, 1 mg of each sample was heated at 940°C and analyzed. A standard reference (birch leaves; B2166; Elemental microanalysis, Devon, United Kingdom) was used and analyzed identically.

#### **1.2.5. Pigment and MDA concentrations in leaves**

Chlorophyll concentrations were measured according to the procedure of Ni et al. (2009). Briefly, the pigments were extracted with 5 ml of acetone (80%) from 300 mg of fresh, fully developed leaves of poplar or birch. Chlorophyll concentrations were measured using spectrophotometric absorbance (A) at 645 and 663 nm. Acetone 80% was used as a blank. A dual excitation fluorimeter (Force A, Dualex scientific +<sup>TM</sup>, Orsay, France) was used for the non-destructive assessment of phenolic compounds (flavonoids and anthocyanins) present in leaf epidermis. Additionally, concentration of MDA was evaluated from frozen leaf tissues of three randomly selected plants by treatment using a commercial kit (MAK085, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) according to the manufacturer's protocol and each sample analysis was repeated three times.

#### **1.2.6. Root colonization**

To evaluate the rates of root colonization by DSEs, the fungal structures within the roots were stained with trypan blue and observed under an optical microscope, as previously described (Phillips and Hayman 1970). Overall, 30 root fragments were observed per sample. Colonization frequency (F%), cortex colonization intensity (% H) and microsclerotia density (% MS) were calculated, as previously described (Trouvelot *et al.* 1986).

#### **1.2.7. Statistical analyses**

Data were analyzed using non-parametric one-way Kruskal-Wallis test. Three-way ANOVA was performed to observe the effects of plant, soil, inoculation, and the interaction between these parameters on DSE colonization and plant physiology parameters. Pearson correlation coefficients were used to determine the relationship between DSEs colonization and plant growth. The rejection level was set at  $\alpha = 0.05$  in all analyses. All analyses were performed using R software (version 3.1.3). Percentage values were *arcsin*-transformed before statistical analyses.

### 1.3. Results

#### 1.3.1. Root colonization by DSEs

To assess the effects of DSEs on birch and poplar under TE stress, these tree species were inoculated with the three DSE strains, separately, and grown for two months on two TE-contaminated soils. Microscopy observations of stained roots revealed the presence of hyphae and microsclerotia in all treatments except the mock-inoculated controls (**Table IV-3**). Root colonization by DSEs was characterized by an average frequency index (F%) ranging between 12 and 86 %, and by an average root colonization by hyphae (H%) ranging between 0.2 and 15 % (Table 2). ANOVA results indicated that DSE colonization (F%, H%, and MS%) was neither influenced by the soil nor the plant species (Table 3). In the low polluted soil, *Cadophora* sp. Fe06-inoculated plants had the highest F% and MS% average values (**Table IV-3**). Likewise, the same trend was observed with H% but the difference was not significant. In the medium polluted soil, the average of F% was also the highest for *Cadophora* sp. Fe06 in poplar, whereas *P. mustea* Pr27 was the best root colonizer of birch roots. Overall, the average intensity of root colonization by microsclerotia (MS%) ranged between 0.4 and 40 % (**Table IV-3**). *Cadophora* sp. Fe06 produced the highest average of MS% in both poplar and birch roots. However, differences were only statistically significant for poplar roots in the medium polluted soil and birch roots in the low polluted soil ( $P < 0.05$ ).

#### 1.3.2. Effect of DSEs on plant growth and pigment concentrations

**Table IV-2: Three-way ANOVA results comparing the effects of soil, inoculation, inoculation x soil interactions and interaction between these.**

|                            | Root                 | Shoot                | Height              | MDA                 | Chlorophylls        | Anthocyanins         | Flavonoids           | F%   | H%   | MS%  |
|----------------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|------|------|------|
| Soil                       | 2.82e <sup>-15</sup> | 2e <sup>-16</sup>    | 2.6e <sup>-11</sup> | 9.0e <sup>-4</sup>  | 0.01                | 0.02                 | 0.53                 | 0.59 | 0.56 | 0.13 |
| Inoculation                | 7.34e <sup>-07</sup> | 5.2e <sup>-04</sup>  | 2.0e <sup>-03</sup> | 0.91                | 0.38                | 0.41                 | 0.30                 | 0.05 | 0.14 | 0.19 |
| Plant                      | 2e <sup>-16</sup>    | 1.46e <sup>-14</sup> | 2e <sup>-16</sup>   | 1.4e <sup>-07</sup> | 6.0e <sup>-05</sup> | 1.21e <sup>-10</sup> | 2.0e <sup>-16</sup>  | 0.16 | 0.19 | 0.17 |
| Soil x Inoculation         | 3.42e <sup>-09</sup> | 2.5e <sup>-04</sup>  | 0.06                | 0.68                | 0.30                | 0.03                 | 4.71e <sup>-06</sup> | 0.34 | 0.08 | 0.74 |
| Soil x Plant               | 3.0e <sup>-04</sup>  | 0.23                 | 0.01                | 0.04                | 0.20                | 0.15                 | 3.0e <sup>-03</sup>  | 0.29 | 0.05 | 0.06 |
| Inoculation x Plant        | 3.62e <sup>-05</sup> | 0.45                 | 0.78                | 0.52                | 2.0e <sup>-03</sup> | 0.02                 | 0.06                 | 0.31 | 0.87 | 0.84 |
| Soil x Plant x Inoculation | 1.88e <sup>-07</sup> | 0.81                 | 0.14                | 0.95                | 0.06                | 0.08                 | 0.08                 | 0.82 | 0.14 | 0.33 |

Significant differences are indicated by  $P < 0.05$

A three-way ANOVA (**Table IV-2**) showed that root biomass was influenced by the soil, the plant, inoculation, and the interaction between these three parameters while shoot biomass was influenced by the soil, the plant, inoculation and the interaction between the soil and inoculation.

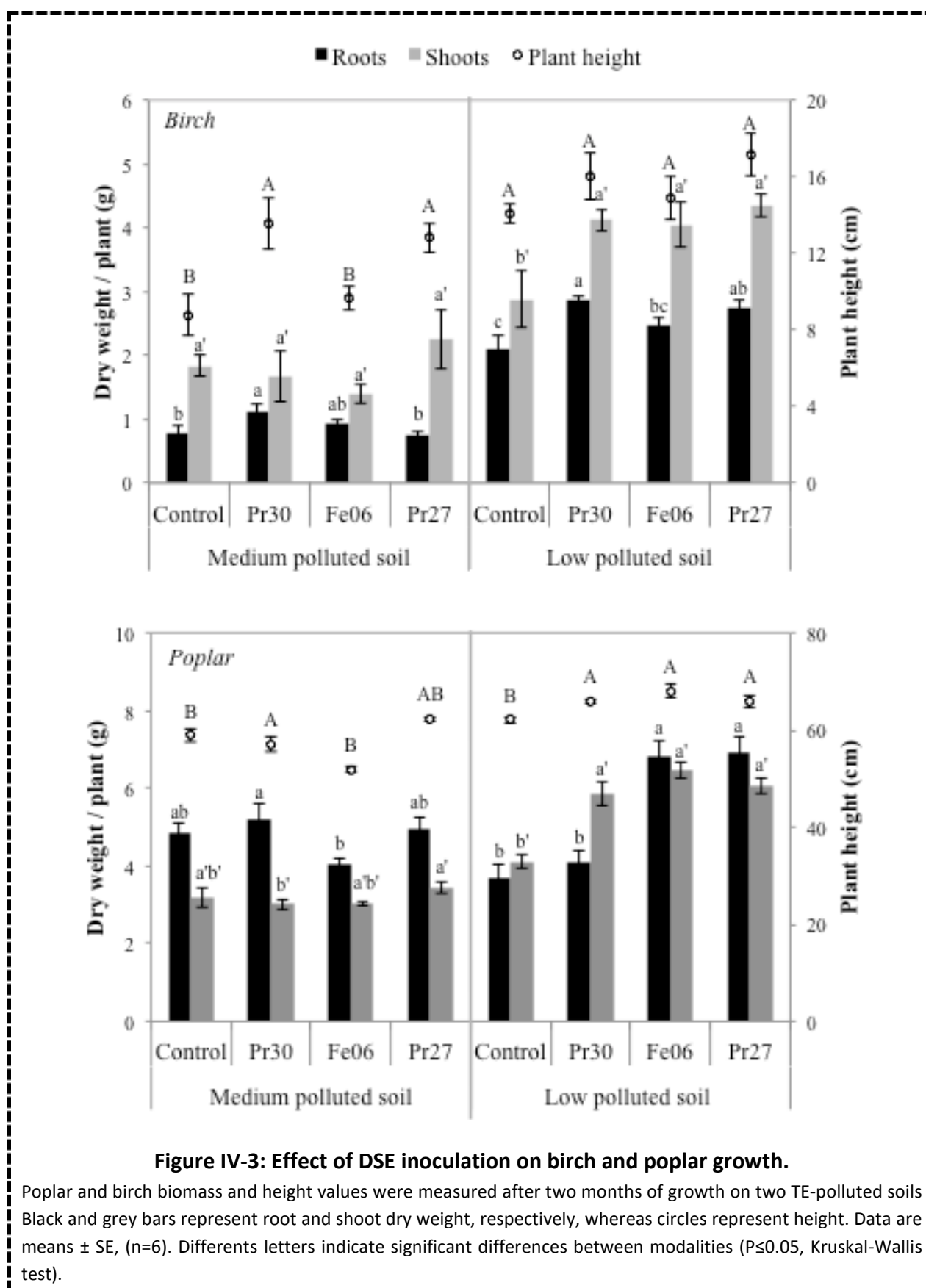
In general, plants grown on the medium polluted soil displayed significantly lower biomass, plant height and chlorophyll concentrations than those grown on the low polluted soil (**Figure IV-3** and **Table IV-2**). Particularly, we noted that poplars from the medium polluted soil had embossed leaves suggesting stress symptoms (data not shown). In this line of result, the concentration of malondialdehyde (MDA), one of

the oxidative stress-mediated decomposition products of polyunsaturated membrane fatty acids, was significantly higher in leaves of poplar grown on the medium polluted soil than those grown on the low polluted soil (**Table IV-2**).

In the medium polluted soil, plant growth was not significantly affected by inoculation with *Cadophora* sp. Fe06 and *P. mustea* Pr27 (**Figure IV-3**) except for *P. mustea* Pr27-inoculated birch that exhibited higher heights when compared to control plants (**Figure IV-3**). Similarly, leaf pigment concentrations remained unchanged in *Cadophora* sp. Fe06 or *P. mustea* Pr27-inoculated plants when compared to the non-inoculated controls (**Table IV-3**). However, *Leptodontidium* sp. Pr30 slightly promoted root biomass, plant height and increased the chlorophyll concentration as compared to uninoculated birch in the medium polluted soil (**Figure IV-3**). This strain however increased poplar height. Although the chlorophyll concentration doubled in *Leptodontidium* sp. Pr30-inoculated poplar as compared to the control, the difference was not statistically validated at  $P < 0.05$  (**Table IV-3**).

In the low polluted soil, poplar dry weight increased by 42 to 58% when inoculated by the three DSE strains as compared to the controls (**Figure IV-3**). Similarly, inoculated-poplars displayed higher heights than controls (**Figure IV-3**). *Leptodontidium* sp. Pr30 did not affect root dry weight of poplar, but the other two strains had a positive effect on it: *P. mustea* Pr27 and *Cadophora* sp. Fe06 indeed increased root growth by approximately 85% as compared to the controls. As for root biomass of birch, *P. mustea* Pr27 and *Leptodontidium* sp. Pr30 increased it by 31 and 37%, respectively. Moreover, shoot biomass of birch increased 1.4- to 1.5-fold as compared to the controls. Conversely, MDA concentrations in leaves decreased 1.2- to 1.5-fold as compared to the controls (**Table IV-3**). Pigment concentrations remained unchanged in inoculated poplar and birch as compared to the controls (**Table IV-3**).

We also examined the relationship between the different colonization parameters (F%, H%) and plant growth. However, poplar or birch growth was not influenced by colonization frequency or intensity (data not shown).



**Table IV-3: Malonaldehyde, pigment contents and root colonization by DSEs.**

| Treatment            |        |         | MDA content in leaves   | Pigment content in leaves             |                                         |                           | Root colonization      |                       |                        |
|----------------------|--------|---------|-------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
|                      |        |         | nmol/mg FW              | Flavonoids<br>(nmol/cm <sup>2</sup> ) | Anthocyanins<br>(nmol/cm <sup>2</sup> ) | Chlorophylls<br>(mg/g FW) | F%                     | H%                    | MS%                    |
| Medium polluted soil | Birch  | Control | 1.37±0.29 <sup>d</sup>  | 0.91±0.07 <sup>a</sup>                | 0.21±0.04 <sup>a</sup>                  | 15.2±2.4 <sup>b</sup>     | nd                     | nd                    | nd                     |
|                      |        | Pr30    | 1.12±0.11 <sup>a</sup>  | 1.00±0.01 <sup>a</sup>                | 0.13±0.02 <sup>a</sup>                  | 32.6±4.0 <sup>a</sup>     | 27.7±6.2 <sup>b</sup>  | 2.5±2.1 <sup>a</sup>  | 1.5±1.5 <sup>a</sup>   |
|                      |        | Fe06    | 1.22±0.11 <sup>a</sup>  | 0.94±0.03 <sup>a</sup>                | 0.21±0.03 <sup>a</sup>                  | 11.9±3.2 <sup>b</sup>     | 33.0±19.0 <sup>b</sup> | 2.3±1.9 <sup>a</sup>  | 2.7±1.4 <sup>a</sup>   |
|                      |        | Pr27    | 1.23±0.07 <sup>a</sup>  | 0.68±0.12 <sup>a</sup>                | 0.12±0.03 <sup>a</sup>                  | 10.2±2.6 <sup>b</sup>     | 53.3±4.2 <sup>a</sup>  | 3.1±0.2 <sup>a</sup>  | 0.7±0.8 <sup>a</sup>   |
|                      | Poplar | Control | 2.06±0.03 <sup>a</sup>  | 1.59±0.01 <sup>a</sup>                | 0.32±0.01 <sup>a</sup>                  | 10.0±0.9 <sup>a</sup>     | nd                     | nd                    | nd                     |
|                      |        | Pr30    | 2.27±0.06 <sup>a</sup>  | 1.45±0.11 <sup>a</sup>                | 0.34±0.04 <sup>a</sup>                  | 20.0±5.1 <sup>a</sup>     | 46.0±7.9 <sup>b</sup>  | 11.8±4.8 <sup>a</sup> | 4.0±1.2 <sup>b</sup>   |
|                      |        | Fe06    | 2.06±0.22 <sup>a</sup>  | 1.45±0.2 <sup>a</sup>                 | 0.32±0.04 <sup>a</sup>                  | 11.4±0.2 <sup>a</sup>     | 86.3±0.6 <sup>a</sup>  | 10.7±6.6 <sup>a</sup> | 19.5±7.7 <sup>a</sup>  |
|                      |        | Pr27    | 2.29±0.11 <sup>a</sup>  | 1.55±0.02 <sup>a</sup>                | 0.32±0.01 <sup>a</sup>                  | 14.0±1.9 <sup>a</sup>     | 36.0±15 <sup>b</sup>   | 6.0±3.8 <sup>a</sup>  | 0.4±0.3 <sup>b</sup>   |
| Low polluted soil    | Birch  | Control | 1.34±0.02 <sup>a</sup>  | 0.63±0.12 <sup>ab</sup>               | 0.14±0.03 <sup>a</sup>                  | 35.2±2.7 <sup>a</sup>     | nd                     | nd                    | nd                     |
|                      |        | Pr30    | 0.88±0.09 <sup>b</sup>  | 0.60±0.13 <sup>ab</sup>               | 0.13±0.03 <sup>a</sup>                  | 35.6±3.9 <sup>a</sup>     | 15.0±5.0 <sup>b</sup>  | 1.8±0.9 <sup>ab</sup> | 4.6±4.5 <sup>b</sup>   |
|                      |        | Fe06    | 1.08±0.05 <sup>ab</sup> | 0.87±0.14 <sup>a</sup>                | 0.15±0.04 <sup>a</sup>                  | 30.8±3.2 <sup>ab</sup>    | 60.0±15.0 <sup>a</sup> | 13.6±4.9 <sup>a</sup> | 40.0±29.0 <sup>a</sup> |
|                      |        | Pr27    | 0.94±0.03 <sup>b</sup>  | 0.52±0.13 <sup>b</sup>                | 0.13±0.05 <sup>a</sup>                  | 32.0±2.3 <sup>ab</sup>    | 12.0±4.2 <sup>b</sup>  | 0.2±0.1 <sup>b</sup>  | 3.0±4.5 <sup>b</sup>   |
|                      | Poplar | Control | 1.53±0.04 <sup>a</sup>  | 1.29±0.13 <sup>a</sup>                | 0.26±0.05 <sup>ab</sup>                 | 19.6±2.9 <sup>a</sup>     | nd                     | nd                    | nd                     |
|                      |        | Pr30    | 1.54±0.05 <sup>a</sup>  | 1.28±0.14 <sup>a</sup>                | 0.26±0.03 <sup>a</sup>                  | 19.7±5.7 <sup>a</sup>     | 20.6±6.1 <sup>b</sup>  | 1.4±1.0 <sup>b</sup>  | 3.5±1.6 <sup>a</sup>   |
|                      |        | Fe06    | 1.65±0.06 <sup>a</sup>  | 1.49±0.06 <sup>a</sup>                | 0.25±0.02 <sup>b</sup>                  | 18.4±4.7 <sup>a</sup>     | 77.0±5.4 <sup>a</sup>  | 15.1±7.7 <sup>a</sup> | 6.9±1.7 <sup>a</sup>   |
|                      |        | Pr27    | 1.38±0.03 <sup>a</sup>  | 1.53±0.03 <sup>a</sup>                | 0.26±0.02 <sup>ab</sup>                 | 17.4±0.5 <sup>a</sup>     | 15.8±6.3 <sup>b</sup>  | 0.2±0.1 <sup>b</sup>  | 3.3±2.3 <sup>a</sup>   |

Root colonization was assessed by determining the colonization index (F%), the intensity of root colonization by hyphae (H%), and microsclerotia (MS%). Regarding malondialdehyde (MDA) content in leaves, values are means ± SE (n=3) whereas (n=6) concerning pigments content in leaves and root colonization evaluation. Statistically significant differences between DSE-inoculated and control plants (P<0.05, Kruskal-Wallis test) are indicated by different letters. nd: not detected.

### 1.3.3. Trace and major element concentrations in poplar and birch shoots

The concentrations of trace and major elements in the shoots of both inoculated and control plants grown on the medium and low polluted soils are summarized in **Table IV-4**. . Despite the relatively low TE extractible contents, high concentrations of Zn and Cd in shoot of both plants in both soils were observed. Whatever the strain, inoculation did not change shoot concentrations of Mg and Zn (**Table IV-4**), or As, Pb, Na, Ca, Mn (data not shown). However, inoculation by *Leptodontidium* sp. Pr30 had a beneficial effect on both P (+35%) and K (+52%) contents in poplar grown on the low polluted soil. Similarly, *Leptodontidium* sp. Pr30 increased the P content of birch by 45% on the medium polluted soil. Conversely, *Cadophora* sp. Fe06 decreased K (-12%) and P (-32%) contents in poplar grown in the medium polluted soil. Likewise, *Cadophora* sp. Fe06 decreased the Cd (-36%) content in birch grown on the low polluted soil. The same trend was observed with *Cadophora* sp. Fe06 and *P. mustea* Pr27 in poplar grown in the same soil, but the differences were not statistically significant. An opposite tendency was noted for *Leptodontidium* sp. Pr30-inoculated poplar grown on the low polluted soil and birch on the medium polluted soil (not significant). Inoculation did not alter N contents, which ranged between 0.6 and 1.0% (w/w) for birch, and between 0.6 and 0.8% for poplar (**Table IV-4**).

**Table IV-4: Effect of dark septate endophyte inoculation on elemental concentrations in shoots.**

| Treatment            |        | Shoot concentration (mg/kg DW) |                          |                       |                          |                         |                         |                        |
|----------------------|--------|--------------------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
|                      |        | Cd                             | Zn                       | K                     | Mg                       | P                       | N                       |                        |
| Medium polluted soil | Birch  | Control                        | 8.5 ± 19.0 <sup>ab</sup> | 454 ± 47 <sup>a</sup> | 6688 ± 406 <sup>a</sup>  | 2310 ± 172 <sup>a</sup> | 531 ± 58 <sup>a</sup>   | 870 ± 170 <sup>a</sup> |
|                      |        | Pr30                           | 12.9 ± 2.1 <sup>b</sup>  | 519 ± 46 <sup>a</sup> | 8254 ± 790 <sup>a</sup>  | 2545 ± 124 <sup>a</sup> | 769 ± 63 <sup>b</sup>   | 910 ± 110 <sup>a</sup> |
|                      |        | Fe06                           | 8.0 ± 1.3 <sup>a</sup>   | 418 ± 60 <sup>a</sup> | 7109 ± 691 <sup>a</sup>  | 2414 ± 173 <sup>a</sup> | 592 ± 55 <sup>a</sup>   | 880 ± 40 <sup>a</sup>  |
|                      |        | Pr27                           | 7.2 ± 1.2 <sup>a</sup>   | 473 ± 84 <sup>a</sup> | 8834 ± 976 <sup>a</sup>  | 2194 ± 5 <sup>a</sup>   | 472 ± 27 <sup>a</sup>   | 980 ± 40 <sup>a</sup>  |
|                      | Poplar | Control                        | 38.6 ± 3.2 <sup>a</sup>  | 498 ± 29 <sup>a</sup> | 5920 ± 88 <sup>a</sup>   | 1547 ± 46 <sup>a</sup>  | 651 ± 40 <sup>a</sup>   | 640 ± 90 <sup>a</sup>  |
|                      |        | Pr30                           | 32.0 ± 2.2 <sup>a</sup>  | 469 ± 11 <sup>a</sup> | 6469 ± 372 <sup>a</sup>  | 1648 ± 69 <sup>a</sup>  | 730 ± 4 <sup>a</sup>    | 670 ± 40 <sup>a</sup>  |
|                      |        | Fe06                           | 32.4 ± 2.1 <sup>a</sup>  | 433 ± 27 <sup>a</sup> | 5276 ± 95 <sup>b</sup>   | 1502 ± 32 <sup>a</sup>  | 493 ± 23 <sup>b</sup>   | 670 ± 40 <sup>a</sup>  |
|                      |        | Pr27                           | 37.4 ± 1.2 <sup>a</sup>  | 505 ± 11 <sup>a</sup> | 4840 ± 976 <sup>a</sup>  | 1404 ± 5 <sup>a</sup>   | 718 ± 48 <sup>a</sup>   | 560 ± 50 <sup>a</sup>  |
| Low polluted soil    | Birch  | Control                        | 3.4 ± 0.3 <sup>b</sup>   | 508 ± 44 <sup>a</sup> | 7451 ± 355 <sup>a</sup>  | 1531 ± 71 <sup>a</sup>  | 1089 ± 93 <sup>ab</sup> | 610 ± 30 <sup>a</sup>  |
|                      |        | Pr30                           | 3.1 ± 0.7 <sup>ab</sup>  | 392 ± 9 <sup>a</sup>  | 7015 ± 349 <sup>a</sup>  | 1737 ± 102 <sup>a</sup> | 923 ± 118 <sup>a</sup>  | 720 ± 90 <sup>a</sup>  |
|                      |        | Fe06                           | 2.2 ± 1.3 <sup>a</sup>   | 390 ± 48 <sup>a</sup> | 6155 ± 670 <sup>a</sup>  | 1647 ± 201 <sup>a</sup> | 1329 ± 133 <sup>b</sup> | 780 ± 50 <sup>a</sup>  |
|                      |        | Pr27                           | 3.1 ± 0.2 <sup>ab</sup>  | 466 ± 35 <sup>a</sup> | 8302 ± 222 <sup>a</sup>  | 1327 ± 65 <sup>a</sup>  | 1145 ± 83 <sup>ab</sup> | 670 ± 100 <sup>a</sup> |
|                      | Poplar | Control                        | 2.8 ± 0.9 <sup>ab</sup>  | 493 ± 49 <sup>a</sup> | 5441 ± 543 <sup>a</sup>  | 1751 ± 143 <sup>a</sup> | 953 ± 94 <sup>a</sup>   | 760 ± 60 <sup>a</sup>  |
|                      |        | Pr30                           | 4.1 ± 1.0 <sup>b</sup>   | 393 ± 76 <sup>a</sup> | 8302 ± 1563 <sup>b</sup> | 1471 ± 100 <sup>a</sup> | 1288 ± 121 <sup>b</sup> | 730 ± 10 <sup>a</sup>  |
|                      |        | Fe06                           | 1.3 ± 0.6 <sup>a</sup>   | 409 ± 28 <sup>a</sup> | 5765 ± 388 <sup>a</sup>  | 1945 ± 194 <sup>a</sup> | 994 ± 87 <sup>a</sup>   | 660 ± 70 <sup>a</sup>  |
|                      |        | Pr27                           | 1.5 ± 0.3 <sup>a</sup>   | 410 ± 20 <sup>a</sup> | 5623 ± 211 <sup>ab</sup> | 1497 ± 77 <sup>a</sup>  | 893 ± 44 <sup>a</sup>   | 700 ± 50 <sup>a</sup>  |

Values are means ± SE (n=6). Statistically significant differences between DSE-inoculated and control plants (P<0.05, Kruskal-Wallis test) are indicated by different letters.

#### 1.4. Discussion

*Leptodontidium* sp., *Cadophora* sp., and *Phialophora mustea* are frequent colonizers of trees growing in TE-polluted soils (Utmazian et al. 2007; Likar and Regvar 2009; Regvar et al. 2010). However, few studies have recorded their presence in poplar roots (Beauchamp et al. 2005; Krpata et al. 2008; Gehring et al. 2014). Except re-synthesis experiments between *Salix* trees and *Cadophora* or *Leptodontidium* (Utmazian et al. 2007; De Maria et al. 2011; Likar and Regvar 2013), information is lacking on the potential benefits that *Leptodontidium* sp., *Cadophora* sp., and *P. mustea* can bring to trees when associated with them, especially under TE stress. To take one step further, we performed re-synthesis experiments between these three DSE species and birch and poplar, and we evaluated the impact of these strains in two soils displaying different pH values, nutrient levels and TE concentrations.

Although both soils were not highly contaminated as shown by extractable TE concentrations, elevated Zn and Cd shoot concentrations were found in both plants and in both soils. In the medium polluted soil, Cd shoot concentration ( $35 \text{ mg kg}^{-1}\text{DW}$ ) was as high as in a soil with two times higher available soil concentration (Migeon et al. 2009). As a whole, plants grown on the medium polluted soil were smaller, and had lower chlorophyll contents but higher Cd shoot concentrations than those grown on the low polluted soil. In line with the latter result, we observed a higher MDA content in the shoots of plants that grew on the medium polluted soil than in the shoots of those that grew on the low polluted soil. These observations suggest that the medium polluted soil was less suitable than the low polluted soil for plant growth. Nevertheless, root colonization indices (F%, H%, and MS%) were similar for poplar and birch grown on either soil although soil TE concentrations differed. Field surveys showed that colonization of *D. flexuosa* roots by DSEs was not affected in a TE-contaminated soil, and was even higher in *S. caprea* roots when TE concentrations increased (Ruotsalainen et al. 2007; Likar and Regvar 2009). Our results therefore strengthen the hypothesis that DSEs are effective root colonizers even in the presence of high soil TE concentrations. Moreover, fungal pure culture studies revealed that DSE strains were usually highly tolerant to TEs (Zhang et al. 2008; Ban et al. 2012; Likar and Regvar 2013). A similar finding was obtained with the three strains used in this study (Berthelot et al. 2016). This relatively high TE tolerance might be related to the particular high melanin content of DSE cell walls. The binding of metal ions to melanin functional groups (carboxyl, phenolic, amine) could indeed lower TE toxicity (Ban et al. 2012; Zhan et al. 2016). However, further studies are needed to experimentally demonstrate the role of melanin in the high TE tolerance of DSEs.

Although DSEs evenly colonized plants and soils, we noted host plant responses to DSE colonization that ranged from neutral to beneficial. More particularly, only *Leptodontidium* sp. Pr30 increased root biomass in the medium polluted soil, whereas in the low polluted soil the three DSE strains promoted plant growth. These results suggest that the sole presence of fungal structures in the roots was not sufficient to explain plant growth promotion, which is consistent with other studies (Utmazian et al. 2007; Berthelot et al. 2016). Differences in host responses may rather be attributed to differences in soil properties. Although colonization by DSEs was not impacted by soil TE concentration, the higher content and availability of TEs in the medium polluted soil may have made it too toxic for DSEs to overpower the growth limitation. Additionally, DSEs may not have been adapted to the properties of the medium polluted soil. In each hypothesis, *Leptodontidium* sp. Pr30 seemed to possess plant growth promoting capacities that were either compatible with these properties or able to overpower the growth limitation induced by the soil. Based on the literature, the level and form of soil nutrients may also have altered DSE effects. DSEs are saprotrophs and mineralizers that promote plant growth especially when N or C are supplied under organic forms (Caldwell et al. 2000; Newsham 2011). Another possible explanation for contrasting growth responses could be the soil pH, as plant–fungus relationships often differ at different pH levels (Postma et al. 2007; Mayerhofer et al. 2013). Strains *Leptodontidium* sp. Pr30 and *P. mustea* Pr27 were initially isolated from the low polluted soil. Strain *Cadophora* sp. Fe06 was isolated from a soil whose properties are closer to the low polluted soil than to the medium polluted soil (for details, see Berthelot et al. 2016). Therefore, these strains could be better acclimatized to conditions in the low polluted soil than to those in the medium polluted soil. In our study, the polluted soils were sterilized and reinoculated with a soil suspension <5µm, in order to highlight only the effect of the inoculated DSE strains. However, sterilization can impact plant growth via modifications of TE uptake and soil nutrient concentration, particularly C, P and N concentrations (Endleweber and Scheu 2006; Likar and Regvar 2013; Utmazian et al. 2007). Further, the effect of DSE inoculation might be different in soils with native fungi, which should be considered for their use in phytomanagement.

We evaluated different plant parameters and subsequently suggest different hypotheses that likely explain DSE-mediated plant growth promotion such as (i) the improvement of plant mineral nutrition, (ii) the increase in chlorophyll concentration, and (iii) the decrease in shoot Cd concentration. First, *Leptodontidium* sp. Pr30 increased P and K concentrations in the shoots of the two species. Similar results regarding P were observed in *Atriplex canescens* colonized by *Aspergillus ustus*, and in *Trifolium repens* colonized by *Phialocephala glaciensis* (Barrow and Osuna 2002; Della Monica et al. 2015). Taken together, these results confirm that some DSE strains are able to favor plant nutrition (Della Monica et al.

2015; Barrow and Osuana 2002). Second, we noted that *Leptodontidium* sp. Pr30-inoculated birch and poplar grown in the medium polluted soil displayed higher chlorophyll concentrations than control plants. This observation was consistent with those of Likar and Regvar (2013), who reported that DSE strains closely related to *Leptodontidium* sp. could improve *S. caprea* fitness and growth through increased photosynthesis and transpiration. Third, like other root-associated fungi, including mycorrhizal fungi, DSEs influenced Cd, Pb, and Zn uptake (Wang et al. 2016; Likar and Regvar 2013). Inoculation of birch and poplar with *Cadophora* Fe06 decreased the shoot Cd concentration. A decrease in Cd, Zn, and Pb uptake promoted by DSEs was reported in *Z. mays* and *S. caprea* grown in TE-polluted soils (Wang et al. 2016; Likar and Regvar 2013). Wang et al. (2016) explained such a decrease by a regulation of TE-transporter-encoding genes such as plasmalemma ZIP or vacuolar MTP transporters. TE transfer is a serious concern within the framework of the phytomanagement and commercial use of the resulting biomass. Hence, *Cadophora* sp. Fe06 could be interesting for further investigations/phytomanagement studies because it stimulated plant growth and reduced Cd contents in the shoots of the plants growing in the low polluted soil. As previously observed by Likar and Regvar (2013), our results did not evidence a general behavior of DSEs in their interactions with plants. The fact that only one strain increased the chlorophyll concentration whereas only one decreased the shoot Cd concentration suggests that plant growth responses to DSEs could be mediated by other factors. For instance, Wang et al (2016) observed that *E. pisciphila*-inoculated maize presented higher antioxidant responses than non-inoculated plants. Similarly, DSE-inoculated birch grown in the low polluted soil displayed lower MDA concentrations than the non-inoculated controls. Moreover, root-associated endophytic fungi can increase root biomass, growth and branching by inducing the secretion of phytohormones such as auxin, abscisic acid and gibberellins (Waqas et al. 2012). Finally, volatile organic compounds (VOCs) are also known to promote plant growth. *Trichoderma* sp. improved *Arabidopsis thaliana* growth by emitting VOCs (Hung et al. 2013), similarly to the three DSE strains used in the present study, which can also synthesize auxin in culture media (Berthelot et al. 2016).

## Conclusion

Our results show that three DSEs isolated from TE-contaminated soils are able to colonize birch and poplar in two different soils. Despite the high TE concentrations in the soils, the plants were highly colonized. However, plant growth promotion by DSEs varied between the two soils. In the soil with the highest nutrient and lowest TE concentrations, the three strains were beneficial for plant growth, whereas only one strain slightly increased birch root growth in the soil with lowest nutrient and highest TE concentrations. The

differences in host responses may therefore be attributable to soil properties such as nutrient availability, soil pH, or metal content. Depending on soil, strain and plant, different mechanisms seemed to contribute to plant growth promotion, e.g. an increase of the chlorophyll content and better K and P uptake (Pr30), or a lower Cd concentration in shoots (Fe06). However, the DSE strains promoted plant growth without increasing shoot TE accumulation. Depending on soil properties, specific DSE strains are therefore potential resources for the phytomanagement of TE-contaminated sites.

## 2. Co-inoculation of *Lolium perenne* with *Funneliformis mosseae* and the dark septate endophyte *Cadophora* sp. in a trace element polluted soil.

### Abstract

Numerous studies have addressed the presence and effect of dark septate endophytes (DSE) and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in roots of plants. However little is known about their interactions and effect on host plant when they both colonize a plant, especially in trace element (TE) polluted soils. The effects of *Cadophora* sp. and *Funneliformis mosseae* on growth and uptake of elements by *Lolium perenne* in a Cd/Zn/Pb polluted soil were investigated. The experiment was carried out with four treatments (inoculation with *Cadophora* sp., with *F. mosseae*, co-inoculation with *Cadophora* sp. and *F. mosseae*, and no inoculation). Biomass of ryegrass, as well as Na, P, K, Mg contents in shoots, were significantly increased by AM inoculation when compared to non-inoculated controls. Similarly, DSE inoculation increased Na content in shoots whereas dual inoculation significantly decreased Cd content in shoots. Colonization was monitored by quantitative real-time PCR and microscopic observations. Results of both methods were convergent and showed no effect of DSE on AM colonization, while AM colonization decreased DSE frequency. The hydrolysis of fluorescein diacetate (FDA) and alkaline phosphatase (PA) activity were monitored. No variation was noted concerning FDA hydrolysis whereas AM colonization increased PA activity and P mobility in soil. Our study highlights that interactions between these two ecologically important root-inhabiting fungal groups could affect TE uptake by plants.

### 2.1. Introduction

The intensification of human activities such as mining, industries, waste dispersal, and fertilizer applications has dramatically increased the concentration of trace elements (TE) in soils (Tóth *et al.* 2016). Metallic TE have a long persistence in the environment causing extensive problems on human health and ecosystems. Adapted and TE-tolerant soil microorganisms can enhance plant growth and nutrition in such stressed environments (Ma *et al.* 2011). Among these, arbuscular mycorrhizal (AM) fungi and dark septate endophytes are abundant root colonizers of plants growing in TE polluted soils (Ruotsalainen *et al.* 2007; Regvar *et al.* 2010; Deram, Languereau and Haluwyn 2011).

They are both characterized by the formation of specific fungal structures in plant roots, respectively arbuscules and vesicles for AM fungi, and brown and septate hyphae and microsclerotia for DSE (Jumpponen and Trappe 1998a; Brundrett 2004). AM fungi were extensively studied during the last fifty years, and are considered as an essential partner for plant growth (Göhre and Paszkowski 2006). In sharp contrast, ecological functioning of DSE is still incompletely understood. Several factors have contributed to the paucity of information on DSE. DSE have been difficult to identify because of the lack of taxonomic

traits (Wang and Wilcox 1985). Moreover, opposite conclusions on their impact on plant growth were reported (Newsham 2011; Mayerhofer *et al.* 2013; Mandyam and Jumpponen 2015). Newsham (2011) and Mayerhofer *et al.* (2013) conducted meta-analyses and concluded that DSE should be considered as mutualistic. Besides, Mandyam and Jumpponen (2015) performed a large study with 34 strains of *Periconia macrospinosa* and *Arabidopsis thaliana*, and reported that there were a multiplicity of strain-, and cultivar-dependent impacts on plant growth, resulting from pathogenic, to neutral and mutualistic relationships with the host plant.

In TE-enriched soils, both AM fungi and DSE could promote plant growth (Li *et al.* 2011; Likar and Regvar 2013). Notably, they could limit TE toxicity to the host by dwindling the root-to-shoot TE-translocation, enhancing chlorophyll contents in shoots, transpiration rate and biomass production (Göhre and Paszkowski 2006; Likar and Regvar 2013). They also play key roles on the availability of trace and major elements in soils, inducing either mobilization or immobilization processes (White *et al.* 1997; Barrow and Osuna 2002; Della Monica *et al.* 2015). Especially, both AM and DSE fungi comprise acid and alkaline phosphatase involved in the mobility and mineralization of phosphorus (Hu *et al.* 2013; Della Monica *et al.* 2015). Moreover, AM fungi can also promote soil enzyme activities such as  $\beta$ -glucosidase, dehydrogenases (Arriagada *et al.* 2014). Due to their relatively high tolerance level to TE, DSE could dominate, and sometimes replace AM fungi in roots of plants in TE polluted soils. For instance, mycorrhizal colonization of *Salix caprea* decreased under high metal pollution whereas DSE colonization was not affected (Regvar *et al.* 2010). Likewise, DSE colonization of *Arrhenaterum elatius* was not impacted when Cd concentrations increased in the soil, while AM colonization decreased (Deram *et al.* 2011). Similarly, mycorrhizal colonization of *Deschampsia flexuosa* drastically decreased in TE-polluted soils, whereas colonization by DSE remained unchanged (Ruotsalainen *et al.* 2007).

Beside the latter studies, little is known on the interactions between AM fungi and DSE in TE contaminated-soils. Actually, the relationship between DSE and AM fungi was mainly considered *in vitro*. Scervino *et al.* (2009) reported that *Drechslera* sp. produce exudates which stimulate the presymbiotic stage development of AM fungi on *Daucus carota* hairy roots. Moreover, tripartite studies concerning the interactions between plant, DSE and AM fungi are scarce or did not concern TE-polluted soils (Vaz *et al.* 2012; Saravesi, Ruotsalainen and Cahill 2014; Della Monica *et al.* 2015).

Interactions between AM and DSE fungi can be studied through the localization and quantification of root colonization by both fungi in the same host plant (Vaz *et al.* 2012; Saravesi, Ruotsalainen and Cahill 2014; Della Monica *et al.* 2015). Microscopic observation of stained roots is rather laborious, and results vary between investigators (Tellenbach, Grünig and Sieber 2010). Chemical methods measuring the amount of specific biomolecules stored inside fungal cells or released into the environment (*e.g.* ergosterol or chitin) are widely used (Olsrud and Michelsen 2007). Other methods have been developed such as

specific iso-enzymes or antibodies, transformed fungi expressing labeled proteins, or also FISH analyses (Wright 2000; Su *et al.* 2013; Vági *et al.* 2014). However, all these techniques have a low specificity and may not be adapted to identify different fungi inhabiting the same plant tissue (Vági *et al.* 2014). Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) technique seems to be a more reliable alternative. qRT-PCR combines specificity at different taxonomic levels with accurate measurement of DNA copy number and allows quantification of DNA in very small samples. Quantification of fungal biomass in plant roots with this technique has successfully been used for phytopathogenic (Maciá-Vicente *et al.* 2009), mycorrhizal (Thonar *et al.* 2012), and endophytic fungi such as the DSE *Phialocephala fortinii* (Tellenbach, Grünig and Sieber 2010). However, no studies reported the quantification by qRT-PCR of AM and DSE in a same root sample.

In the present work we investigated the impact of dual AM-DSE inoculation and its interaction on *L. perenne* growth in a TE-polluted soil. We carried out a pot experiment in growth chamber conditions by using *L. perenne* as a model plant inoculated with *F. mosseae* and *Cadophora* sp. either alone or combined. After two months of growth, AM and DSE colonization were evaluated using root staining and qRT-PCR. Plant biomass was estimated as well as total chlorophyll contents in leaves and elemental composition of shoots and soil. Phosphatase activity and fluoresceine diacetate hydrolysis were then measured as indicators of enzymatic and general rhizospheric activity, respectively. Comparison of the results will help understanding the feasibility of a co-inoculation with DSE and AM fungi in a same plant and its consequence on plant growth in presence of TE.

## **2.2. Materials and methods**

### **2.2.1. Soil physico-chemical properties**

The soil used in the present study was sampled at the experimental site of Pierrelaye (Val d'Oise - France; N 49°1'21'' E 2°9'1''). This site is located on a former agricultural plain that was irrigated with the non-treated waters from the city of Paris for almost one century. As a result, the topsoil grew contaminated mostly by Cd, Pb, and Zn (Baize and Tercé 2002) (Table IV-5). The physico-chemical characterization of the soil was performed by the SADEF laboratory (Aspach-le-bas, France) (COFRAC certificate N° 1-0751) using the following norms: ISO 14869 (total metal concentration), NEN 5704 (CaCl<sub>2</sub>-extractible metal concentration), NF31-107 (particle size), NF ISO 10390 (pH<sub>H2O</sub>), NF ISO 14235 (total organic carbon), NF ISO 11261 (total nitrogen), NF X31-161 (available phosphorus), NF ISO 10693 (total carbonates) and NF X 31-130 (cation exchangeable capacity).

**Table IV-5: Soil physico-chemical characteristics.**

| Measure (unit)                                              | Unit                  | Value       |
|-------------------------------------------------------------|-----------------------|-------------|
| pH <sub>H2O</sub>                                           | -                     | 7.4 ± 0.0   |
| CEC <sub>Metson</sub>                                       | cmol <sup>+</sup> /kg | 82.0 ± 7.0  |
| P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (Joret-Hebert)                | g/kg                  | 1.1 ± 0.1   |
| N total                                                     | g/kg                  | 2.7 ± 0.2   |
| K total                                                     | g/kg                  | 10.4 ± 0.8  |
| C/N                                                         |                       | 11.5 ± 0.5  |
| <i>Fractions</i>                                            |                       |             |
| <2 µm                                                       | %                     | 3.7 ± 0.3   |
| 2-20 µm                                                     | %                     | 4.0 ± 1.1   |
| 20-50 µm                                                    | %                     | 4.6 ± 0.9   |
| 50-200 µm                                                   | %                     | 40.8 ± 1.2  |
| 200-2000 µm                                                 | %                     | 47.1 ± 4.0  |
| <i>Trace element content (total)</i>                        |                       |             |
| Cd                                                          | mg/kg                 | 1.5 ± 0.4   |
| Pb                                                          | mg/kg                 | 139 ± 21    |
| Zn                                                          | mg/kg                 | 318 ± 31    |
| <i>Trace element content (CaCl<sub>2</sub>-extractible)</i> |                       |             |
| Cd                                                          | mg/kg                 | 0.04 ± 0.00 |
| Pb                                                          | mg/kg                 | 0.1 ± 0.0   |
| Zn                                                          | mg/kg                 | 1.7 ± 0.1   |

Values are the means ± SE (n=3).

### **2.2.2. Preparation of AM and DSE inocula**

The AM fungus was a *Funneliformis mosseae* strain isolated from a Cd/Pb/Zn-contaminated soil (Foulon *et al.* 2016). The AM inoculum consisted of perlite mixed with a suspension of purified spores harvested from AM-inoculated hairy root cultures of *Daucus carota*. The DSE strain was *Cadophora* sp. Fe06 (Ascomycota, *Helotiales*), also isolated from a Cd/Pb/Zn-contaminated soil (Berthelot *et al.* 2016). The DSE inoculum was prepared by aseptically growing Fe06 in flasks containing 500 ml of perlite moistened with 250 ml of malt extract medium, according to Likar & Regvar (2013). The inoculated flasks were incubated at 24 °C in the dark for 2 weeks. They were manually shaken twice a week to allow homogeneous fungal growth in the substrate. Controls contained perlite with fungus-free agar plugs (mock controls).

### **2.2.3. Greenhouse experiment**

The TE-contaminated soil was sterilized by three successive autoclaving steps (120°C for 20 min, 2-day intervals between each step). The following procedure was used to

reintroduce the native bacterial microflora into the sterilized soil. Non-sterilized soil (125 g) was shaken in 250 ml of 0.9% NaCl solution for two hours. The suspension was subsequently filtered through a 5- $\mu$ m diameter nylon mesh to remove soil particles and fungal propagules. 225 g of sterilized soil was added in 300 ml pots together with 25 g of fungal inoculum. Ninety percent of the volume corresponded to the TE-polluted soil whereas the remaining 10% represented the fungal inoculum. Two ml of soil suspension was added per pot. Ryegrass seeds were surface-sterilized (5 min in 70% (v/v) ethanol; 20 min in 5% (v/v) NaClO) and carefully rinsed 5 times in sterile distilled water. Thirty seeds were sown per pot. After one week of growth, twenty plants were kept per pot. Plants were inoculated with *F. mosseae*, with *Cadophora* sp, with both fungi or was uninoculated. The DSE treatment consisted in the DSE-perlite inoculum described above whereas the AM treatment consisted in perlite containing 300 spores of *F. mosseae* per pot. The AM x DSE treatment consisted in the DSE inoculum in which the AM spore suspension was added. The control treatment consisted in fungus-free perlite. Nine replicates were performed per treatment. The plants were grown for two extra months before harvest. The rhizospheric soil was conserved at 4°C for the determination of enzymatic activities as described below. The roots and shoots were harvested, roots were analyzed for fungal colonization and shoots for chlorophyll contents, as described below. Finally, shoots and roots were dried at 60°C for 2 days and weighed.

#### **2.2.4. Elemental contents in shoots**

To measure the contents of trace and major elements dried shoots were first ground to a powder in a mortar with liquid nitrogen. For elemental analyses, the shoot powder was digested by HNO<sub>3</sub> in a MARS 5 microwave oven with the following program: 15 min at 170°C and 20 bars followed by 30 min cooling. The solutions were analyzed by ICP-AES. Two tobacco (OBTL5, ichtj, Warlow, Poland) and ryegrass (CD281 O204, ERM®, Geel, Belgium) standard references were submitted to the same digestion procedure and analyzed as part of the quality control of the protocol. Total nitrogen contents were analyzed using a CHNS analyzer (FlashEA 1112, ThermoFisher Scientific). One mg per sample was heated at 940°C and analyzed. A standard reference (birch leaves; B2166; Elemental microanalysis) was used and analyzed identically.

#### **2.2.5. Chlorophyll content**

Chlorophyll contents were measured according to the procedure of Ni et al. (2009). Briefly, the pigments were extracted with 5 ml of acetone (80%) from 300 mg of fresh shoots. Chlorophyll contents were measured using spectrophotometric absorbance at 645 and 663 nm. Acetone 80% was used as a blank.

#### **2.2.6. Microscopic evaluation of root colonization**

To quantify root colonization by fungi, the roots were stained with trypan blue and observed under a microscope, as previously described (Phillips and Hayman 1970; Trouvelot

*et al.* 1986). Overall, 30 root fragments were observed per sample. The frequency of root colonization, the intensity of cortex colonisation by hyphae, and the density of specific structures (arbuscules (A) from *F. mosseae*, microsclerotia (MS) *Cadophora* sp.) within roots were calculated as previously described (Trouvelot *et al.* 1986). The three indices were respectively assigned to  $F_{DSE}\%$ ,  $H_{DSE}\%$  and  $MS\%$  for DSE and  $F_{AM}\%$ ,  $H_{AM}\%$  and  $A\%$  for AM parameters.

Roots were also analyzed by confocal laser microscopy. Selected root segments were first cut into pieces of 5-10 mm in length and were labeled with 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  WGA<sup>®</sup> 488 (Invitrogen, Carlsbad, United-state) for 10 min to visualize fungal structures. The autofluorescence of root cell walls was detected between 420 nm and 470 nm after UV laser irradiation at 405 nm. An argon laser was used to excite Alexa Fluor<sup>®</sup> 488, and fluorescence was detected between 500 and 550 nm. Image stacks were obtained using a Nikon eclipse TE2000U equipped with a confocal scanner head (AGR-3Q-BLD, Rainbow, Radiance Biorad) and a plan APOx20/0.75 objective. All samples were scanned at an x/y scanning resolution of 1024 x 1024 pixels; the z direction step size was 1.5  $\mu\text{m}$ . The image stacks were visualized and processed using the software program Image J (v.1.43u). The two detection channels of plant and fungal cell fluorescence were assigned differently using RGB color tables to discriminate between the two organisms.

#### **2.2.7. Quantification of DSE and AM biomass in roots by real-time PCR**

We designed primers and molecular beacon probes for the detection of *Cadophora* sp. by real-time PCR. Several *Cadophora* ITS region sequences obtained from NCBI were aligned using the Clustal W multiple alignment tool and optimized manually. Thus, the primers designed for the DSE strain were Cado-F: 5'-CCTTGAATAAATTACCTTTGTTGCTTTGG-3' and Cado-R: 5'-CCTCTGGCGGGCACTCA-3', and amplified a 78-bp fragment. The probe was Cado-P: 5'-FAM-CCGCCTCGTGCCAGTGGC-BHQ1-3'). For *F. mosseae*, the primers were obtained from Thonar *et al.* (2012) and amplified a 122-bp fragment (AM-F: 5'-GGAAACGATTGAAGTCAGTCATACCAA-3'; AM-R: 5'-CGAAAAAGTACACCAAGAGATCCCAAT-3'; and probe AM-P: 5'-FAM- AGAGTTTCAAAGCCTTCGGATTCGC-BHQ1-3'). The resulting two sets of specific markers (i.e. primers and probes) for the different fungi were subjected by PCR to cross-specificity tests with pure genomic DNA of *Cadophora* sp. and *F. mosseae*.

The genomic DNA of ryegrass (axenic culture on water agar plates) and of the two fungi (axenic purified spores of *F. mosseae*, axenic colony of *Cadophora* sp.) were extracted from 100 mg of fresh material with the DNeasy plant mini kit (Qiagen, Basel, Switzerland) following the manufacturer's recommendations. Roots of ryegrass that were harvested from the soil were processed identically. All samples were normalized to the same DNA concentration.

Real-time PCR was performed with the iTaq<sup>™</sup> universal probes supermix kit (Biorad, Hercules, United States) in a CFX 96 thermal cycler (Biorad) following the manufacturer's

protocol. For each sample, DNA was amplified in a total volume of 20  $\mu$ l containing: 10  $\mu$ l iTaq supermix buffer, 0.5  $\mu$ M of each of the primers (Cado-F/Cado-R or AM-F/AM-R) and 0.2  $\mu$ M of molecular beacon probe (Cado-P or AM-P), and 1 ng of DNA template. Amplifications were performed with the following steps: an initial denaturation step at 94°C for 3 min and 40 cycles of denaturation at 94°C for 15 s, annealing at 60°C for 20 s, and extension at 72°C for 20 s.

### **2.2.8. Enzyme activity determination**

The activities of two hydrolytic enzymes from the soil were measured. Alkaline phosphatase (PA) is involved in the P cycle whereas fluorescein diacetate hydrolysis (FDA) is the result of a global activity involving ubiquitous esterase, lipase and protease activities (Schnurer and Rosswall 1982; Green *et al.* 2006). Both enzymatic activities were evaluated according to previous studies (Marx *et al.* 2001; Green *et al.* 2006). Briefly, 2.5 g of fresh soil were suspended in FDA or PA buffers for 10 min using an orbital shaker (Stuart Scientific SI50), and further sonicated for 120 sec. The FDA buffer contained potassium phosphate (60mM) at pH 7.6. The PA buffer contained phosphate (100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) à pH 7.5. Then, 50- $\mu$ L aliquots were dispensed into 96-well microplates with 3 technical replicates per sample. Finally, the substrate for FDA (fluoresceine [3',6'-diacetylfluorescein]) or PA (4-methylumbelliferylphosphate) solutions were added to reach a final volume of 200  $\mu$ L. The microplates were stored at 28°C in the dark and measurements were done at 60-min intervals for 360 min. Fluorescence was measured with a spectrophotometer (Safas Monaco Xenius XC) with adapting wavelength (523 and 450 nm for the emission; 490 nm and 330 nm for the excitation for FDA and PA, respectively) and was compared to the values of respective standard curves obtained from the dilution of fluorescein or 4-methylumbelliferon.

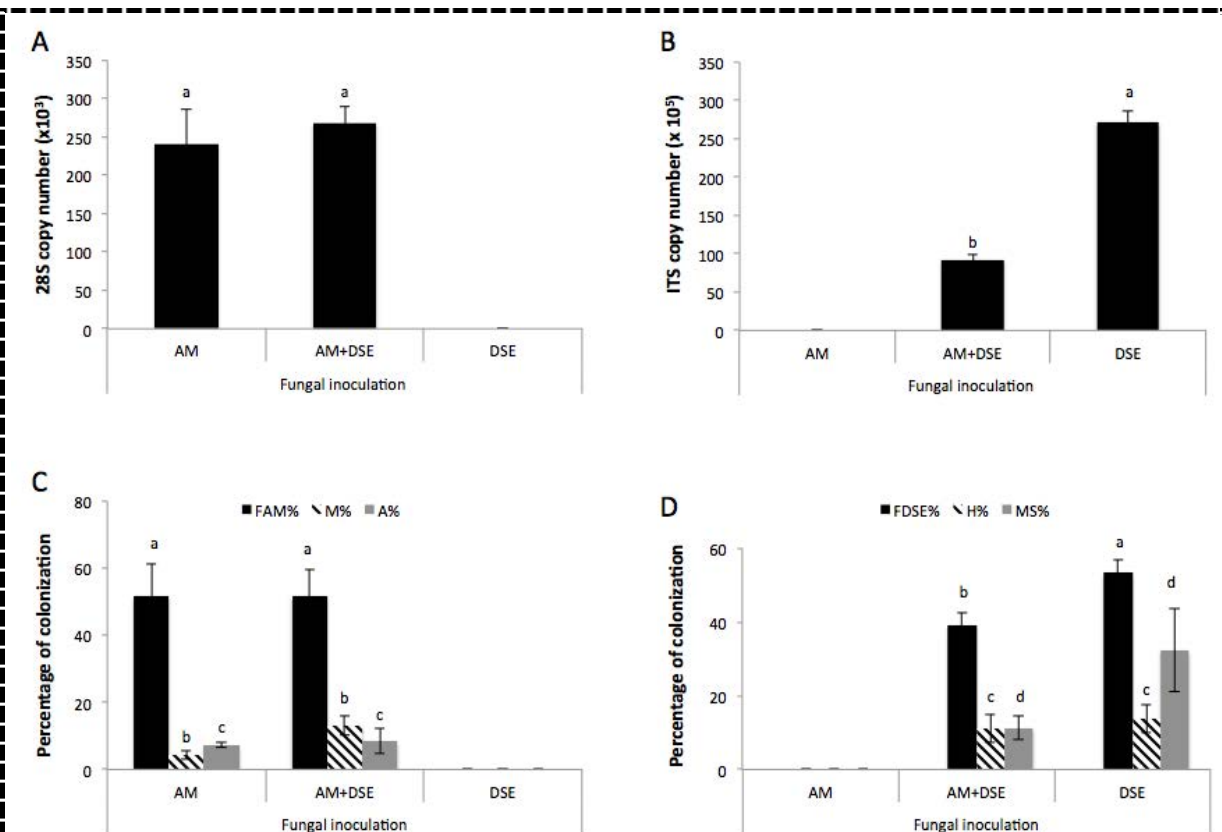
### **2.2.9. Data analyses**

Normality of sample data was tested using a Shapiro-Wilk test. Data were subsequently analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) or by one-way non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Wilcoxon post hoc test. Pearson correlation coefficients were used to determine the relationship between parameters or to determine relationship between RT-PCR and microscopic analyses. The rejection level was set at  $\alpha=0.05$  in all analyses. All analyses were made using the R software (version 3.1.3). All values reported are means  $\pm$  standard error (SE). Percentage values were *arcsin* transformed before statistical analyses.

## 2.3. Results

### 2.3.1. Root colonization by *F. mosseae* and *Cadophora* sp. and ryegrass growth

Root colonization was determined through microscopic (Figure IV-4 C, D) and qRT-PCR analyses (Figure IV-4 A, B).



**Figure IV-4: Fungal colonization of ryegrass inoculated by *F. mosseae* (AM) or *Cadophora* sp. (DSE), or by a dual inoculation.**

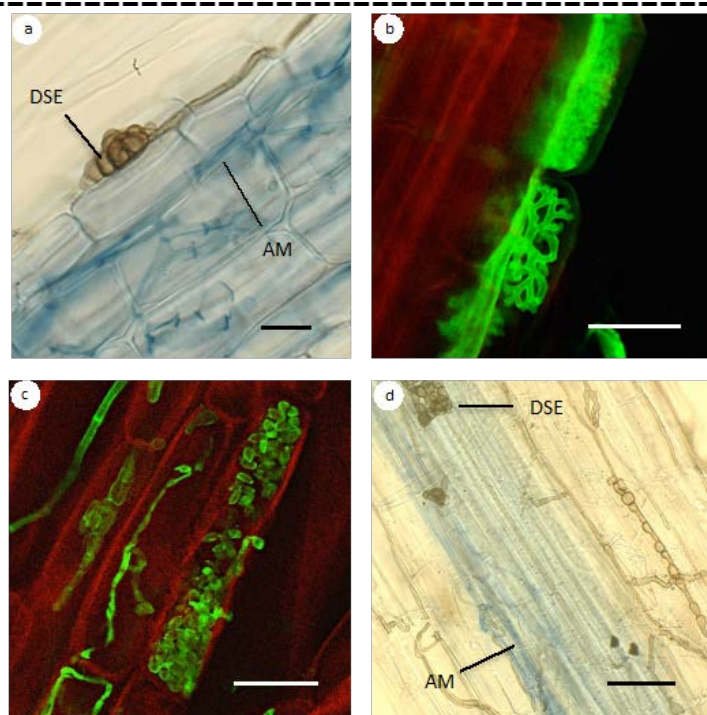
A & B, Root colonization was assessed by real-time PCR analyses. C & D, Root colonization was assessed through the determination of the colonization frequency (F%) and the intensity of root colonization by hyphae (H%), microsclerotia (MS%), or arbuscules (A%). Values are means  $\pm$  SE (n=9) and statistically significant differences between the inoculation treatments ( $P < 0.05$ , Kruskal-Wallis test) are indicated by different letters.

Both fungi successfully colonized plants (Figure IV-4 and Figure IV-5). Observations of arbuscules, vesicles, microsclerotia and hyphae were performed with trypan blue and fluorescence staining (Figure IV-5). *Cadophora* sp. Fe06 formed typical brain-like (Figure IV-5 a), fully packed (Figure IV-5 c), and loosely packed (Figure IV-5 d) microsclerotia in ryegrass roots. In cortex and epidermal cells, arbuscules (Figure IV-5 b) and vesicles were observed with *F. mosseae*. Contrary to the AM structures that were easily stained in blue, hyphae and microsclerotia of the DSE fungus were recalcitrant to trypan blue staining. Moreover, the blue-colored hyphae were not septate whereas the brown hyphae were septate, confirming that the staining was restricted to the AM fungus in our samples. We therefore took profit of this difference to discriminate root colonization by hyphae from AM

or DSE fungi. The determination of the frequency and colonization rates by both colonizers was performed. In the AM+DSE treatment, the presence of *Cadophora* sp. Fe06 neither affected the colonization frequency ( $F_{AM}$ ) nor intensity (M), nor the proportion of arbuscules (A%) and vesicles of *F. mosseae* (**Figure IV-4**). However, the AM fungus induced a significantly lower colonization frequency of *Cadophora* sp. ( $39.9 \pm 3.1$  % compared to  $55.4 \pm 2.5$  % in the single inoculation with DSE). However, the index of colonization intensity by hyphae (H) or microsclerotia (MS%) were not significantly affected.

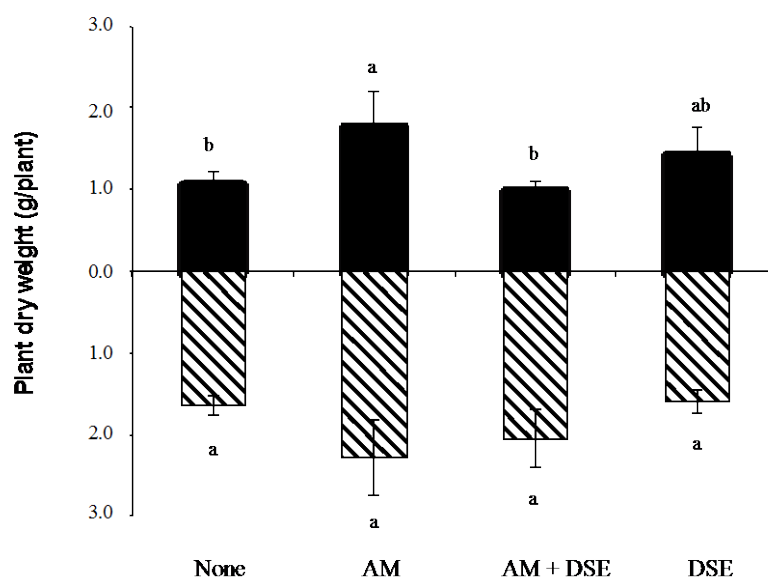
qRT-PCR analyses confirmed that root colonization by the AM fungus was not affected by co-inoculation with the DSE fungus. The 28S copy number was indeed not significantly different between the single and double inoculation treatments (**Figure IV-4 A**). Conversely, ITS copy number was significantly lower in root samples colonized by both fungi compared to those from the DSE inoculation treatment (**Figure IV-4 B**). Pearson correlation analyses reported a significant correlation between ITS gene copy number and  $F_{DSE}$  (p.value < 0.001 and  $r = 0.66$ ) or  $H_{DSE}$  ( $P < 0.001$  and  $r = 0.60$ ). Similarly, we obtained a significant correlation between 28S rDNA gene copy number and  $F_{AM}$  ( $P < 0.001$  and  $r = 0.72$ ) or  $H_{AM}$  ( $P = 0.02$  and  $r = 0.22$ ).

Shoot and root biomass were evaluated after two months of growth (**Figure IV-6**). Total biomass was significantly higher with the AM inoculation ( $3.4 \pm 0.2$  g/plant) compared to the non-inoculated control ( $2.8 \pm 0.2$  g/plant). Notably, shoot biomass was promoted by 63.7 % with *F. mosseae*. Inoculation with *Cadophora* sp. alone and with both AM and DSE fungi did not alter shoot and root dry weight (**Figure IV-6**). Using two-way ANOVA, we also examined the relationship between the different colonization parameters ( $F\%$ ,  $H\%$ ,  $MS\%$  or  $A\%$ ) and plant growth and the analyses revealed no significant correlation (data not shown).



**Figure IV-5: Morphological characteristics of DSEs in ryegrass roots.**

Trypan blue-stained roots were observed by optical microscopy (a and d), whereas WGA-AF488-stained roots (c and b) were observed by confocal microscopy. In green: fungal material; in red: autofluorescence of roots cells. (a) and (d) show the dual colonization by AM hyphae in blue and DSE hyphae and microsclerotia in brown. Arbuscular structures were observed in (b). Typical brain-like (a), loosely packed (d), and fully packed microsclerotia (c) were observed. Scale bars = 25 µm.



**Figure IV-6: Effect of *F. mosseae* (AM) and *Cadophora* sp. (DSE) inoculation on the growth of ryegrass.**

Black and hatched bars represent dry weight of shoots and roots, respectively. Data are means  $\pm$  SE, (n=9). Different letters indicate significant differences between the inoculation treatments compared to the non-inoculated control ( $P \leq 0.05$ , Kruskal-Wallis test).

Chlorophyll content reached the highest values in response to AM and DSE inoculation ( $2.8 \pm 0.7$  and  $2.7 \pm 0.2$  mg/g FW, respectively and  $3.1 \pm 1.1$  mg/g FW for the dual inoculation) but they were not statistically different from the control ( $1.5 \pm 0.4$  mg/g FW).

### 2.3.2. Elemental concentrations in shoots and in soil

The concentrations of trace and major elements in shoots are shown in **Table III-6**. Whatever the treatment, there were no significant difference in Cu, Fe, and Mn (data not shown), and Zn concentrations (**Table IV-6**) in shoots. However, inoculation by *F. mosseae* significantly increased P, Na, and K shoot concentrations compared to the control or *Cadophora* sp. treatment. When compared to the control treatment, Cd concentration in shoots was significantly lower in plants co-inoculated by AM and DSE fungi (**Table IV-6**). Likewise, DSE inoculation induced a significant increase of Na concentration in shoots. Total N in shoots, which ranged from  $0.30 \pm 0.07$  % (w/w) for the dual inoculation to  $0.39 \pm 0.08$  % for the non-inoculated control was not altered by any inoculation.

Also, the  $\text{CaCl}_2$ -extractible concentrations of Cd, Mg, Na, and Zn in soils were unaffected by inoculation (**Table IV-7**). At the opposite, the AM fungus induced a significant increase in  $\text{CaCl}_2$ -extractible P (2,323 mg/kg soil) and K (19,110 mg/kg soil) concentrations in soil compared to the non-inoculated treatment (2,009 and 17,323 mg/kg soil for P and K, respectively - **Table IV-7**).  $\text{CaCl}_2$ -extractible K was lower in the DSE-inoculated soil compared to the non-inoculated treatment. There was no correlation between TE and major element concentrations in shoots or soil and colonization, parameters for AM and DSE (Pearson correlation coefficients, data not shown).

### 2.3.3. Soil enzymatic activities

To assess the effect of *Cadophora* sp. and *F. mosseae* on soil microbial activity, the hydrolysis of fluoresceine diacetate (FDA) and the activity of alkaline phosphatase (PA) were assessed in rhizospheric soil.

The Kruskal-Wallis analyses showed no significant effect of DSE, AM or dual inoculations on FDA hydrolysis (**Figure IV-7 A**). Inoculation with *F. mosseae* increased PA activity by 47% ( $1.1 \pm 0.1$  mU/g) compared to the control ( $0.7 \pm 0.1$  mU/g). Conversely, inoculation with *Cadophora* sp. ( $0.9 \pm 0.2$  mU/g) or with both fungi ( $0.8 \pm 0.1$  mU/g) (**Figure IV-7 B**) did not significantly affect PA activity. Moreover, there was no relationship between colonization frequency or intensity by AM and DSE and soil enzymatic activities (Pearson correlation test, data not shown).

**Table IV-6: Effect of *Cadophora* sp. (DSE) and *F. mosseae* (AM) inoculation on the concentration of trace and major elements in shoots.**

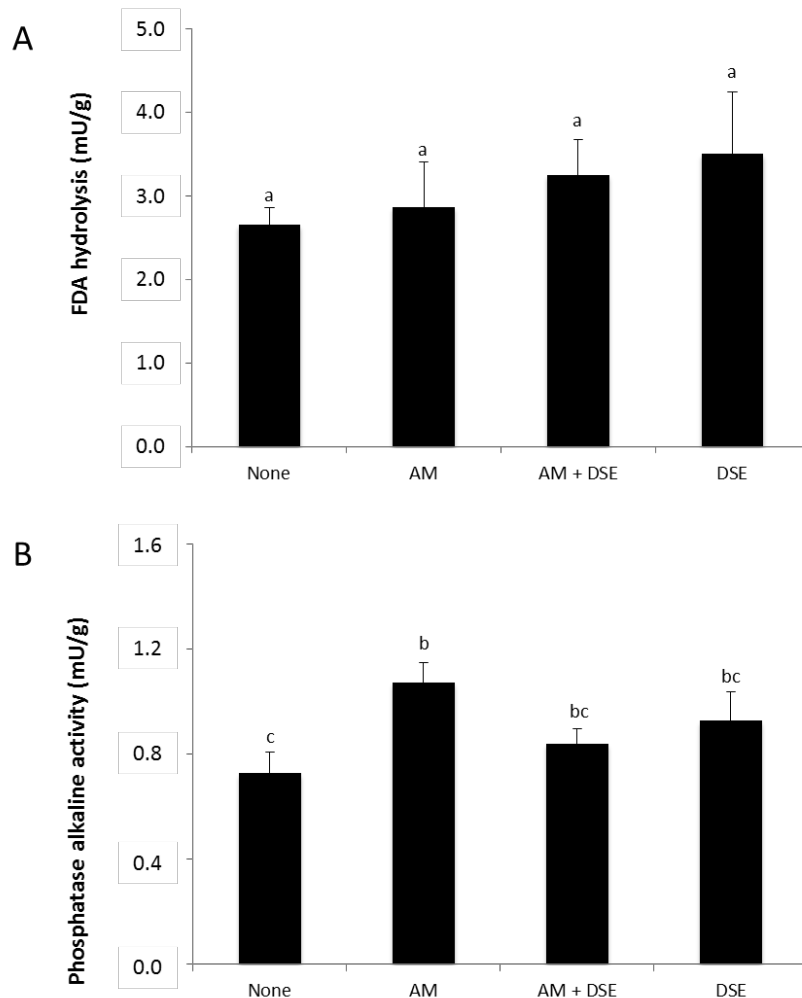
| Inoculum | Element contents in shoots (mg/kg DW) |                            |                          |                        |                         |                         |
|----------|---------------------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
|          | Cd                                    | K                          | Mg                       | Na                     | P                       | Zn                      |
| None     | 1.3 ± 0.1 <sup>a</sup>                | 17,323 ± 333 <sup>b</sup>  | 2,066 ± 91 <sup>ab</sup> | 2.1 ± 0.2 <sup>c</sup> | 2,009 ± 94 <sup>b</sup> | 120 ± 11.1 <sup>a</sup> |
| AM       | 1.2 ± 0.1 <sup>ab</sup>               | 19,110 ± 442 <sup>a</sup>  | 2,341 ± 102 <sup>a</sup> | 3.3 ± 0.1 <sup>a</sup> | 2,323 ± 80 <sup>a</sup> | 97 ± 7.5 <sup>a</sup>   |
| AM + DSE | 1.1 ± 0.1 <sup>b</sup>                | 17,645 ± 296 <sup>b</sup>  | 2,046 ± 45 <sup>b</sup>  | 2.1 ± 0.2 <sup>c</sup> | 1,832 ± 75 <sup>b</sup> | 116 ± 8.5 <sup>a</sup>  |
| DSE      | 1.4 ± 0.1 <sup>a</sup>                | 18,069 ± 410 <sup>ab</sup> | 2,023 ± 89 <sup>b</sup>  | 2.7 ± 0.2 <sup>b</sup> | 2,064 ± 55 <sup>b</sup> | 101 ± 4.5 <sup>a</sup>  |

Values are the mean ± SE (n=6) and statistically significant differences between inoculation treatments (P<0.05, Kruskal-Wallis test) are indicated by different letters.

**Table IV-7: Effect of *Cadophora* sp. (DSE) and *F. mosseae* (AM) on the available fraction of trace and major elements in soil.**

|        | Available fraction (CaCl <sub>2</sub> -extracted) |                          |                          |                           |                          |                        |
|--------|---------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------|
|        | Cd (µg/kg soil)                                   | K (mg/kg soil)           | Mg (mg/kg soil)          | Na (mg/kg soil)           | P (mg/kg soil)           | Zn (mg/kg soil)        |
| none   | 44.0 ± 1.1 <sup>a</sup>                           | 18.1 ± 3.8 <sup>b</sup>  | 140.4 ± 3.2 <sup>a</sup> | 123.5 ± 8.2 <sup>a</sup>  | 22.9 ± 1.4 <sup>ab</sup> | 3.0 ± 0.1 <sup>a</sup> |
| AM     | 51.3 ± 2.1 <sup>a</sup>                           | 25.7 ± 4.2 <sup>a</sup>  | 136.7 ± 3.5 <sup>a</sup> | 141.9 ± 2.6 <sup>a</sup>  | 23.6 ± 0.4 <sup>a</sup>  | 3.0 ± 0.1 <sup>a</sup> |
| AM+DSE | 40.6 ± 1.9 <sup>a</sup>                           | 19.2 ± 1.3 <sup>ab</sup> | 137.6 ± 3.0 <sup>a</sup> | 125.0 ± 13.6 <sup>a</sup> | 22.7 ± 0.2 <sup>b</sup>  | 2.7 ± 0.1 <sup>a</sup> |
| DSE    | 41.5 ± 1.9 <sup>a</sup>                           | 12.9 ± 0.2 <sup>c</sup>  | 137.7 ± 3.7 <sup>a</sup> | 109.1 ± 9.8 <sup>a</sup>  | 21.2 ± 0.2 <sup>b</sup>  | 2.8 ± 0.3 <sup>a</sup> |

Values are the mean ± SE (n=6) and statistically significant differences between inoculation treatments (P<0.05, Kruskal-Wallis test) are indicated by different letters.



**Figure IV-7: Effects of *F. mosseae* and *Cadophora* sp. inoculation on soil enzymatic activities.**

The hydrolysis of fluoresceine diacetate (FDA) (A) and the activity of alkaline phosphatase (PA) (B) were determined in rhizospheric soils after harvest. Data are expressed as means  $\pm$  SE, (n=9). Different letters indicate significant differences between the inoculation treatments compared to the non-inoculated control ( $P \leq 0.05$ , Kruskal-Wallis test).

## 2.4. Discussion

### 2.4.1. Root colonization by *F. mosseae* and *Cadophora* sp.

We investigated the impact of a dual inoculation with AM and DSE fungi on *L. perenne* grown in a Cd/Pb/Zn-contaminated soil. Except the non-inoculated ryegrass, all plants were colonized. These observations suggest that the sterilized soils were effectively devoided of any endogene AM and endophytic propagules. In single AM or DSE inoculation, only the inoculated fungus was found in roots whereas in dual inoculation both fungi were observed. The AM fungus formed typical arbuscular and vesicle structures in ryegrass roots, whereas the DSE fungus formed different microsclerotia. Brain-like, loosely packed and fully-

packed microsclerotia were indeed found. We previously noticed these different types of microsclerotia in roots inoculated by different DSE species (Berthelot *et al.* 2016). However, little information is available on the diversity and function of the different types of microsclerotia (Yu *et al.* 2001).

In addition to these microscopic observations, we also monitored root colonization by qRT-PCR. Previously, qRT-PCR was used to quantify DSE (Maciá-Vicente *et al.* 2009; Tellenbach, Grünig and Sieber 2010; Su *et al.* 2013) and AM (Thonar *et al.* 2012) colonization of roots. However, these fungi were inoculated separately in these studies. To address whether both fungi can be discriminated by this strategy, we designed DSE specific primers and probes, which neither cross-react with plant tissues nor with AM fungi (**Figure IV-4**, and data not shown). There was a positive correlation between the frequency ( $F_{DSE}\%$ ,  $F_{AM}\%$ ) and the intensity of colonization by hyphae ( $H_{DSE}\%$  and  $H_{AM}\%$ ), as determined by microscopy, with 28S and ITS copy numbers quantified by qRT-PCR. However, there was no correlation between microscopic quantification of microsclerotia/arbuscule structures and qRT-PCR quantifications. This could be due to the difficulty to extract DNA from microsclerotia, which form tight complexes of thick-walled cells (Tellenbach, Grünig and Sieber 2010). To determine the abundance of arbuscules by qRT-PCR, Isayenkow *et al.* (2014) suggested the use of MtPT4 as colonization marker. This gene encodes mycorrhiza-specific induced phosphate transporter and its amplification was correlated with the colonization intensity of arbuscular structures. Mycorrhizal colonization by *F. mosseae* was not affected by the presence of the DSE fungus. Conversely, Scervino *et al.* (2009) reported that *in vitro*, *Dreschlera* sp. (a DSE fungus) decreased the colonization of *Daucus carota* hairy roots by *Gigaspora rosea*. Likewise, Soteras *et al.* (2013) observed *in situ* that microscopical analyses of AM colonization of *Polylepis australis* was correlated negatively with DSE colonization. In our study, for DSE colonization, a significant decrease of the frequency of root colonization by *Cadophora* sp. was noted in the dual inoculation with *F. mosseae*. The same tendency was recorded for the dual inoculation with *Phialocephala turiciensis* and *G. rosea* in roots of *Trifolium repens* (Della Monica *et al.* 2015). This inhibition could be explained by a competition for nutrients or space or by the production of volatile/soluble secondary metabolites (Calvet, Barea and Pera 1992; Whipps 2001). However, the intensity of root colonization by the DSE fungus ( $MS\%$  and  $H_{DSE}\%$ ) was not affected in our study by the presence of the AM fungus. These observations suggest that DSE and AM fungi could colonize together the same root without affecting the colonization by the other fungi.

#### **2.4.2. Impact of *Cadophora* sp. and *F. mosseae* on plant growth**

Inoculation with *Cadophora* sp. did not affect plant dry weight when compared to the non-inoculated control. Conversely, inoculation with *F. mosseae* increased shoot biomass. Numerous studies concerned the impact of different strains of *F. mosseae* on plant growth growing on TE-contaminated soils (Takacs and Voros 2003; Citterio *et al.* 2005; Chen *et al.* 2007; Redon *et al.* 2009; Shahabivand *et al.* 2012; Hu *et al.* 2013). Conversely, studies on the

impact of DSE on plant growth are scarce. Inoculation by *C. finlandica* of *Salix* sp., *Salix caprea* and *Salix smithiana* in TE-polluted soils lead to neutral to negative effects on plant growth and TE concentration in shoots was not affected (Utmazian *et al.* 2007; De Maria *et al.* 2011). On the opposite, growth of birch and poplar increased on a TE-polluted soil as a result of the inoculation by *Cadophora* sp. (Chapter IV.2). This increase in growth was concomitant with a decrease of Cd concentration in shoots compared to non-inoculated plants (Berthelot *et al.*, submitted). In the present work, root colonization parameters were not correlated with growth of ryegrass. However, the lack of correlation between colonization rate and plant growth promotion was previously reported for both DSE and AM fungi (Hildebrandt *et al.* 2007; Utmazian *et al.* 2007). DSE inoculation did not alter growth of ryegrass suggesting a neutral relationship of the fungus with this plant. However, we observed a significant increase of Na concentration in shoots.

*F. mosseae* increased Na, K, and P concentrations in shoots. Numerous studies have shown that mycorrhizal roots are indeed more efficient in P uptake than non-mycorrhizal roots (Javot, Pumplin and Harrison 2007; Smith *et al.* 2011). The role of AM extraradical hyphae in P transport from soil to plants has also been largely reported (Smith *et al.* 2011; Bagyaraj, Sharma and Maiti 2015). For instance, Chen *et al.* (2007) demonstrated that the beneficial impact on the growth of *Coreopsis drummondii* on a TE-polluted soil was the result of root colonization by *F. mosseae*, and more particularly by the improved P uptake in plant tissues.

In accordance with previous studies (Vaz *et al.* 2012; Della Monica *et al.* 2015), we found no antagonist effect on the growth of ryegrass by the dual inoculation with the DSE and AM fungi. Shahabivand *et al.* (2012) reported that dual inoculation of wheat with *F. mosseae* and the well-known (non DSE) endophytic fungus *Piriformospora indica* in TE-polluted soils promoted plant growth. Similarly, several benefits towards eucalypt growth were observed as a result of the interaction between saprotrophic and *Rhizophagus irregularis* in TE-contaminated sites (Arriagada *et al.* 2014; Fuentes *et al.* 2016). However, the effect of a consortium of microorganisms on plant growth is usually plant-, microbe- and environment-dependent (Reininger *et al.* 2012). For instance, Rillig *et al.* (2014) reported that a consortium of AM and endophytic fungi increased the growth of *Lolium vulgare* and conversely decreased that of *Trifolium pratense*.

The dual inoculation with *Cadophora* sp. and *F. mosseae* decreased significantly Cd concentration in shoots. The *F. mosseae* P2 strain, isolated from a TE-contaminated soil, is highly tolerant to TE and reduced the transfer of Zn and Cd to shoots. This protective effect was attributed to the high metal sorption capacity of the hyphae (Joner and Leyval 1997; Joner *et al.* 2000). For DSE, Zhan *et al.* (2015) showed that *Exophiala pisciphila* could adsorb 81 to 97% of Cd onto their cell walls, but neither study was confirmed *in planta* nor performed for other DSE (such as *Cadophora* sp.). However, a recent work showed that *E.*

*pisciphila* could decrease Cd plant uptake by modifying Cd speciation in plant tissues and by down-regulating several plant TE transporters (Wang *et al.* 2016). However, further experiments are needed to ascertain whether these proteins effectively transport Cd or whether these plant transcriptional changes arise from a general regulation of ion homeostasis in response to the DSE fungus and/or to Cd exposure.

#### **2.4.3. Impact of *Cadophora* sp. and *F. mosseae* inoculation on soil enzymatic activity**

To assess the impact of inoculation by *F. mosseae* and *Cadophora* sp. on the rhizospheric activity, we studied the activity of alkaline phosphatase (PA) and the hydrolysis of fluorescein diacetate (FDA). The inoculation with either *F. mosseae*, *Cadophora* sp., or both fungi, did not affect the soil FDA activity compared to the non-inoculated control. As underlined by Margesin *et al.* (2006), the inoculation was not negative to the global rhizospheric activity. Similarly, the activity of PA did not vary in the presence of *Cadophora* sp. in the single or dual inoculation treatments. This result contrasts with the increase in AP activity in the rhizosphere of *T. repens* inoculated with the DSE fungus *Phialocephala glaciensis* (Della Monica *et al.* 2015). However, PA activity increased in the rhizosphere of ryegrass inoculated by *F. mosseae*. This increase could be explained by (i) the release of metabolites by the AM fungus which promoted rhizospheric activity (Azcón-Aguilar and Barea 2015) or by (ii) the secretion of phosphatases by the AM fungus, subsequently increasing the total pool of these enzymes in the rhizospheric soil (Liu *et al.* 2013; Sato *et al.* 2015). Thus, the AM-induced phosphatase activity could explain the increased labile pool of P observed in our study, as previously observed by several authors (Bagyaraj *et al.* 2015; Della Monica *et al.* 2015; Sato *et al.* 2015). Moreover, *F. mosseae* inoculation also increased the labile pool of K and the K concentration in shoots, as observed previously by Meena *et al.* (2014) and Dominguez-Nunez *et al.* (2016).

### **Conclusions**

We studied the tripartite interaction between ryegrass, *F. mosseae*, and *Cadophora* sp. in a TE-contaminated soil. For this purpose, we developed a qRT-PCR strategy, in supplement to conventional microscopic analyses, to monitor the dual fungal colonization. The co-inoculation between *Cadophora* sp. and *F. mosseae* did not impact plant growth and macroelement accumulation in shoots of the host plant. However, a synergic effect was observed for the decrease of Cd concentration in shoots. The inoculation of ryegrass with *F. mosseae* increased biomass production, but also P, Na, and K plant nutrition. Additionally, *F. mosseae* inoculation allowed a stimulation of the activity of alkaline phosphatase in the soil. However, the interactions between *Cadophora* sp., *F. mosseae* and plants may be fungal and plant species-dependent. Further experiments will be needed to address whether other combinations of AM and DSE fungi from the Helotiales would also be neutral or synergic. More generally, the multiplicity of AM and DSE co-inhabitants in roots could favor plant fitness and response against biotic and abiotic stresses through additive aspects. For instance, plant could benefit from AM fungi as effective nutrient providers and from DSE as

biocontrol agents against phytopathogens. In TE-polluted sites, plants have to cope with metal stress but very often have also to face poor nutrient conditions and biotic stress. Therefore, plant co-inoculation with both AM and DSE fungi might be considered as a promising strategy in the context of fungus-assisted phytomanagement of TE-contaminated sites.



## V. Étude des mécanismes contribuant à la tolérance aux ETM chez les DSE

---



Illustrateur : Florian Lamousse



Dans les **chapitres III et IV** nous avons mis en évidence que les sept DSE isolés sont tolérants aux ETM, et que leur colonisation peut permettre de promouvoir la croissance végétale dans des substrats contaminés par des ETM ou non. Malgré le séquençage du génome de plusieurs souches de DSE ces dernières années (*e.g. Microdochium Bolleyi*, *Periconia macrospinoso*, *Cadophora* sp. et *Leptodontidium* sp.), les mécanismes mis en place chez ces endophytes pour expliquer **leur tolérance aux ETM** sont encore mal connus, et tout particulièrement pour les *Helotiales*. Ces recherches pourraient permettre à l'avenir de définir des **traits fonctionnels** à sélectionner et à domestiquer chez les DSE. Les études mécanistiques peuvent être réalisées par génétique dite « **ciblée** » (ou inverse) et/ ou par génétique dite « **sans a priori** » (ou classique). La génétique ciblée est une approche génétique cherchant à comprendre la fonction des gènes donnés par l'observation de mutants correspondants, tandis que la génétique sans *a priori* traite d'un phénotype mutant donné et cherche à identifier le gène responsable. Ainsi, la possibilité de **transformation** de ces champignons est un pilier essentiel dans l'étude de leur génétique et physiologie.

Dans ce chapitre, nous avons expérimenté l'utilisation de l'agrotransformation (via la bactérie *A. tumefaciens*) dans le but de réaliser des insertions aléatoires dans un ensemble de souches DSE. Pour ce faire, nous avons comparé l'efficacité de transformation de huit souches DSE appartenant aux genres *Cadophora*, *Leptodontidium*, *Phialophora* et *Cladosporium* en utilisant un matériel fongique initial de deux âges distincts (deux jours et deux semaines). Toutes les souches ont pu être transformées avec succès. L'agrotransformation par *A. tumefaciens* s'est révélée souche-dépendante avec des pourcentages de réussite allant de 0,6 à 125 %. Trois souches (*Leptodontidium* sp. Me07, *Leptodontidium* sp. Pr30, *Cadophora malorum* CBS 101367) ont été significativement plus transformées en utilisant un mycélium âgé de deux semaines par rapport à un mycélium âgé de deux jours. A l'inverse la souche *Phialophora mustea* Pr29 est plus facilement transformable avec un mycélium âgé de deux jours. Les transformants sont stables mitotiquement et expriment le marqueur GFP. L'apparition des premiers transformants est variable selon la souche étudiée. Nous avons également étudié l'effet du contenu en mélanine sur la réussite de l'agrotransformation. Les souches possèdent des teneurs variées en mélanine, comprises entre 0,6 et 3,7 mg par gramme de mycélium sec. L'ajout de tricyclazole dans le milieu de culture diminue la teneur en mélanine tandis que le Cu engendre une augmentation de la teneur en mélanine. Cependant, il n'y a pas de corrélation entre la teneur en mélanine et la réussite de la transformation.

D'autre part, au travers des chapitres précédents la souche Me07 a montré (i) une tolérance élevée aux ETM (**Chapitre III-1**), (ii) la capacité à promouvoir la croissance de certaines plantes (**Chapitre III-1**) et (iii) à être facilement transformable génétiquement (**Chapitre V-1**). Cette souche s'avère donc très intéressante pour l'étude de la tolérance aux ETM des DSE. Dans le but de découvrir quels mécanismes sont impliqués dans la tolérance

aux ETM, une approche de **mutagenèse aléatoire**, utilisant *A. tumefaciens*, a été menée. Mille trois cent mutants, dont une dizaine de mutants **non pigmentés** (*i.e.* albinos), un mutant présentant une hyperpigmentation et une vingtaine d'autres présentant des altérations de leur morphologie (*e.g.* mycélia plus aériens, ou possédant différentes couleurs) ont ainsi été obtenus. L'ensemble des mutants a été criblé avec deux concentrations de **Zn**. Le choix de cet élément repose (i) sur sa capacité à être à la fois **essentiel et toxique** pour le métabolisme cellulaire, (ii) sur son **abondance** dans les sites et sols pollués français (7<sup>ème</sup> polluant majeur, source Basol) et (iii) sur le manque de connaissance de l'effet de cet élément chez les DSE. Ce travail est le **premier** illustrant la création et le criblage d'une banque de mutants de champignons DSE. Dix-huit mutants présentant une sensibilité importante au Zn ont été obtenus. Leur capacité à accumuler le Zn, les principaux éléments majeurs et traces a été analysée. Parmi ces mutants, le transformant T1 présente une sensibilité exacerbée au Zn et accumule deux fois plus de Zn et de Mg que la souche sauvage. Chez cette souche, l'analyse moléculaire par **TAIL-PCR** a permis d'identifier que l'insertion ADN-T est située au niveau du promoteur d'un gène appartenant à la famille des CorA et à la sous famille **MNR2**. La délétion de ce gène chez *S. cerevisiae* et chez *Leptodontidium* sp. Me07 entraîne une sensibilité au Co, au Mn, au Ni et au Zn. Cependant l'expression hétérologue du gène LpMNR2 dans la levure restitue la tolérance à ces éléments. De plus, la fusion de la protéine rapportrice GFP à LpMNR2 a permis de localiser la protéine chimère au niveau de la **membrane vacuolaire**. L'ensemble des approches menées dans ce travail nous a permis d'acquérir des connaissances approfondies sur le rôle du transporteur MNR2 chez le champignon *Leptodontidium* sp. Me07.

Cependant, au regard de la littérature, d'autres paramètres tels que les composés pariétaux peuvent également avoir un rôle primordial dans cette résistance. La mélanine est un polymère noir présent dans les spores et les parois cellulaires des champignons. Chez les DSE, elle est en quantité non négligeable et leur confère leur couleur noire-brune caractéristique. Bien que la mélanine ait été découverte il y a une soixantaine d'années, sa structure complexe et les difficultés rencontrées pour l'extraire ont retardé les recherches concernant les rôles de cette molécule (Eisenman and Casadevall 2012). Néanmoins certaines études, essentiellement basées sur des observations visuelles ou sur l'utilisation de souches albinos, ont mis en évidence certaines fonctions possibles de la mélanine dans la virulence, et dans la protection contre les stress biotiques (*e.g.* lyse enzymatique) et abiotiques (*e.g.* UV, sécheresse et salinité) (Butler *et al.* 2005; Gessler *et al.* 2014). Par ailleurs, certains auteurs ont suggéré que la teneur élevée en mélanine des DSE pourrait être une des raisons justifiant leur abondance dans les milieux hostiles et tout particulièrement dans les zones polluées par des ETM. Néanmoins le rôle de la mélanine dans la tolérance aux ETM reste encore mal compris.

Afin de vérifier si la mélanine joue un rôle dans la tolérance aux ETM, nous avons réalisé une série de tests utilisant (i) des mutants albinos isogéniques obtenus dans le

chapitre V à partir de l'agrotransformation de la souche *Leptodontidium* sp. Me07 et (ii) des inhibiteurs des trois voies de biosynthèse de la mélanine présentes chez les Ascomycètes. A partir de six souches DSE appartenant aux genres *Cadophora*, *Leptodontidium* et *Phialophora* nous avons étudié (i) quelles sont les voies de biosynthèse de la mélanine chez les DSE, (ii) quel est l'impact de la mélanine sur la tolérance aux ETM puis (iii) quel est l'effet de la mélanine sur l'accumulation des ETM. Les DSE étudiés produisent majoritairement de la mélanine de type 1,8-dihydroxynaphtalène (DHN) mais trois souches produisent également, en quantité faible de la mélanine de type 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA). L'inhibition de la synthèse de la mélanine chez les six souches n'a pas d'effet sur leur tolérance vis à vis du Cd, de l'As et du Zn. Ce résultat est également observé au travers de l'utilisation de mutants *Leptodontidium* sp. Me07 albinos ou très peu pigmentés. A l'inverse, la mélanine a un effet, métal dépendant et/ou souche dépendant, sur l'accumulation de l'As, du Cu, du Cd et du Zn.

Ce chapitre est ainsi divisé en trois parties, présentées sous la forme d'articles en anglais: La première partie fait l'objet d'une publication acceptée chez ***Fungal biology***, référencée dans la suite du manuscrit par **Berthelot et al. 2017b** (doi : ). Les deux autres seront soumises prochainement.



## 1. Melanization and ageing are not a drawbacks for successful agro-transformation of dark septate endophytes

### Abstract

Dark septate endophytes (DSEs) are melanin-enriched ascomycetous fungi that are abundant in stressed environments. However, little is known about their physiology and metabolism, and DSE genes have not been functionally characterized yet. Therefore developing molecular genetic tools to investigate the biological function of genes of interest in DSEs is of major significance. We investigated *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) efficiency in eight DSE strains belonging to *Cadophora* sp., *Cadophora malorum*, *Leptodontidium* sp., *Phialophora mustea*, and *Cladosporium cladosporioides*. ATMT efficiency was DSE-dependent and ranged from 0.6% to 125 %. The transformants were mitotically stable and expressed the gfp marker. The patterns of transformant appearance as a function of time were diverse and also strain-dependent. We further focused on the effect of mycelium ageing on ATMT efficiency. *Leptodontidium* sp. Me07, *Leptodontidium* sp. Pr30, and *C. cladosporioides* CBS 101367 were significantly more transformed using fifteen-day-old mycelium (44.5, 6.9, and 1.1%, respectively) as compared to two-day-old mycelium (121, 28.7, and 25.1, respectively), whereas *P. mustea* Pr29 was more transformed using young mycelium (21.5% compared to 5.3% for the old mycelium). Finally, we focused on the effect of melanin content on ATMT efficiency. Melanin content in mycelium ranged from 0.9 to 3.2 mg per gram of dry weight. Tricyclazole, an inhibitor of melanin biosynthesis, negatively modulated melanin content, while copper, an inducer of melanin biosynthesis, positively modulated them. However there was no correlation between hyphal melanin content and ATMT efficiency.

### 1.1. Introduction

Dark septate endophytes (DSEs) are miscellaneous, ascomycetous fungi hosted by plant roots. They are distributed worldwide, under various climates ranging from polar to tropical ecosystems (Mandyam & Jumpponen, 2005). They are common under harsh conditions such as arid, dry, saline, and polluted environments (Knapp *et al.* 2012; Vrålstad *et al.* 2002; Zhang *et al.* 2013). Their tolerance to these unfavorable conditions may be partially explained by the structure of their hyphae which possess melanin-enriched cell walls (Ban *et al.* 2012). The relatively high abundance of DSEs in stressed habitats suggests that they might have an important function for host survival in these ecosystems (Likar & Regvar, 2013). However, their effects on plant growth are still poorly elucidated. Several studies and meta-analyses support the view that DSEs could have a beneficial role on plant growth and fitness (Addy *et al.* 2005; Alberton *et al.* 2009; Mandyam & Jumpponen, 2015;

Mayerhofer *et al.* 2013; Newsham 2011). Several studies report plant-growth-promoting abilities of DSEs through increased biomass production and protection against biotic (pathogen) (Khastini *et al.* 2014; Tellenbach *et al.* 2013) or abiotic stress (drought, salinity, pollution) (Barrow 2003; Deram *et al.* 2011; Likar & Regvar, 2013; Sonjak *et al.* 2009). Although DSEs might be an important component of plant tolerance, little is known about the molecular mechanisms that underpin their interactions with host plants.

The sequencing of the genomes of *Cadophora* sp., *Leptodontidium* sp., *Microdochium bolleyi*, *Periconia macrospinosa*, and *Harpophora oryzae* (David *et al.* 2016; Xu *et al.* 2014) was completed recently. However, DSE genes/proteins have not been functionally characterized yet. Therefore developing molecular genetic tools to investigate the biological function of genes of interest in DSEs is of major significance. The generation and characterization of knock-out mutants represent a powerful strategy for deciphering the roles of these genes/proteins (Herrera-estrella *et al.* 2004; Jiang *et al.* 2013). Among the techniques used for fungal transformation (particle bombardment, electroporation, PEG transformation...), *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) is considered as the most promising one (Mullins & Kang, 2001). A number of fungi such as yeasts, or pathogenic, mycorrhizal, endophytic and biocontrol fungi are indeed amenable to this transformation system (Michielse *et al.* 2005). Additionally, ATMT has several advantages. First, it does not require protoplasts or biolistic methods to transform cells and can be performed directly from mycelium. Second, it can generate a high percentage of transformants with a single-copy and randomly integrated DNA to facilitate the isolation of tagged genes. Finally, its application has been widely used for studies involving gene knockout, over-expression, complementation, and generating random integrations (Meyer 2008; Michielse *et al.* 2005).

Up to now, ATMT of DSE has only been performed on the four species *Cladosporium cladosporioides*, *Harpophora oryzae*, *Cadophora finlandica* and *Phialocephala fortinii* (Gorfer *et al.* 2007; Su *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2011), and more investigations are required to better understand the parameters that influence their transformation. ATMT protocols for various fungi indicate that a number of parameters affect transformation efficiency. These parameters include (i) fungal parameters such as the choice of the species and the initial material (*e.g.* spores, protoplasts, mycelium) (Michielse *et al.* 2005), (ii) bacterial parameters such as the *A. tumefaciens* strain and its cell density (Flowers & Vaillancourt, 2005; Tzima *et al.* 2014), and (iii) co-cultivation conditions such as the use of acetosyringone, incubation time, and temperature (Combiér *et al.* 2003; Tzima *et al.* 2014). Among these factors, the addition of acetosyringone in the culture medium and the incubation time of the fungal-bacterial co-cultivation are usually reported as important drivers of a successful ATMT. By contrast, the effect of mycelium ageing has been poorly investigated. Moreover, the effect of hyphal melanin content on ATMT efficiency has not been studied yet. Melanin is a dark pigment that provides structural rigidity to cell walls and protects cells against abiotic (UV, drought, metal) and biotic stress (lytic enzymes, pathogen attacks, antibiotics, drugs) (Butler

& Day, 1998; Van Duin *et al.* 2002; Gessler *et al.* 2014). According to Zhan *et al.* (2011) and Wheeler (1983), DHN-melanin, synthesized from 1,3,6,8-tetrahydroxynaphtalene, is admittedly the main form of melanin produced by ascomycetes, and tricyclazole was reported as an inhibitor of DHN-melanin synthesis. Conversely, copper treatment promoted melanin synthesis in cell walls of several fungi such as *Amorphotheca resinae*, *Aureobasidium pullulans*, and *Gaeumannomyces graminis* (Fogarty & Tobin, 1996; Gadd & Griffiths, 1980) DSEs are therefore suitable melanin-enriched fungal models to test whether a high melanin content in cell walls can affect ATMT. Finally, the majority of studies have investigated the transformation of a single strain or species using different protocols, so that generalizing the data is rather tricky.

We compared ATMT efficiency among eight strains belonging to four different DSE genera with an emphasis on the effect of (i) mycelium ageing, and (ii) the mycelium melanin content on ATMT efficiency.

## 1.2. Materials and methods

### 1.2.1. Strains, plasmid, and growth conditions

Eight DSEs were used. The species, their origin and accession numbers are detailed in **Table V-1**. DSEs were cultured on malt extract agar (MEA) medium at 24°C in the dark. The *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA101 was used for fungal transformation. It harbors the pFAT-gfp binary vector that carries (i) the bacterial hygromycin B phosphotransferase (*hph*) ORF under the transcriptional control of the *Aspergillus nidulans trpC* promoter, and (ii) the green fluorescent protein (*gfp*) ORF under the control of the *A. nidulans* glyceraldehyde-3-phosphate promoter (Fitzgerald *et al.* 2003). The bacteria were grown at 28°C on Luria-Bertani (LB) agar medium supplemented with 100 µg ml<sup>-1</sup> spectinomycin.

### 1.2.2. Molecular identification of the fungal strains

Fungal DNA was extracted using a REDextract-N-Amp™ Plant PCR kit (Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) according to the manufacturer's protocol. The internal transcribed spacer (ITS) region was amplified using the primers ITS1 and ITS4 (White *et al.* 1990). Twenty microliters of a mixture containing 0.2 µM of each primer, 4 µl of genomic DNA, 5.2 µl of water and 10 µl of REDextract-N-Amp PCR ready mix were used for PCR amplification. The following PCR program was used: an initial denaturation step of 3 min at 94°C, followed by 40 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, and 72°C for 1 min, and a final extension step at 72°C for 10 min. PCR products were cloned into the pGEM-T® vector system I (Promega, Charbonnières-les-Bains, France), and the corresponding plasmids were sequenced. The ITS sequences were used to retrieve similar sequences from GenBank using the NCBI BLAST program. Sequence alignment was carried out using Clustal X. Bootstrap analysis was performed with 1,000 replications. The neighbor-joining (NJ) tree was drawn

with the p differences model and gamma for rate heterogeneity using MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013).

### **1.2.3. *A. tumefaciens*-mediated transformation**

DSEs were transformed by *A. tumefaciens* following a modified version of the protocol used by Pardo *et al.* (2002). Electro-competent cells of *A. tumefaciens* strain EHA101 were transformed with the pFAT-gfp vector, using a Cell-Porator apparatus (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The transformants were selected on LB medium containing 100 µg ml<sup>-1</sup> of spectinomycin. *A. tumefaciens* was grown overnight at 150 rpm in LB medium containing 100 µg ml<sup>-1</sup> spectinomycin. The cells were subsequently diluted to an OD<sub>600</sub> of 0.2 in LB induction medium (IM) containing 200 µM acetosyringone and 100 µg ml<sup>-1</sup> of spectinomycin, and further incubated until an OD<sub>600</sub> of 0.6 was reached. In a first experiment, and in order to compare the effect of ageing of the initial mycelium (used for the pregrowth step) on ATMT efficiency, fungal plugs were taken from two contrasting zones of the fungal colonies (grown on MEA medium). The 2-day-old mycelium corresponded to fresh mycelium at the close periphery of the mother colony, whereas the 15-day-old mycelium was taken from the deep center of the colony. In a second experiment, to study the impact of melanin content of mycelia on ATMT efficiency, fungal plugs were taken from fungal cultures growing on MEA medium or on the same medium amended with copper (200 µM) or tricyclazole (10 µg ml<sup>-1</sup>). In both experiments, 1-mm agar plugs (20 plugs/Petri dish) were deposited on sterilized cellophane membranes on MEA medium (first experiment) or on the same medium amended or not with copper (200 µM) or tricyclazole (10 µg ml<sup>-1</sup>) (second experiment). After three days of fungal pre-growth, co-cultivation between the fungal colonies and *A. tumefaciens* was done as described by Bellion *et al.* (2007). The media used during the co-cultivation step were the same than the ones used in the pre-growth step. Finally, the fungal colonies, together with the cellophanes membranes, were transferred to MEA medium containing 250 µg ml<sup>-1</sup> hygromycin B (selection step). The appearance of the transformants was recorded every week. Resistant colonies were individually harvested and isolated for vegetative propagation on the same selective medium.

### **1.2.4. Mitotic stability**

The mitotic stability of the transformants was determined by analyzing the stability of hygromycin B resistance. Five randomly selected transformants per DSE were sub-cultured every three weeks alternatively on MEA medium with or without hygromycin B. Transformants were classified as stable when they remained resistant to hygromycin B after seven sub-cultures.

### **1.2.5. Molecular analysis of the transformants**

To confirm the positive transformants for T-DNA insertions in the host genomes, five transformants per DSE were randomly selected to amplify two inserted sequences. The *hph* gene was amplified with the primers hphF (5'-ATGCCTGAACTACCGCGACGTCTGT-3') and

hphR (5'-CTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGT-3'), and the *gfp* gene was amplified with the primers *gfpF* (5'-ATGAGCAAGGGCGAGGAAGTTC-3') and *gfpR* (5'-TCACTTGTACAGCTCGTCCATG-3'). Fungal DNA was extracted from the mycelia using the REDextract-N-Amp™ Plant PCR kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's protocol. PCR amplification was performed using Phire Hot Start II DNA polymerase (Fischer Scientific, Illkirch, France) with the following program: initial denaturation at 98°C for 30s, 40 cycles of 98°C for 5s, 63°C for 5s and 72°C for 10s, and a final extension step at 72°C for 1 min. To verify the absence of contaminating *A. tumefaciens* cells within the resistant fungal colonies, a control PCR was also performed with the primers *SpecF* (5'-ATGAGGGAAGCGGTGATCGCCGAA-3') and *SpecR* (5'-TTATTTGCCGACTACCTTGGTGAT-3') that are specific to the spectinomycin resistance gene located on the pFAT-gfp plasmid but outside the T-DNA region. PCR conditions were the same as described above except that the annealing temperature was set to 51°C. Negative controls were obtained from the wild-type fungal strains whereas *A. tumefaciens* was used as a positive control. The PCR products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gels.

#### 1.2.6. Fluorescence microscopy

To screen for GFP expression in the transformants, three randomly chosen transformants per DSE were cultured for one week on a glass slide covered by a thin layer of MEA medium. A filter was used to select an excitation wavelength within the 475–500 nm band, and fluorescence emission was recorded above 520 nm. The wild-type strains of the different DSE species were used as controls.

#### 1.2.7. Melanin extraction and quantification

Melanin extraction was performed from 15 day-old colonies grown on MEA plates supplemented with or without 200  $\mu$ M CuCl<sub>2</sub> or 10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> tricyclazole. Mycelia were harvested and dried overnight at 50°C and ground to a thin powder. The extraction process was carried out according to the method of Zou *et al.* (2010), with modifications. The powder (1g) was washed for 5 min with 30 ml of distilled water, followed by a centrifugation step at 4,000 rpm for 5 min. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in NaOH 6M to reach a final pH of 12. The mixture was sonicated at 40 Hz for 24 h at 50°C and centrifuged at 4,000 rpm for 5 min. The alkaline pigmented extract was then acidified to pH 2 with HCl 8M to precipitate melanin, followed by a centrifugation step at 10,000 rpm for 20 min. Melanin was finally washed with chloroform and ethyl acetate. For quantification, melanin was dissolved in NaOH 0.1M and the OD<sub>400nm</sub> of the solution was determined. Blanks were performed with NaOH 0.1M. A standard curve was obtained with synthetic melanin (M8631, Sigma-Aldrich).

### 1.2.8. Data analysis

Statistical analyses were performed with R 3.1.3 (R Core Team, 2013) software. Normality of the data was tested using a Shapiro-Wilk test. Data were then analyzed by one-way ANOVA or by a one-way non-parametric Kruskal-Wallis test (alpha level of 0.05). Furthermore, analysis of covariance (ANCOVA) was used to study the optimal time to obtain transformants for the different strains. The effect of compounds reducing or stimulating melanin synthesis, mycelium age and the interaction between these two factors on ATMT of the DSEs was tested by a two-way ANOVA. Pearson correlation coefficients ( $r$ ) were calculated to determine the relationship between mycelial melanin contents and ATMT efficiency. All values are means  $\pm$  standard errors (SE). Percentage values were arcsin-transformed before statistical analyses.

## 1.3. Results

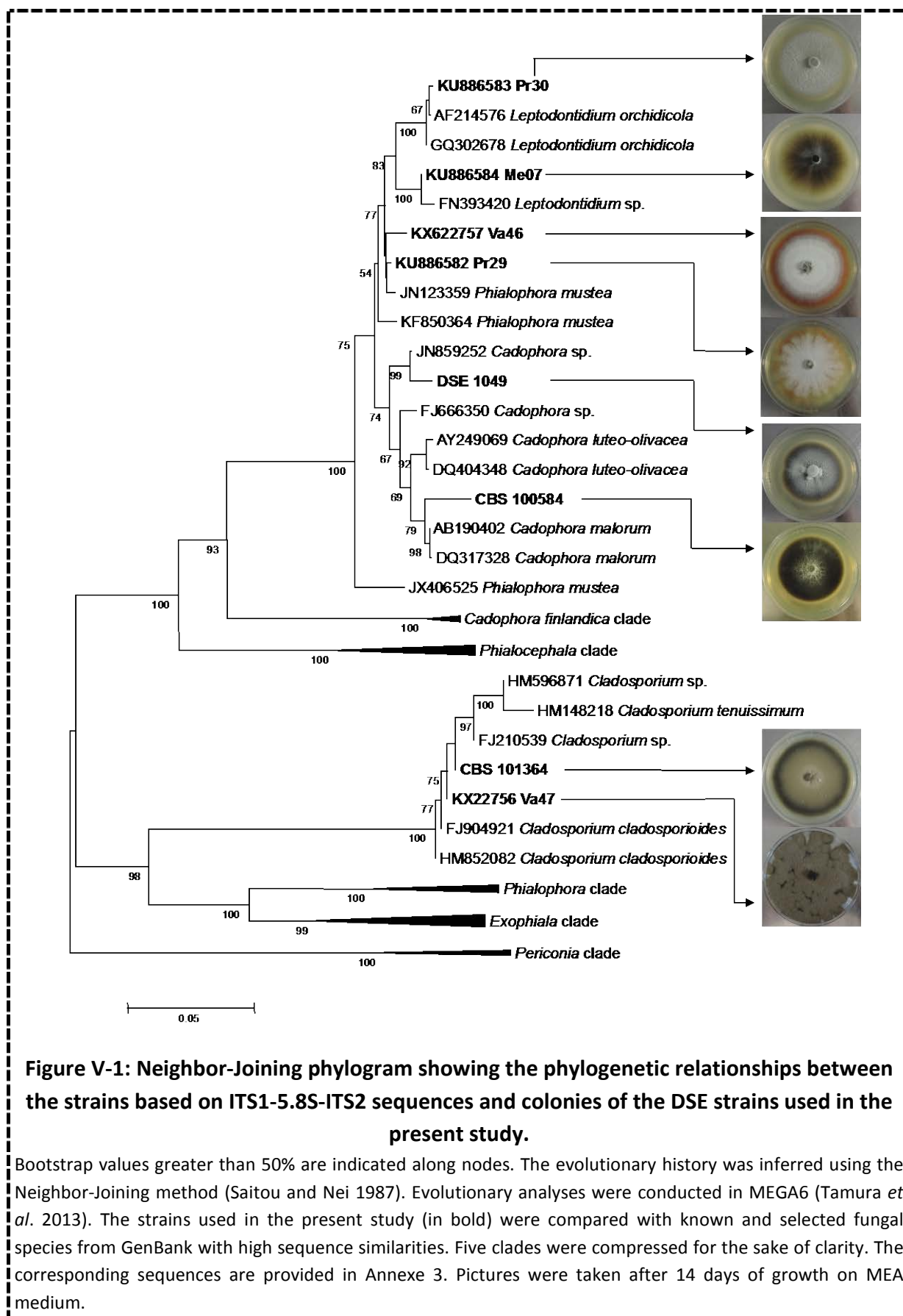
### 1.3.1. Molecular identification of the fungal strains

Fifteen DSE strains were used (**Table V-1**). The isolation and the taxonomic affiliation of strains Pr29, Pr30, and Me07 are reported in Berthelot *et al.* (2016). Strains CBS 101367, CBS 100584, and DSE 1049 belong to fungal collections. Strains Va47, and Va46 were isolated from birch roots, and their taxonomic affiliations were performed by analyzing their ITS1-5.8S-ITS2 regions. A neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree was drawn using sequences from the DSE strains reported in Berthelot *et al.* (2016) (Chapter III-1) as well as from other endophytic strains (**Figure V-1**). Va46 had a very close evolutionary relationship to *Phialophora mustea* (JN123359) and to the previously described Pr29. CBS 100584 was assigned to the genus *Cadophora* (99% identity with *Cadophora* sp. JN859254). CBS 101367, and Va47 had a close evolutionary relationship to *Cladosporium cladosporioides* (FJ904921). Additionally, a phylogenetic analysis relying on the maximum likelihood method was also performed and confirmed the confidence level of the clustering (data not shown). Sequence data were deposited in GenBank under the following accession numbers: KX622757 (Va46), and KX622756 (Va47). As previously reported for several fungal species (Vellinga 2006; Cardoso *et al.* 2007), mycelium color was described (**Table V-1**) using the Munsell chart (Munsell, 1954). The strains clustered into four groups: (i) the yellow red (YR) group (DSE 1049, CBS 100584, Va47, Pr30, Pr29), (ii) the red (R) group (Va46), (iii) the gray (G) group (Me07), and (iv) the olive group (CBS 101367).

### 1.3.2. Confirmation of DSE ATMT

To establish the mitotic stability of ATMT, five randomly selected transformants per strain (when available) were grown for seven consecutive cultures with or without hygromycin B. All the mutants were resistant to hygromycin B (data not shown), confirming a stable maintenance of the *hph* marker gene across the successive generations. The stability of the transformants was also confirmed by checking for the presence of the *hph* and *gfp* genes by PCR. The expected 1,020 bp (*hph*) and 717 bp (*gfp*) fragments were

detected in all transformants, but not in the wild-type strains (data not shown). Conversely, there was no amplification of the spectinomycin resistance gene. This result therefore confirms T-DNA integration into the DSE genomes and also rules out any remaining bacterial contamination in mycelium. Moreover, GFP-derived fluorescence was recorded in hyphae and conidia (**Figure V-2**). Untransformed strains did not emit any GFP-derived fluorescence under the same excitation and emission conditions. However, all mutants emitted GFP-derived fluorescence, and fluorescence intensity was mutant-dependent. We also noted that fluorescence intensity was attenuated by the dark pigmentation of several DSE species. DSE 1049 particularly emitted a weak GFP signal (data not shown).



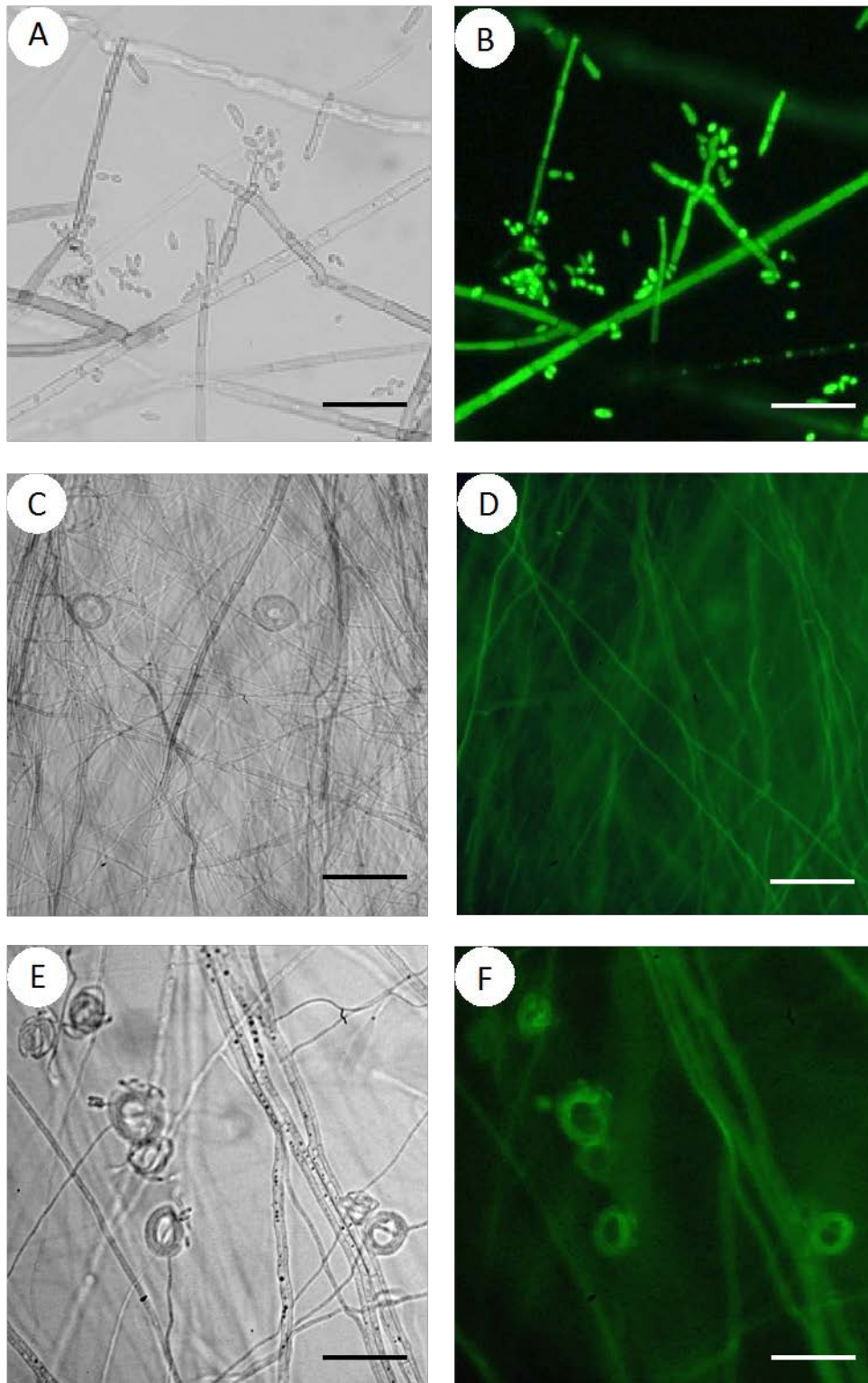
**Figure V-1: Neighbor-Joining phylogram showing the phylogenetic relationships between the strains based on ITS1-5.8S-ITS2 sequences and colonies of the DSE strains used in the present study.**

Bootstrap values greater than 50% are indicated along nodes. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei 1987). Evolutionary analyses were conducted in MEGA6 (Tamura *et al.* 2013). The strains used in the present study (in bold) were compared with known and selected fungal species from GenBank with high sequence similarities. Five clades were compressed for the sake of clarity. The corresponding sequences are provided in Annexe 3. Pictures were taken after 14 days of growth on MEA medium.

**Table V-1: Dark septate endophytic strains used in the present study.**

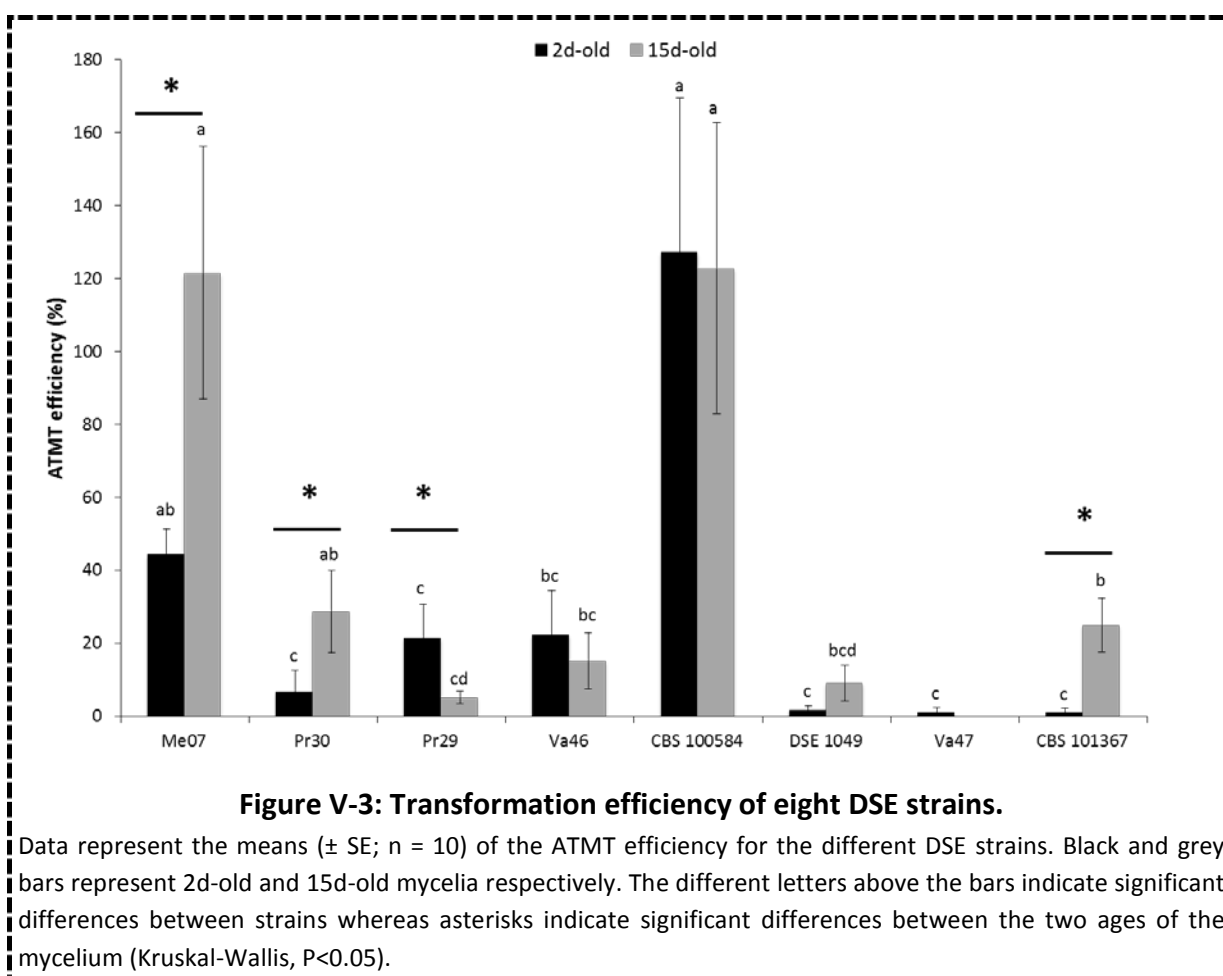
| Strains    | Taxonomic affiliation               | Acc. number | Origin                       | Colony color (Munsell chart)       |
|------------|-------------------------------------|-------------|------------------------------|------------------------------------|
| DSE 1049   | <i>Cadophora</i> sp.                | JN859258    | (Vági <i>et al.</i> 2014)    | 10YR(3/2) Very dark greenish brown |
| CBS 100584 | <i>Cadophora malorum</i>            | AY249062    | CBS <sup>1</sup>             | 10YR(2/1) Black                    |
| Va47       | <i>Cladosporium cladosporioides</i> | KX22756     | This study                   | 10YR(4/2) Dark grayish brown       |
| CBS 101367 | <i>Cladosporium cladosporioides</i> | HM148002    | CBS <sup>1</sup>             | 5Y(4/4) Olive                      |
| Me07       | <i>Leptodontidium</i> sp.           | KU886584    | Berthelot <i>et al.</i> 2016 | 5YR(5/2) Reddish gray              |
| Pr30       | <i>Leptodontidium</i> sp.           | KU886583    | Berthelot <i>et al.</i> 2016 | 10YR(6/1) Gray                     |
| Va46       | <i>Phialophora mustea</i>           | KX622757    | This study                   | 10R(5/8) Red                       |
| Pr29       | <i>Phialophora mustea</i>           | KU886582    | Berthelot <i>et al.</i> 2016 | 7.5YR(6/6) Reddish brown           |

<sup>1</sup>CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands.



**Figure V-2: Fluorescence microscopy analysis of selected DSE transformants.**

A-B: *Cladosporium cladosporioides* CBS 101367; C-D: *Cadophora* sp. DSE 1049, E-F: *Phialophora mustea* Pr29. Images from the same hyphae and spores are shown in bright field (A-C-E) and GFP fluorescence (B-D-F). Pictures were taken after two weeks of growth on MEA medium. Bars = 50  $\mu$ m.



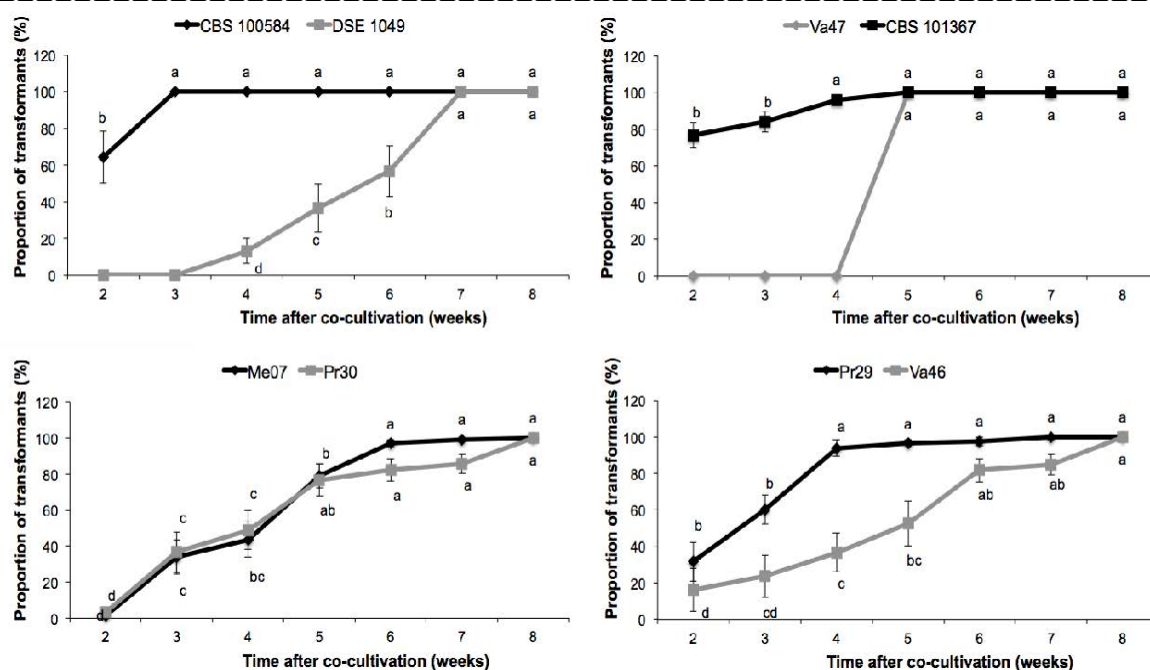
### 1.3.3. Comparison of ATMT efficiency among the different DSE strains

To compare ATMT efficiency on a batch of DSEs, we co-cultured eight strains belonging to four different genera with *Agrobacterium* and selected transformants. To compare the effects of the age of the initial mycelium on ATMT efficiency, fungal plugs were taken from two contrasting zones of the fungal colonies corresponding to 2- and 15-day-old mycelia to prepare colonies to be used for co-culture (**Figure V-3**). Statistical analyses showed that ATMT efficiency was strain-dependent ( $P < 0.001$ ). ATMT efficiency ranged between 0.6 and 127 % (**Figure V-3**). CBS 100584 and Me07 produced the highest number of transformants. For both strains, two independent transformants frequently originated from the same initial fungal plug. Compared to CBS 100584 and Me07, the ATMT efficiency values for Pr30, Pr29, Va46, and CBS 101367 were significantly lower (between 12 and 18 %), and DSE 1049, and Va47 were poorly transformed (**Figure V-3**).

The 2-day-old mycelium corresponded to fresh mycelium at the close periphery of the colony, whereas the 15-day-old mycelium was taken from the deep center of the colony. Contrasting color phenotypes were usually observed between the two zones (**Figure V-1**). Two-way ANOVA results revealed significant differences in ATMT efficiency among the

fungal strains and for the strain-mycelium age interaction, but there was no significant difference for the "mycelium age" parameter ( $P < 0.01$ ;  $P < 0.01$  and  $P = 0.356$ , respectively). However, ATMT efficiency of Me07, Pr30 and CBS 101367 was significantly higher with 15-d-old mycelium than with 2-d-old mycelium, while more transformants developed from Pr29 2-d-old mycelium. Finally, the efficiency of the transformation of CBS 100584, Va47, DSE 1049, and Va46 was not influenced by mycelium age (**Figure V-3**).

The first transformants were recorded after two weeks on the selective medium, whereas the last ones were recorded after eight weeks (**Figure V-4**). However, the pattern of appearance of the transformants as a function of time differed among the strains. Most of the CBS 100584 and CBS 101367 transformants appeared during the second week, and the remaining transformants were recorded in the following two weeks. This was also the case for Pr29 even if only 31.6 % of the transformants appeared during week 2. Conversely, transformant appearance was more progressive for Me07, Pr30, and Va46. Moreover, the delay to obtain the rare DSE 1049 transformants was longer: they only appeared during weeks 4.



**Figure V-4: Strain-dependent time course of the appearance of transformants on the selective medium.**

The delay for transformant appearance was noted; data are given as means ( $\pm$  SE;  $n = 10$ ) of relative percentages of transformants detected at a given time. The total number of transformants for each strain was set to 100%. Different letters indicate significant differences between weeks for a given strain (ANCOVA,  $P < 0.05$ ).

#### 1.3.4. Effect of melanin contents on ATMT efficiency

Melanin contents were determined in the mycelium of the different strains. The extracted molecules were yellow to black, insoluble in water and in several organic solvents (chloroform, ethyl acetate, ethanol), soluble in 0.1 N NaOH, precipitated in HCl and were discolored by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (data not shown). Altogether these observations confirm that the extracted molecules possessed typical characteristics of melanin (Gessler *et al.*, 2014).

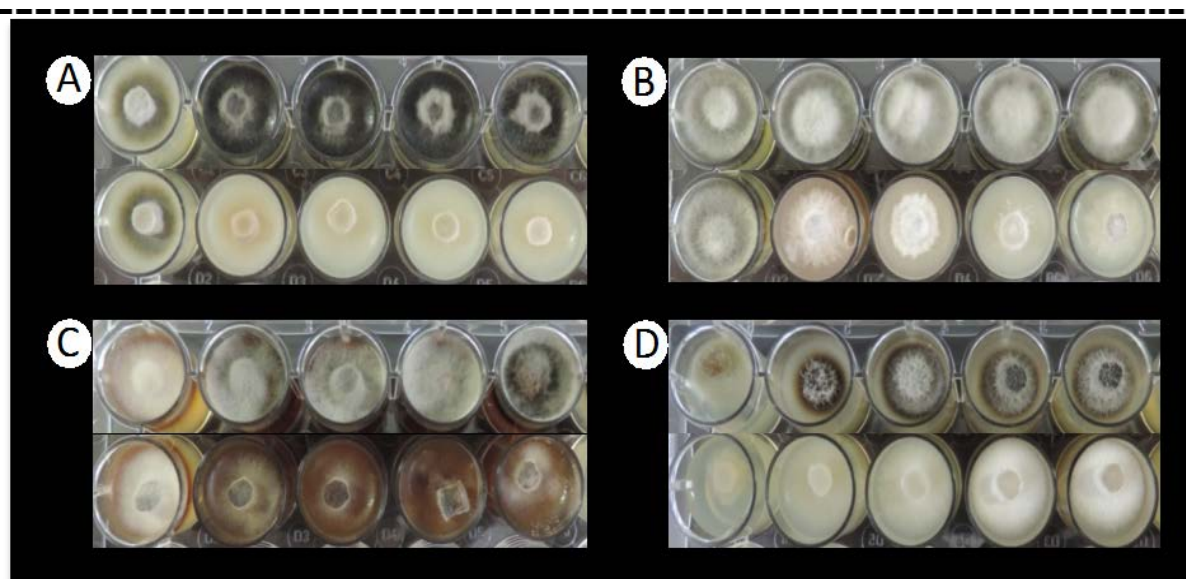
The mycelial melanin contents ranged between 0.9 (Me07) and 3.7 mg/g DW (Va46). Pearson correlation coefficient was estimated between ATMT efficiency levels and melanin contents, but there was no significant correlation ( $P=0.06$ ,  $r=-0.43$ ).

To confirm the previous results, we evaluated the ATMT efficiency levels and the melanin contents of four strains grown in the presence of a melanin synthesis inhibitor (tricyclazole) or a melanin synthesis inducer (Cu) (**Table V-2**). These strains were selected according to two criteria: their pigmentation phenotype (**Figure V-1**), and their different responses to transformation (recalcitrant to easily transformable). Under tricyclazole treatment, the colonies displayed lighter colors but also accumulated a red/brown pigment (**Figure V-5**). Under the copper treatment, they exhibited a darker aspect. Adding tricyclazole to the culture medium of Me07, Pr30, Va46 and Pr29 significantly decreased mycelial melanin contents (**Figure V-5**). Conversely, adding copper increased the mycelial melanin contents of Me07, Pr30, and Va46. The melanin content of Pr29 remained unchanged. ATMT efficiency was only significantly reduced for Me07 under the copper treatment as compared to the control. Finally, the relationship between melanin content and ATMT efficiency was studied through Pearson correlation tests but no significant correlation was evidenced (**Table V-2**).

#### 1.4. Discussion

In the recent years, DSEs have been under focus because of their abundance in multiple ecosystems and the diversity of species and functions they offer (Jumpponen and Trappe 1998a; Mandyam and Jumpponen 2014). They act as beneficial symbionts of a broad range of plants, so they are valuable in plant growth management (Usuki and Narisawa 2007; Upson, Read and Newsham 2009; Newsham 2011). Despite the recent availability of DSE genomes (*Cadophora* sp., *Leptodontidium* sp. *Harpophora oryzae*, *Microdochium bolleyi*, *Periconia macrospinoso...*)(Xu *et al.* 2014; David *et al.* 2016) functional genomics studies involving DSEs are limited. Transcriptomic studies using micro-arrays or RNA-seq technologies have been performed to identify genes involved in the metal tolerance of *Exophiala pisciphila* and *Cadophora finlandica* (Gorfer *et al.* 2009; Zhao *et al.* 2015). The only functional genomics data available from DSEs can be found in two studies that report the functional characterization of a glutathione S-transferase and an Nramp metal transporter in

*E. pisciphila* (Shen *et al.* 2015; Wei *et al.* 2016). Genetic transformation of DSEs represents an alternative and powerful tool to study gene functions in these organisms.



**Figure V-5: Effects of copper and tricyclazole on the pigmentation of the DSE strains.**

The strains were grown on Pachlewski medium amended with increasing concentrations of copper (upper rows) or tricyclazole (lower rows). Pictures were obtained after two weeks of growth. One representative picture out of three independent experiments is given for each strain/treatment combination. (A) Me07, (B) Pr29, (C) Va46, and (D) Pr30. From left to right, the Cu concentrations were: 0- 20-100-200-500  $\mu\text{M}$  and the tricyclazole concentrations were 0-10-20-30-50  $\mu\text{g/ml}$ .

**Table V-2: Relationship between melanin contents and the transformation efficiency of four DSE strains**

| Strains | Transformation efficiency (%) |                             |                              | Melanin content (mg/g)     |                            |                            | Pearson correlation |       |
|---------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------|-------|
|         | Control                       | Copper                      | Tricyclazole                 | Control                    | Copper                     | Tricyclazole               | P.value             | R     |
| Me07    | 25.7 $\pm$ 4.5 <sup>a</sup>   | 9.5 $\pm$ 3.5 <sup>b</sup>  | 13.8 $\pm$ 2.9 <sup>ab</sup> | 0.9 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup> | 1.3 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup> | 0.5 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup> | 0.65                | -0.09 |
| Pr30    | 12.4 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>   | 6.7 $\pm$ 5.1 <sup>a</sup>  | 13.8 $\pm$ 5.5 <sup>a</sup>  | 1.5 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup> | 3.9 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup> | 0.8 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup> | 0.42                | -0.17 |
| Pr29    | 9.0 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>    | 11.0 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup> | 2.8 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>   | 1.4 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup> | 1.7 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup> | 0.9 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup> | 0.55                | 0.13  |
| Va46    | 9.5 $\pm$ 4.5 <sup>a</sup>    | 12.4 $\pm$ 4.0 <sup>a</sup> | 11.4 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>  | 2.8 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup> | 7.6 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup> | 0.5 $\pm$ 0.0 <sup>c</sup> | 0.94                | 0.01  |

Values are means ( $\pm$  SE; n = 5). Within a given strain, different letters indicate significant differences between treatments ( $P < 0.05$ ; Kruskal-Wallis test).

In the present article, we compare ATMT efficiency on a relatively large batch of strains from different DSE species for the first time. We used eight strains belonging to four genera: *Cadophora*, *Leptodontidium*, *Phialophora*, and *Cladosporium*. To our knowledge, this is the first study that compares ATMT efficiency among DSE strains. We evidenced that ATMT efficiency was strain-dependent. We succeeded in transforming several *Cadophora*

and *Leptodontidium* strains. The literature reports the successful transformation of four DSE species (Gorfer *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2011; Liu *et al.* 2016). Gorfer *et al.* (2007) report higher transformation rates (approximately 50% efficiency for *C. finlandica*) than we do. Transformation of *C. cladosporioides* has also been achieved (Zhang *et al.* 2011), but from spore materials, so that no comparison can be made with our study. Our results suggest that two strains (Me07 and CBS 100584) were particularly sensitive to transformation. In both cases, several mutants often emerged from a single mother colony on the selective medium. Only very distinctive mutants (growing from opposite sides of the mother colony) were taken into account. Consequently, ATMT efficiency might have slightly been underestimated with these two strains. ATMT was also successful for six other strains, even if transformation rates were rather low for two strains (DSE 1049 and Va47). Specific optimization would be needed to efficiently perform ATMT with these particular strains. A large number of studies address this issue and reveal that specific parameters could influence ATMT performance. Among these, pH, co-culture duration, temperature, the presence/absence of acetosyringone, the choice of binary vectors and bacterial strains are highly influential (Michielse *et al.* 2005; Meng *et al.* 2007; Wang *et al.* 2013; Xu *et al.* 2014). Based on a literature review of ATMT of Ascomycetes and the growth requirements of the DSE genera we investigated, we selected a few standard conditions that usually gave the best results (use of acetosyringone before and during the co-culture step, pH 5.5 in all fungal media, co-culture at 23°C for 48h). Moreover, in a preliminary study, we compared the two commonly used *A. tumefaciens* strains EHA101 and AGL1. The results prompted us to select EHA101 for a more efficient ATMT (data not shown). Two other important parameters (mycelium age and melanin content) that may modulate ATMT efficiency and have received little attention in the literature were tested in the present study.

Firstly, we hypothesized that the age of the initial fungal material could affect ATMT efficiency. In the literature, only two studies have investigated this topic with non-DSE species (Li *et al.* 2005; Chen *et al.* 2009). Li *et al.* (2005) reported that ATMT efficiency in *Coniothyrium minitans* increased with conidia maturation. Likewise, Chen *et al.* (2009) observed that 25-d-old mycelium produced more transformants of *Antrrodia cinnamomea* than 10-d-old mycelium. These observations are in agreement with part of our results. Indeed, 15-d-old Me07, Pr30 and CBS 101367 mycelium was more efficiently transformed than 2-d-old mycelium. However, Pr29 yielded opposite results. Thick cell walls or cell melanin might prevent T-DNA from entering the host genome (Tsuji *et al.* 2003; Michielse *et al.* 2004; Liu *et al.* 2010). Other mechanisms related to mycelium age (such as enzymatic activity, apoptosis, senescence, or cell wall integrity) could also influence ATMT efficiency for some strains.

Secondly, we also evaluated the influence of mycelial melanin contents on ATMT efficiency. The strains displayed a diversity of colored mycelia due to different melanin contents.

Melanin was isolated from the different mycelia, purified, and quantified by spectrophotometry. To our knowledge, this is the first report comparing the melanin contents of DSE strains from different species and genera. Mycelial melanin contents ranged between 0.8 and 3.7 mg/g of mycelium. Surprisingly, the red DSE strain (Va46) had the highest mycelial melanin content as compared to black and brown fungi. This result could be explained by the elevated concentration of red or yellow melanin, the so-called pheomelanin which absorbs at the same wavelength as brown and black melanins (DHN- or DOPA- melanins) (Gessler *et al.* 2014).

We further studied the relationship between mycelial melanin contents and ATMT efficiency. However, no correlation was found, suggesting that ATMT efficiency was not affected by the degree of melanization of the different strains. To verify this finding, a biochemical approach was used to modulate the melanin contents of four strains, and colonies were tested for ATMT. According to Zhan *et al.* (2011b) and (Wheeler 1983), DHN-melanin, synthesized from 1,3,6,8-tetrahydroxynaphtalene, is admittedly the main form of melanin produced by Ascomycetes. These conclusions prompted us to use tricyclazole as an inhibitor of melanin synthesis. Tricyclazole at non-toxic concentrations is indeed reported to be the strongest systemic fungicide used to specifically block the synthesis of DHN-melanin (Bell and Wheeler 1986). This treatment leads to a change in fungal pigmentation (red/brown) as a result of the accumulation of flaviolin and 2-hydroxyjuglone, two major auto-oxidation products of DHN intermediates (Romero-Martinez *et al.* 2000). In response to tricyclazole, the melanin contents of all strains significantly decreased. As far as DSEs are concerned, a similar finding was first reported with *E. pisciphila*, but no quantification was performed and the result was solely based on visual observations (Zhan *et al.* 2011). Concerning the Cu treatment, it promoted melanin synthesis. This Cu-mediated increase of cell wall pigmentation was previously observed in several fungi such as *Suillus* sp., *Cladosporium resinae*, *Aureobasidium pullulans*, and *Gaeumannomyces graminis* (Gadd and Griffiths 1980; Fogarty and Tobin 1996). Copper is known to induce laccases and other enzymes involved in the melanin biosynthesis pathway that could promote hyphal melanization (Eisenman and Casadevall 2012). Neither of these two parameters (copper and tricyclazole) had a significant effect on ATMT efficiency. Melanin is composed of individual phenolic components connected together by randomly formed bonds. Melanin can increase resistance against various environmental stresses such as oxidant conditions (ROS), drought, UV and pathogen attacks (Bloomfield and Alexander 1967). However, our data show that the T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to hyphae was not affected by mycelial melanin content. Therefore our results do not support the previous hypothesis of (Liu *et al.* 2010). However, melanin synthesis might not be totally inhibited in tricyclazole-treated mycelium. Other forms of melanin might still have been present in hyphae, although in minor quantities. The quantification method did not allow us to discriminate between the different forms of melanin. Therefore, we also used sulcotrione and kojic acid to specifically inhibit pyomelanin and DOPA-melanin, respectively. Under these conditions, except Va46 strain pigmentation was not affected (unpublished results), confirming that DHN-melanin is

the major form of melanin in the species we studied. Some of the red-brown pigmented intermediates found under tricyclazole treatment may have induced in the measure of absorbance. However, more experiments are needed to definitively ascertain that melanin does not impede ATMT of fungi.

## Conclusion

This article reports the first comparison of ATMT efficiency in DSEs, based on eight strains belonging to different DSE species. ATMT efficiency was not affected by mycelial melanin contents but was strain-dependent. Within a same species, strain response could vary from total recalcitrance to high susceptibility to ATMT. Ideally, and in the perspectives of functional post-genomics studies, future sequencing programs of fungal genomes should preferentially select ATMT-susceptible strains to be sequenced. Older mycelium from three strains was significantly more susceptible to *A. tumefaciens* transformation than young mycelium. This point deserves further experiments to investigate the mechanisms that favor age-dependent ATMT efficiency. Based on the present findings, we established an efficient ATMT system for DSEs and we selected Me07 as a model for future functional genomic studies. To this purpose, we are currently generating a mutant library that will be further screened for different traits of interest.

## 2. Phenotypic and molecular analyses of Zn-sensitive T-DNA insertional mutants, with a focus on the role of LpMNR2 on Zn tolerance

### Abstract

Despite numerous studies on the distribution of dark septate endophytes (DSEs) in trace element- (TE-) polluted soils and their role in the growth promotion/fitness of their host plants, little is known on the tolerance mechanisms to TE of DSE fungi. In this study, we transformed the Zn-tolerant *Leptodontidium* sp. strain Me07 using *Agrobacterium tumefaciens* and generated a library of 1,300 T-DNA insertional mutants. The transformants were screened for Zn sensitivity. This strategy allowed the isolation of 18 Zn-sensitive mutants. The analysis of their ionome under control and Zn stress conditions revealed different patterns in the accumulation of Ca, Mg, and TE. Particularly, the highly Zn-sensitive mutant T1 accumulated high contents of divalent cations. Thus, this mutant was studied in more details. The sequence of the T-DNA flanking region from this mutant was obtained by TAIL-PCR. The sequence analysis revealed that the T-DNA was inserted in a gene encoding a putative Mg transporter belonging to the CorA-like family. A phylogenetic analysis clustered the LpMNR2 encoded protein within the MNR2 sub-family encompassing tonoplasmic transporters ensuring Mg redistribution from the vacuolar storage compartment to the cytosol. LpMNR2::GFP fusion protein was expressed in yeast and the GFP-derived fluorescence was recorded on the vacuolar membrane. In addition to Zn, T1 mutant was also sensitive to Ni and Co. Moreover, when expressed in yeast, LpMNR2 rescued the TE-sensitive phenotypes of the *mnr2* mutant. In the absence of a functional *MNR2* gene, *Leptodontidium* sp. accumulated high levels of Mg, Zn and other TE. Taken together, these data suggest that the mutation in *LpMNR2* was responsible for the TE-sensitive phenotype and that the absence of Mg redistribution from the vacuole to the cytosol could induce a higher expression of the non-specific Mg-uptake system at the plasmalemma. This subsequently induced the uncontrolled import of toxic TE by *Leptodontidium* sp. hyphae.

### 2.1. Introduction

Dark septate endophytes (DSEs) are conidial or sterile ascomycetes characterized by brown to blackish mycelium (Jumpponen and Trappe 1998a). They belong to a wide range of taxa, with numerous members found in the Helotiales. DSEs are ubiquitous root symbionts of a large variety of plants including trees and herbaceous plants (Mandyam and Jumpponen 2005) and are present in various ecosystems including trace element (TE)-polluted and stress environments. DSE fungi may be beneficial for their host plants by facilitating P, N, and C uptake, by releasing metabolites (*e.g.* gibberellins, auxinic compounds) and by protecting plants against biotic (pathogens) and abiotic stresses (TE, salinity, drought) (Mandyam and Jumpponen 2005; Bois *et al.* 2006; Andrade-Linares *et al.* 2011; Likar and Regvar 2013).

More particularly, DSEs could promote plant growth in TE-enriched soils. They could limit metal toxicity to their host by limiting root-to-shoot TE translocation and by increasing the chlorophyll content and the transpiration rate (Li *et al.* 2011; Likar and Regvar 2013). Nevertheless, this protective effect is variable and partly depends on interspecific and intraspecific variation in metal tolerance among DSE strains. TE, such as Zn, can be essential micronutrients, but their ions become toxic when present in excess. Zn is one of the major metal contaminants in European sites.

Excessive concentration of TE are known to induce oxidative stress by generating high concentrations of reactive oxygen species (ROS) in cells, and affect the activity of endogenous enzymes, or membrane polyunsaturated fatty acids, which leads to lipid peroxidation. In fungi, the first step in defense systems commonly involves extracellular chelating or binding of TEs to cell wall constituents to prevent TE influx. A series of intracellular processes, such as complexation and peptide binding, transport systems or compartmentalization processes are also involved in TE detoxification. In addition, for several fungi, such as *Saccharomyces cerevisiae*, positive modulation of the DNA repair pathway would restore TE-induced injuries (Ruotolo *et al.* 2008; Serero *et al.* 2008). However, these mechanisms have been poorly investigated in DSE. Up to now, research on this topic focused only on the response of two species (*Exophiala pisciphila* and *Cadophora finlandica*) to a single TE (Cd) (Gorfer *et al.* 2009; Zhan *et al.* 2014; Zhao *et al.* 2015).

In other fungi, there is growing evidence that the fine-tuning of TE in fungal cells mainly relies on the activity of transporters, involved either in TE import into the cytosol, or in TE efflux out the cell or into cellular compartments (Bellion *et al.* 2006; Gube 2016). Moreover, modification of efflux pumps, suppression or absence of uptake systems, highly specific influx systems or increased expression of metal efflux transporters have been demonstrated as determinants of metal tolerance in a range of organisms including fungi. For instance, sequestration of Zn into the endoplasmic reticulum or into vacuole via CDF transporters has been shown to confer Zn tolerance to various fungi (Khouja *et al.* 2014; Blaudez and Chalot, 2011). In DSE, the sole information on this topic derives from the investigation of the role of a metal transporter belonging to the Nramp family on Cd tolerance in *Exophiala pisciphila* (Wei *et al.* 2016). Insight into the different mechanisms underlying metal homeostasis in DSE will contribute to our global understanding of metal homeostasis and tolerance.

The sequencing of the genomes of *Cadophora* sp., *Leptodontidium* sp., *Microdochium bolleyi*, *Periconia macrospinoso*, and *Harpophora oryzae* (Xu *et al.* 2014; David *et al.* 2016) was completed recently. However, DSE genes/proteins have not been functionally characterized yet. Therefore developing molecular genetic tools to investigate the biological function of genes of interest in DSEs is of major significance. The generation and characterization of knock-out mutants represent a powerful strategy for deciphering the

roles of these genes/proteins (Herrera-estrella *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2013). Among the techniques used for fungal transformation, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) is considered as the most performing one (Mullins and Kang, 2001). A number of random mutant libraries were performed by this method on organisms such as yeasts, pathogenic, mycorrhizal, endophytic and biocontrol fungi. However, up to now no random mutant library was performed with DSE.

We recently isolated several *Leptodontidium* sp. strains from the roots of poplar, growing in Zn-contaminated sites in France. The strain Me07 presents plant growth promoting abilities and is particularly tolerant to Zn (Berthelot *et al.* 2016). This strain was highly receptive to ATMT transformation (Berthelot *et al. submitted b*) (Chapter V-1). Hence, this strain represents a good model to investigate the molecular mechanisms involved in Zn tolerance through a wide-screen genomic approach. In the present work, we therefore generated a random mutant library of *Leptodontidium* sp. Me07 that was screened for Zn-sensitive mutants. The selected mutants were further investigated for their ionome and their ability to tolerate different TE. Moreover, we performed a focus on the high Zn-sensitive mutant #T1, and the functional characterization of the *LpMNR2* gene that is knocked-out in this mutant strain.

## **2.2. Materials and methods**

### **2.2.1. Strains, plasmid, and growth media**

The dark septate endophyte *Leptodontidium* sp. (Me07 strain) was used in the present study. This strain was isolated from a TE-polluted soil and was previously characterized (Berthelot *et al.* 2016).

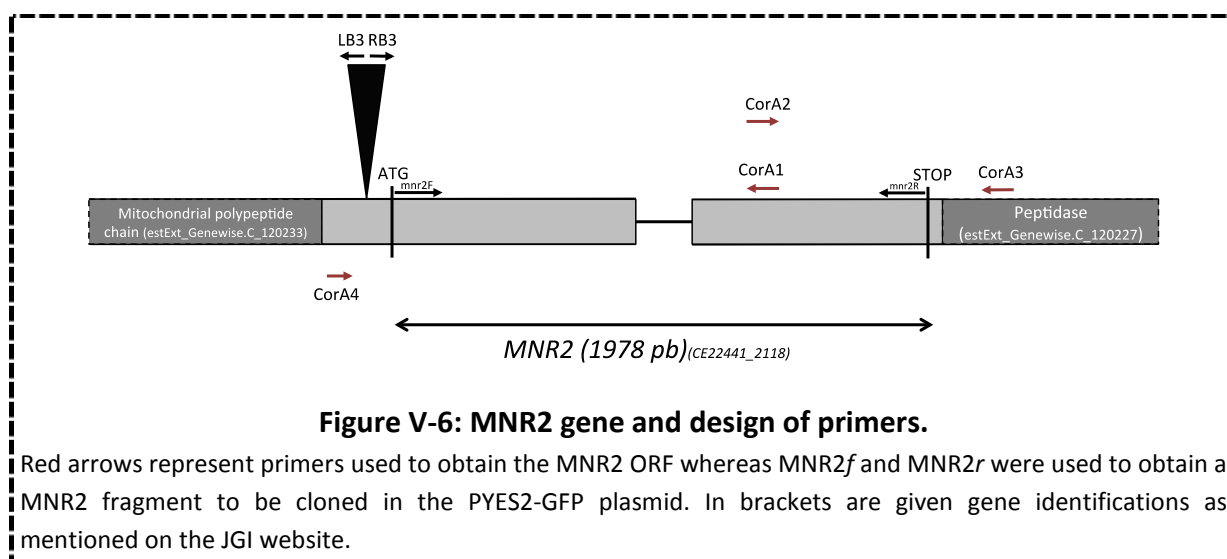
The *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA101 was used for fungal transformation. It harbours the pFAT-gfp binary vector that carries (i) the bacterial hygromycin B phosphotransferase (*hph*) ORF under the transcriptional control of the *Aspergillus nidulans* *tpc* promoter and (ii) the green fluorescent protein (*gfp*) ORF under the control of the *Aspergillus nidulans* glyceraldehyde-3-phosphate promoter (Fitzgerald *et al.* 2003). The bacteria were grown at 28°C on Luria-Bertani (LB) agar medium supplemented with 100 µg/ml spectinomycin.

The *Saccharomyces cerevisiae* strain used for heterologous expression of *LpMNR2* was  $\Delta mnr2$  (MATa *ura3*  $\Delta 0$  *leu2*  $\Delta 0$  *his3*  $\Delta 1$  *met15*  $\Delta 0$  YKL064w::kanMX4). This yeast mutant derived from the parental strain BY4741 and was obtained from Euroscarf (<http://www.euroscarf.de>).

### **2.2.2. Transformation of yeast, complementation by *LpMNR2***

Yeast transformation was performed using standard methods (Gietz *et al.* 1992). The ORF sequence of *LpMNR2* was determined from *Leptodontidium* sp. Me07 gDNA. For this purpose, we designed five primers (Table V-3). Amplification of CorA4-CorA1 and CorA2-CorA3 regions was then analyzed and assembled to obtain the full length DNA sequence

of the *LpMNR2* ORF. The *LpMNR2* gene was then synthesized by Eurofins and expressed in the yeast mutant  $\Delta mnr2$ . The sequence was cloned into the *Bam*HI-*Hind*III-digested pYES2 plasmid (Invitrogen, Paisley, UK). A similar procedure was used for *LpMNR2::GFP* but in this case, the full coding sequence of *LpMNR2* was amplified from the Me07 genomic DNA using the primers MNR2f and MNR2r and cloned into the *Bam*HI-*Hind*III-digested pYES2-GFP plasmid (Blaudez *et al.* 2003) (**Figure V-6**). Controls were obtained by transformation of  $\Delta mnr2$  and BY4741 yeast strains with the empty vectors pYES2 and pYES2-GFP.



**Table V-3: Primers used in this study.**

| Primers | Sequences (5' → 3')                 |
|---------|-------------------------------------|
| AD1     | NGTCGASWGANAWGAA                    |
| AD2     | TGWGNAGSANCASAGA                    |
| AD3     | AGWGNAGWANCAWAGG                    |
| LB1     | TGTCAGGGTCAGGACGGTCGGTGGTCGTCT      |
| LB2     | AAAAGTCAGCTCCGGCACCTTATCCTTG        |
| LB3     | GTCGACATCAACAATGTCCGACACACCACT      |
| CorA1   | GACTGGAAGAGCTCAATCTTCTC             |
| CorA2   | GGATGGTGTGGTGGTTGAACAT              |
| CorA3   | AAGAAGAGTAAGAGGAAGTATAG             |
| CorA4   | CGGGATTCAATCACTACTCGGTTT            |
| MNR2R   | cccGGATCCccGATGTTATCTCATCTTCCTCGCAA |
| MNR2F   | cccAAGCTTATGTCTGACCAAGAGAGCAACA     |
| hphR    | CTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGT            |
| hphF    | ATGCCTGAACTACCGCGACGTCTGT           |
| gfpR    | TCACTTGTACAGCTCGTCCATG              |
| gfpF    | ATGAGCAAGGGCGAGGAAGTGTTC            |
| SpectF  | ATGAGGGAAGCGGTGATCGCCGAA            |

### 2.2.3. *Agrotransformation of Leptodontidium sp.*

*Leptodontidium* sp. Me07 strain was transformed by *A. tumefaciens* following a modified version of that described by Pardo *et al.* (2002). Electro-competent cells of *A. tumefaciens* strain EHA101 were transformed with the pFAT-gfp vector, using a Cell-Porator apparatus (Invitrogen). The transformants were selected on LB medium containing 100 µg/ml spectinomycin. *Agrobacterium tumefaciens* was grown overnight at 150 rpm in LB medium containing 100 µg/ml spectinomycin. Cells were subsequently diluted to an OD<sub>600</sub> of 0.2 in LB induction medium (IM) containing 200 µM acetosyringone and 100 µg/ml spectinomycin, and further incubated until an OD<sub>600</sub> of 0.6 was reached.

The fungal strain was grown from 1 mm agar plugs (20 plugs/Petri dish) on cellophane membranes on Pachlewski medium for 3 days (Pachlewski and Pachlewska 1974). The coculture between fungal colonies and *A. tumefaciens* was operated as described by Bellion *et al.* (2006). Resistant colonies were individually harvested and isolated for vegetative propagation on MEA medium containing 250 µg/ml hygromycin B.

The mitotic stability of the transformants was determined by analyzing the stability of hygromycin B resistance. Twenty randomly selected transformants were sub-cultured every three weeks alternatively between Pachlewski plates without and with hygromycin B. Transformants were classified as stable when they remained resistant to hygromycin B after seven sub-cultures.

### 2.2.4. *Molecular analysis of the Leptodontidium transformants*

Fungal genomic DNA was extracted using the DNeasy plant mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocol. To confirm the positive transformants for T-DNA insertions in the host genome, twenty transformants were randomly selected to amplify two inserted sequences. The *HPH* and *GFP* genes were amplified with the primers hphF and hphR, and gfpF and gfpR, respectively (**Table V-3**). PCR amplification was performed using the Phire Hot Start II DNA polymerase (Fischer Scientific, Illkirch, France) and with the following program: Initial denaturation at 98°C for 30s, 40 cycles of 98°C for 5s, 63°C for 5s, and 72°C for 10s, and a final extension at 72°C for 1 min. To validate the absence of contaminating *A. tumefaciens* cells within the resistant fungal colonies, a PCR was also performed with the primers SpecF and SpecR that are specific to the spectinomycin resistance gene located on the pFAT-gfp plasmid but outside of the T-DNA region (**Table V-3**). PCR conditions were the same as described above except that the annealing temperature was set to 51°C. A negative control was obtained from the wild-type fungal strain whereas *A. tumefaciens* was used as a positive control. PCR products were analyzed by electrophoresis on 1% (w/v) agarose gels.

To amplify the genomic DNA fragment flanking the insertional junction of T-DNA, TAIL-PCR was carried out with the genomic DNA of the mutants acting as templates. The

degenerated primers used for TAIL-PCR were: AD1, AD2, and AD3. LB1, LB2 and LB3 were used as specific primers of the T-DNA (**Table V-3**). The TAIL-PCR program and the reaction mix were described previously by Wu *et al.* (2015). The PCR products from the secondary and tertiary reactions were analyzed by electrophoresis on 1% (w/v) agarose gels. All DNA fragments from the tertiary PCR reaction showing a decrease in length consistent with the primer positions on the T-DNA were assumed to be T-DNA flanking regions. PCR products were cloned into the PGEM®-T plasmid (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) following the manufacturer's protocol and were further sequenced. Resulting sequences were used as queries to search in the Joint Genome Institute (JGI) (<http://genome.jgi.doe.gov/Leptod1/Leptod1.home.html>) and in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) databases with the blastx and blastn algorithms (Altschul *et al.* 1990). Open reading frame (ORF) was deduced from the DNA sequence to the corresponding mRNA sequence of different fungi using ExPASy translate tool ([http://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna\\_aa](http://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna_aa)). The theoretical isoelectric point (pI) and the molecular mass of the predicted amino acid sequence were determined using the Compute pI/Mw tool from the ExPASy (Expert Protein Analysis System) database ([http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)). Transmembrane domains in the protein sequence were predicted using TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>).

Complete sequences of known genes or conserved regions of these gene sequences were used to search for homologous genes in the *Leptodontidium* sp. PMI\_412 genome. The blast option was used with previously described protein sequences to search for homologous genes. The standard BLOSUM 62 scoring matrix was used for protein sequences. Sequences were aligned using Clustal X in MEGA6. The UPGMA tree was also drawn using MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013). Bootstrap analysis was performed with 1000 replications.

### **2.2.5. Metal sensitivity of *Leptodontidium* sp. transformants and yeast**

The sensitivity of mutant strains to Zn was evaluated by investigating the minimum inhibitory concentration (MIC) of Zn on fungal growth. Pachlewski medium was selected as growth medium to have maximal metal availability and to avoid metal precipitation. In a first experiment, plugs (4 mm) were cut from the edge of actively growing two-week-old colonies and placed on solid medium amended with ZnCl<sub>2</sub> at the following concentrations: 0, 4, 6 and 10 mM. Growth was observed after two weeks of incubation at 24°C. The Zn-sensitivity of the mutants was further confirmed in a second experiment with a more narrow range of Zn concentrations (0-1-2-3-3.5-4-5 and 6 mM). Particularly, the sensitivity of the transformant T1 towards Co, Mn, and Ni was also evaluated and compared to that of the wild-type. All metals were amended as chloride forms in Pachlewski medium at pH 5.5 at the following concentrations: 0-1.5 mM for Co and Ni, and 0-10 mM for Mn.

Synthetic yeast medium with galactose and without uracil was used for metal tolerance assay of yeasts. *Δmnr2* and BY4741 were grown on liquid medium until  $OD_{595} = 0.9$ . These cultures were subsequently used to inoculate SD control plates with or without following metals: 500 mM of  $CaCl_2$ , 8 mM of  $MnCl_2$ , 1.5 mM of  $CoCl_2$ , 450 mM of  $MgCl_2$ , 1.5 mM of  $NiCl_2$  and 3.5 mM of  $ZnCl_2$ .

#### **2.2.6. Elemental contents in *Leptodontidium* mutants**

The *Leptodontidium* wild-type strain and 14 Zn-sensitive mutants were analysed for their content in major and trace elements. The strains were grown for three weeks on cellophane covered Pachlewski medium or on the same medium amended with 1 mM  $ZnCl_2$ . Additionally, the transformant T1 and the wild-type strain were also grown in the presence of 0.25, 0.5 and 0.75 mM  $ZnCl_2$ . Mycelia were harvested, dried at 60°C for two days, weighed, and finally ground in powder.

To measure the concentrations of trace elements in fungal colonies, powder (100 mg) was digested by  $HNO_3$  in a MARS 5 microwave oven (CEM®, Saclay, France) with the following program: 15 min at 170°C and 20 bars followed by 30 min cooling. The solutions were analyzed by ICP-AES (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy). Two tobacco (INCT OBTL5, ichtj, Warlow, Poland) and ryegrass (CD281 O204, ERM, Geel, Belgium) standard references were submitted to the same digestion procedure and analyzed as part of the quality control of the protocol.

#### **2.2.7. Microscopy**

Yeast vacuolar membranes were selectively stained with the red fluorescent probe FM4-64 (Molecular Probes™, Leiden, The Netherlands). Cells were incubated with FM4-64 for 30 min at 30°C, and further incubated 1 h before observation by fluorescence microscopy. The GFP fluorescence of yeast cells was visualized by fluorescence microscopy. For final processing, digital images were pseudo-colored using Image J (v1.43u), with red attributed to FM<sup>®</sup>4-64 and green attributed to GFP, to correspond to real red and green colors. An image with transmitted light also was collected when needed using the fluorescence microscope.

#### **2.2.8. Statistical analyses**

Statistical analyses were performed with R 3.1.3 (R Core Team 2013) software. Normality of the data was tested using a Shapiro-Wilk test. Data were then analyzed by one-way ANOVA or by a one-way non-parametric Kruskal-Wallis test (alpha level of 0.05). All values reported are means  $\pm$  standard errors (SE). Percentage values were *arcsin* transformed before statistical analyses. Hierarchical clustering within TE-accumulation data of Zn-sensitive mutants was performed with the Ward method (Szekely and Rizzo 2005).

## 2.3. Results and discussion

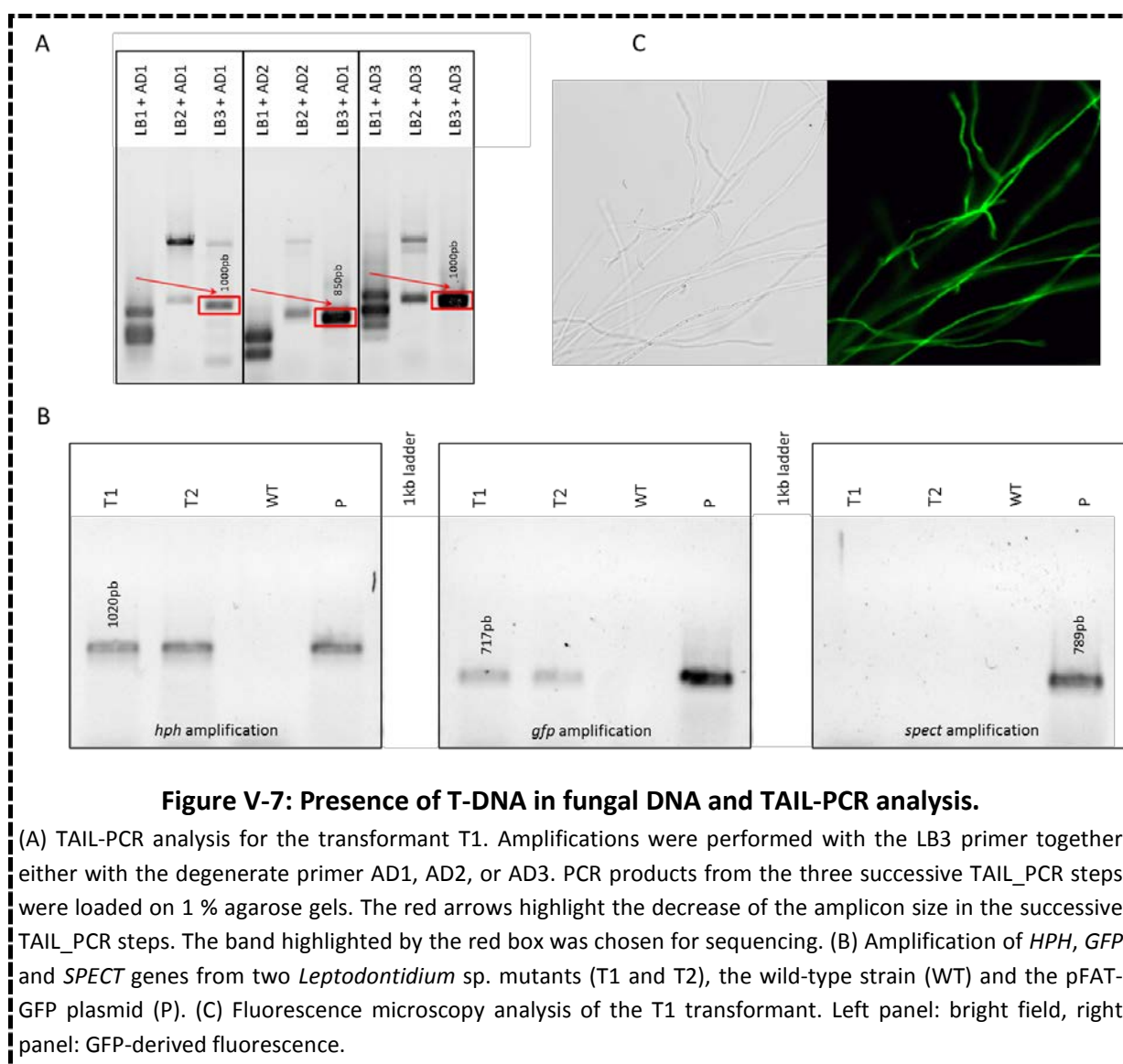
### 2.3.1. *Agrotransformation of Leptodontidium sp. and generation of a T-DNA insertional mutant library*

An ATMT library for *Leptodontidium* sp. strain Me07 was established and 1,300 transformants were obtained. To establish the mitotic stability of ATMT, twenty randomly selected transformants were grown for seven consecutive cultures with or without hygromycin B. All the mutants were resistant to hygromycin B, confirming the stable maintenance of the *HPH* marker gene across the successive generations. The stability of the transformants was also confirmed by checking for the presence of the *HPH* and *GFP* genes by PCR. The expected 1,020 bp (*HPH*) and 717 bp (*GFP*) fragments were detected in all transformants, but not in the wild-type strain (**Figure V-7**). Conversely, there was no amplification of the spectinomycin resistance gene. These results therefore confirm that the T-DNA are integrated into the genome of *Leptodontidium* and also rule out any remaining bacterial contamination in the mycelium of the mutants. These observations confirm previous data suggesting that ATMT is a powerful protocol to high production of stable genetic mutants. Among the 1,300 mutants, we noticed phenotypically altered mycelia with low hyphal density, or colonies with swollen or fluffy textures. Notably, ten albino mutants (1.3%) and fourteen (1.8%) other mutants with a light pigmentation phenotype were obtained. Generally the growth rate of the mutants was similar to that of the wild-type, whereas about 1.8% had a slower growth (data not shown). A variety of morphological phenotypes are usually noticed in ATMT-derived mutant libraries with fungi. The screening of an ATMT-derived mutants library from *Monascus ruber* involved changes in the pigmentation of 0.078% of the mutants whereas 0.039% presented an altered phenotype (Shao *et al.* 2009). Likewise, 10% of *Beauveria bassiana* mutants presented fluffy or low hyphal density mycelia compared to the wild-type strain (Leclerque *et al.* 2004). *Cadophora finlandica*, *Phialocephala fortinii*, *Harpophora oryzae* and *Cladosporium* sp. were previously successfully transformed (Gorfer *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2011; Liu *et al.* 2016). But, to our knowledge, we present here the first library of T-DNA insertionnal mutants for a DSE species.

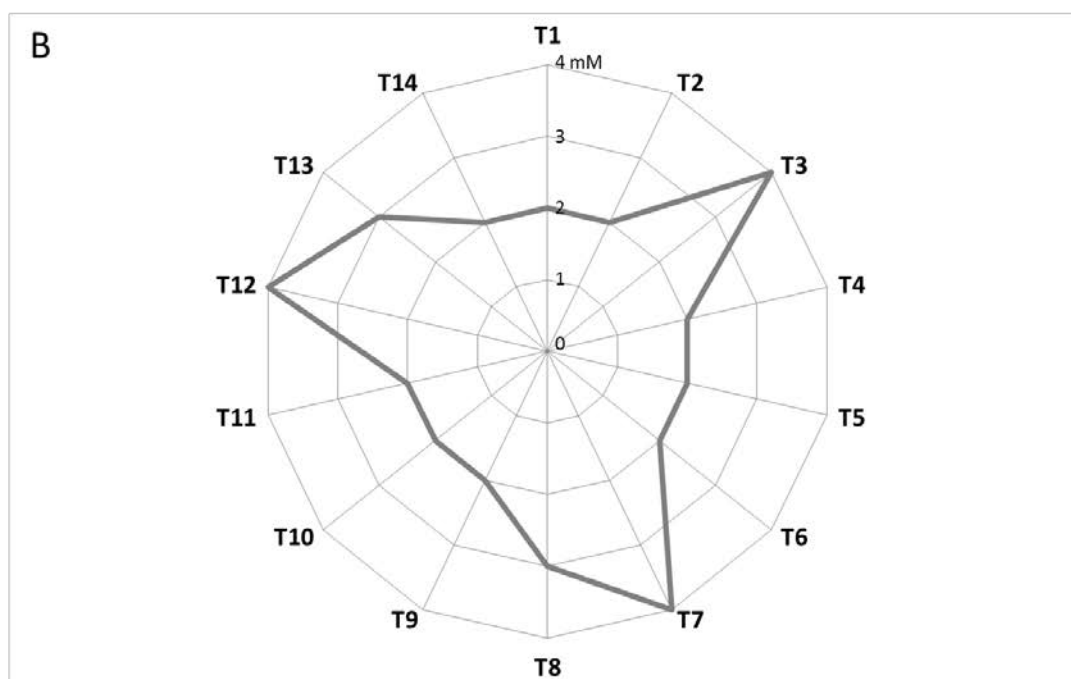
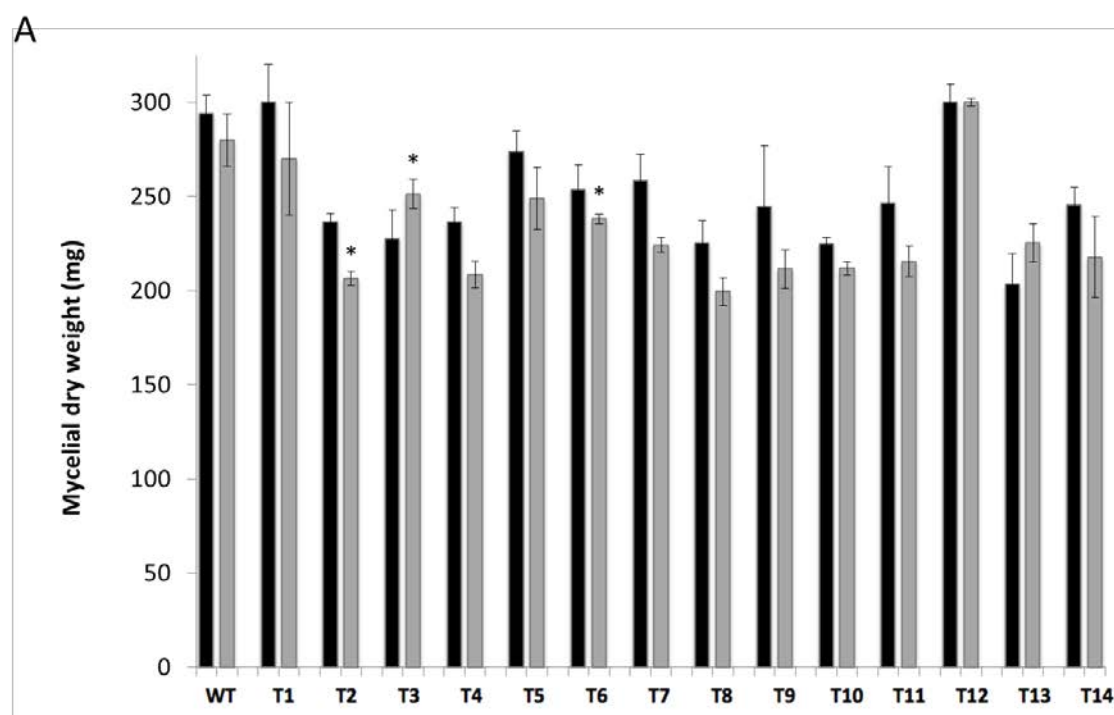
### 2.3.2. *Searching for Zn-sensitive mutants*

Our main aim was the identification of genes involved in Zn tolerance in the metal-tolerant DSE fungus, *Leptodontidium* sp. Me07. To achieve this goal, all mutants were screened in a first step for their sensitivity towards Zn. The mutants were first tested on 4 and 6 mM Zn, concentrations corresponding to the  $EC_{50}$  and  $EC_{75}$  of Me07 for this metal, respectively. From this analysis, 36 mutants presented an altered growth on 4 and/or 6 mM Zn. A second screening, which consisted in exposing the 36 mutants on increasing Zn concentrations, revealed that 18 mutants (1.4% of the total) were confirmed as Zn-sensitive. These mutants presented growth inhibition between 2 and 4 mM Zn (**Figure V-8**) whereas

the wild-type control was inhibited by 7 mM Zn. This result is in line with previous studies that screened large collections of random mutants for TE toxicity or homeostasis in different fungi. Pagani *et al.* (2007) evaluated the cellular functions required to survive and proliferate under a surplus of Zn, and screened a library of 4,825 *S. cerevisiae* haploid deletion mutants on high Zn. They found that 1.8% of the mutants (89 out of 4,825) had an increased sensitivity to high Zn. Khouja (2011) examined the fitness of a collection of *Oidiodendron maius* deletion mutants exposed to Zn. In this study, 20 mutants (6.4%) out of 309 mutants were Zn-sensitive.



DSE are usually characterized by a dark mycelium due to the presence of a high content of melanin. It was previously suggested by several authors that melanin could be responsible for the high level of TE tolerance in DSE. However, in the present study, the albino mutants were not Zn sensitive suggesting that the high melanin content in *Leptodontidium* is not a major tolerance mechanism to high Zn. A focus on the role of melanin on Zn tolerance in different DSE, as well as on albino mutants of *Leptodontidium* is specifically developed in the (Chapter V-3)

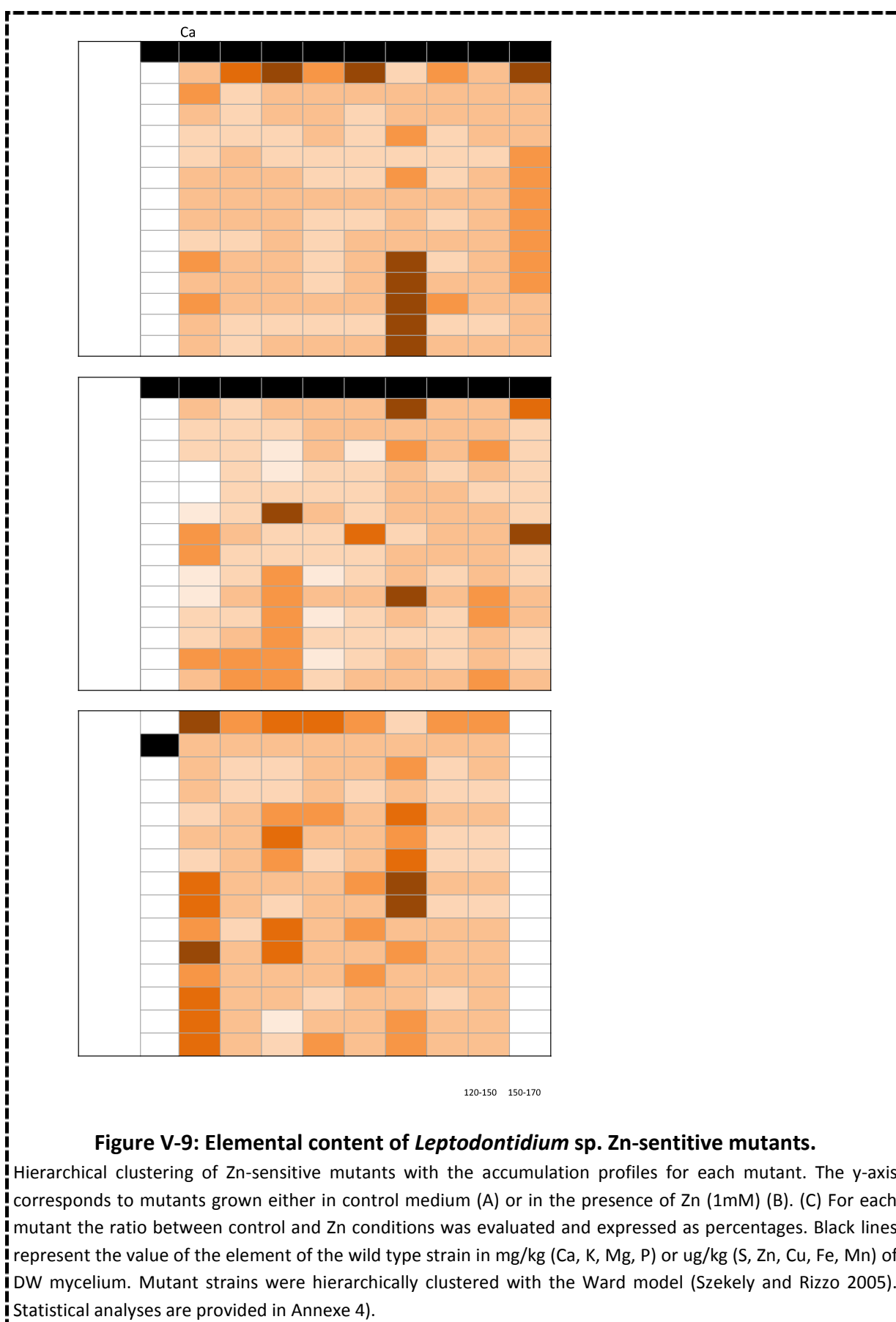


**Figure V-8: Growth and tolerance level of the Zn-sensitive mutants.**

(A) Colony dry weight of Zn-sensitive mutants of *Leptodontidium* sp. Me07 grown on solid Pachlewski medium amended (grey bars) or not (black bars) with 1 mM  $\text{ZnCl}_2$ . Asterisks represent significant differences between the two treatments ( $P < 0.05$ , Kruskal-Wallis). (B) MIC values for Zn of the different mutants.

In a second step, the ability of 14 Zn-sensitive mutants to accumulate trace and essential elements was evaluated on agar medium amended with or without 1 mM ZnCl<sub>2</sub>. Results are depicted in the **Figure V-9**. A clustering analysis showed that three clusters were obtained. In the absence of Zn addition (**Figure V-9 A**) the transformant T1 had a specific pattern. A cluster comprised eight strains characterized by a low variability of accumulation compare to the wild-type whereas a second cluster encompassed five strains that were characterized by higher contents of Mn when compared to the wild-type. In the presence of 1 mM Zn, three clusters were also evidenced. The first and second clusters comprised respectively two (T13 & T15) and five (T7, T6, T12, T9, and T1) transformants that approximately accumulated most TE at similar levels than the wild-type, except for T13 and T1 which accumulated more Zn and Mn, and Mg, Ca, and Zn, respectively. Conversely, the third cluster, which encompassed seven transformants, was characterized by a high Fe accumulation phenotype. However, whatever the transformant, the alteration in TE accumulation did not negatively change the growth of the fungal colonies at 1 mM Zn. These variations of TE accumulation suggest that several mutated genes were involved in TE homeostasis of cells such as efflux/influx metal transporters or genes encoding enzymes involved in the synthesis of siderophores or chelating compounds.

To reveal the nature of the mutated genes, thermal asymmetric interlaced- (TAIL-) PCR were performed. Out of the fourteen transformants, only two T-DNA flanking regions were successfully amplified by TAIL-PCR with the AD3-LB3 primer set, whereas no amplification could be obtained with the other primer combinations. The lack of amplification for the flanking regions with the right border primers (RB1, RB2, and RB3) was previously reported and could be explained by the lower conservation of the right border sequence of the T-DNA during its genomic integration, when compared to that of the left border (Combier *et al.* 2003). However, two positive PCR fragments were obtained for T1 (**Figure V-7**) and T15 (data not shown). Both sequences contained part of the T-DNA including the LB border as well as flanking regions. Unfortunately, The T-DNA flanking region of T15 was only 12 pb in length and was too short to identify the integration site of the T-DNA. Even if TAIL-PCR remains one of best strategy to identify T-DNA flanking regions, its success rate remains very variable. The major difficulties in obtaining positive results from TAIL-PCR studies were reported as (i) no amplification, (ii) no homologies with sequence databases, (iii) too short amplification (Wu *et al.* 2015). To cope with unsuccessful amplifications, developing alternative strategies by using high-throughput technologies could be an issue. For instance, van Opijnen *et al.* (2009) and Boyle *et al.* (2013) developed time and cost efficient technics based on the new next-generation sequencing technologies. However, the second positive amplification (T1) produced a 462 pb long amplicon with the AD3-LB3 primer set. The identification of the T-DNA integration site in the *Leptodontidium* genome, as well as the functional characterization of the T1 mutant is detailed in the following paragraphs.

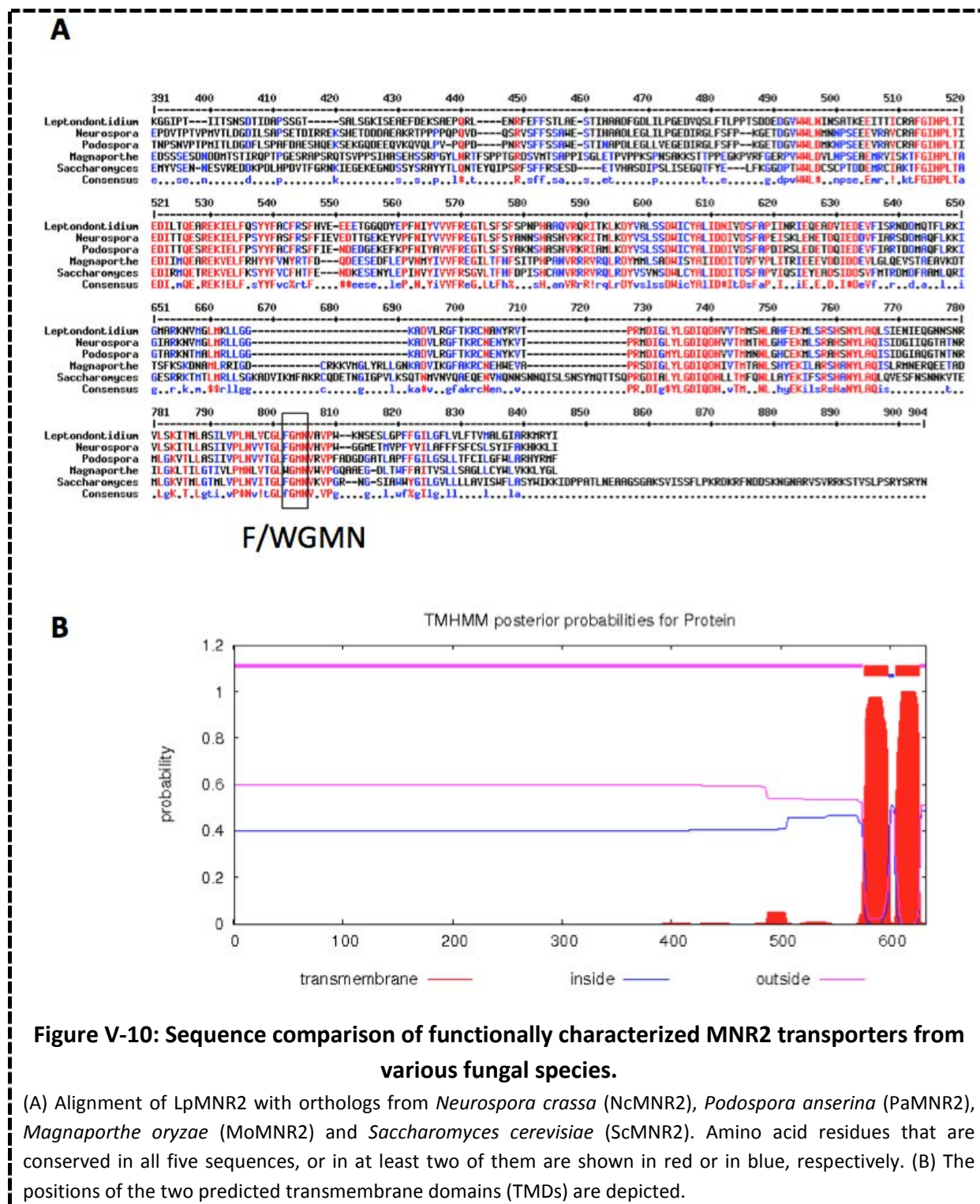


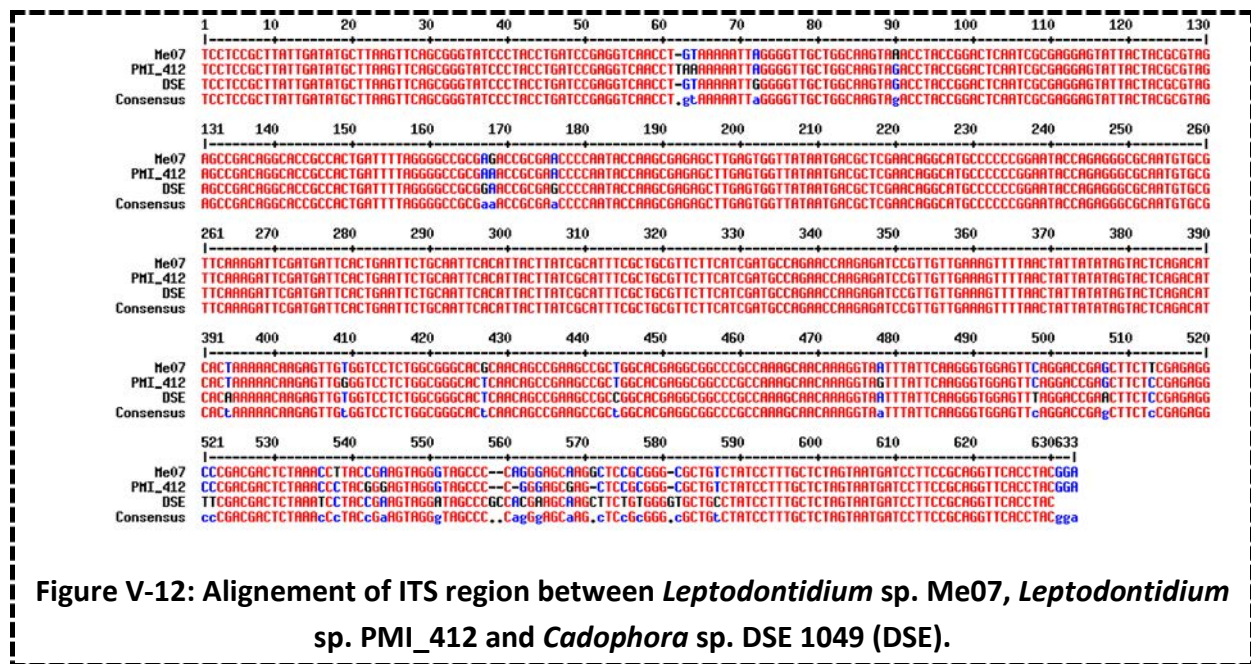
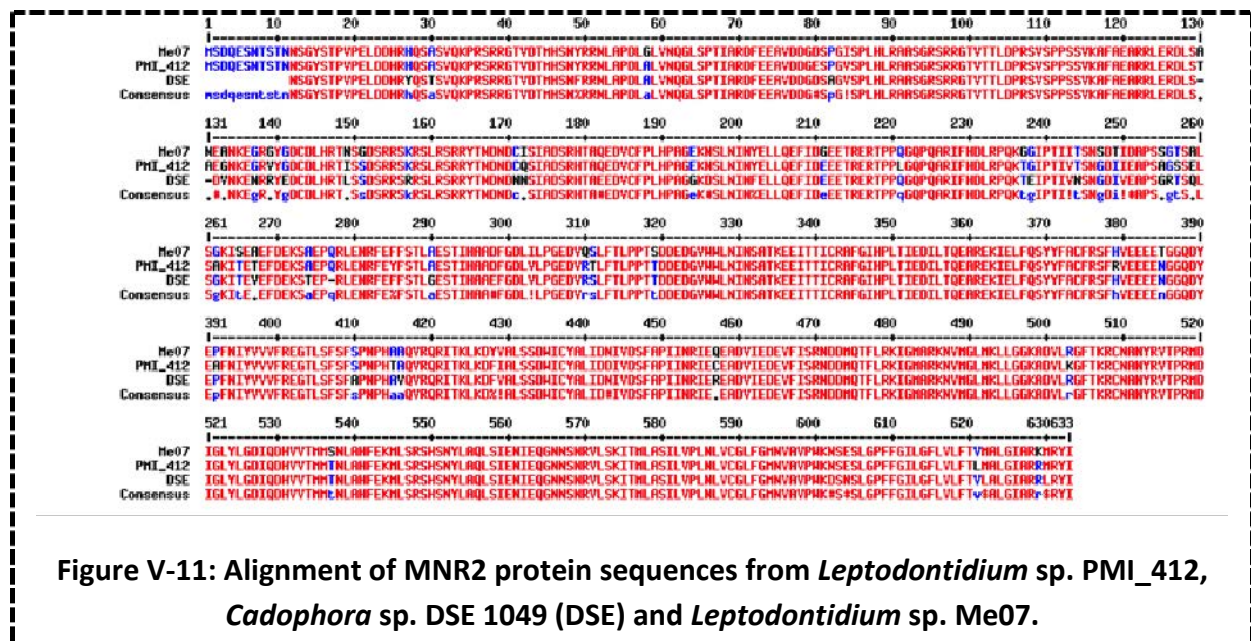
### 2.3.3. Identification of the *mnr2* mutation and sequence analyses of LpMNR2

The analysis of the sequence of the T-DNA flanking region from T1 revealed that the T-DNA was inserted in a gene encoding a Mg transporter belonging to the CorA-like family. The corresponding encoded protein shared a close phylogenetic relationship with previously functionally characterized MNR2 proteins from Ascomycetes. Particularly, it shared 56.6% identity with *NcMNR2* (NCU11312T0) from *Neurospora crassa*, 54.6% with *PaMNR2* (10106) from *Podospira anserina*, 49.4% with *MoMNR2* (351649506) from *Magnaporthe oryzae*, and 44.8% with *ScMNR2* (160986) from *Saccharomyces cerevisiae* (**Figure V-10 A**). Subsequently, we named the *Leptodontidium* sp. ortholog LpMNR2. Notably, the sequence similarity among the CorA-like orthologs is highest in the C-terminal part and lower in the N-terminal soluble region, as frequently reported for other organisms (Payandeh and Pai 2006; Niegowski and Eshaghi 2007).

*LpMNR2* comprises a single intron and encodes a protein of 633 amino acids with a predicted molecular weight of 70.9 kDa and an isoelectric point of 5.4. As revealed through the TMHMM analysis, LpMNR2 has two predicted transmembrane domains (577-591; in-out) and (609-624; out-in), with the N-terminus facing the cytosol (**Figure V-10 B**). This protein possesses a conserved Y/FGMN motif characteristic of Mg-transporting members of the MIT superfamily which comprises the CorA family (Knoop *et al.* 2005). This conserved motif is identical to that of *N. crassa*, *S. cerevisiae*, and *P. anserina* whereas that of *M. oryzae* contained a tryptophan residue instead of a phenylalanine (**Figure V-10 A**). This motif is believed to be essential for the protein function and mutations in the GMN motif are known to abolish Mg transport whereas residues at both the N-terminus and the C-terminus are not essential for the function (Lee and Gardner 2006).

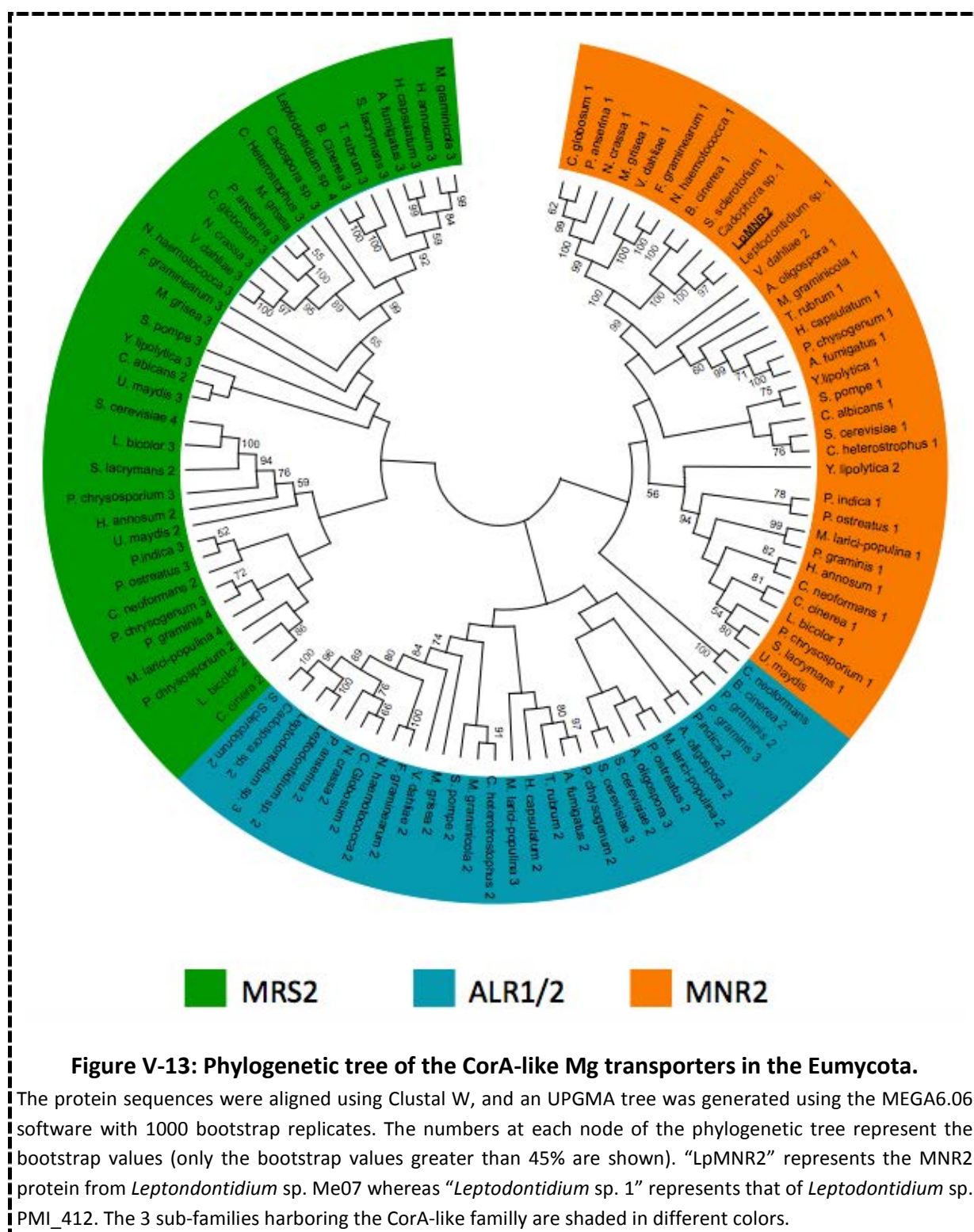
The CorA-like family is composed of three sub-families of proteins: the ALR1/2, MNR2, and MRS2 sub-families (Niegowski and Eshaghi 2007). The three sub-families diverge in their cellular localization and are all involved in Mg homeostasis. In yeast, Mg influx into the cell is accomplished through the activity of ALR1/ALR2 at the plasma membrane whereas MRS2 provides Mg to the mitochondria. MNR2 is responsible for Mg remobilization from vacuolar storage to the cytosol (Pisat *et al.* 2009). The full-length sequence of LpMNR2 was aligned with those from fungal members of the CorA-like family transporters and a phylogenetic tree was drawn (**Figure V-13**). The sequences clustered into the three sub families described above (ALR1/2, MNR2 and MRS2). BLASTX and BLASTP searches were done with CorA-like reference sequences to identify other genes encoding CorA-like proteins from the *Leptodontidium* sp. PMI\_412 genome database. According to their high identity with known members of the different sub-families, three other CorA-like proteins were found in PMI\_412 and were subsequently named LpALR1, LpALR2, and LpMRS2. Within the MNR2 sub-family, a single protein generally arises from each fungal genome, except for *Verticillium dahliae* and *Yarrowia lipolytica* which contain two MNR2 members. The ORF sequences of LpMNR2 from Me07 and PMI\_412 differs for 31 residues (**Figure V-11**).





The results of alignments of both MNR2 and ITS sequences were depicted in **Figure V-11** and **Figure V-12** and suggested that Me07 and PMI\_412 could belong to two different species of *Leptodontidium*. However, further taxonomy multi-gene loci analyses will have to be performed to clarify the taxonomy.

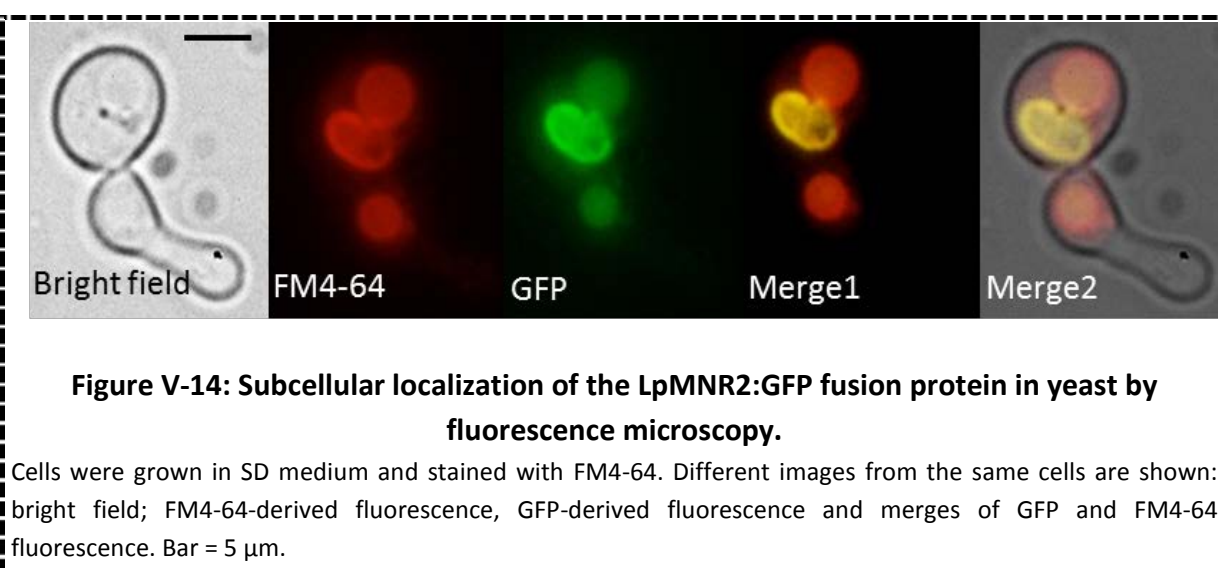
Both *GFP* and *HPH* genes were integrated in the DNA of T1 and GFP emission was also recorded (**Figure V-7**). Taken together these results confirmed the integration of T-DNA in T1 DNA. However, in order to verify the number of T-DNA insertion in T1 DNA, Southern blot analyses need to be further performed.



#### 2.3.4. Localization of LpMNR2 in yeast cells

We constructed a LpMNR2::GFP fusion protein and expressed it in wild-type and  $\Delta mnr2$  yeast strains to determine the subcellular localization of LpMNR2. In both strains, GFP signal was found on the vacuolar membrane. The location of the signal on the tonoplast

was confirmed by staining the cells with the lipophilic dye FM4-64. This dye specifically stains the vacuolar membrane of yeast (Vida and Emr 1995). FM4-64 clearly co-localized with LpMNR2::GFP in yeast cells. Conversely, yeast expressing a cytoplasmic GFP was used as a control to rule out the cytoplasmic localization of LpMNR2. In cells expressing untagged MNR2, no GFP-derived fluorescence was recorded. From these experiments, the data therefore demonstrate that LpMNR2 localized on the vacuolar membrane when expressed in yeast. The tonoplast localization of MNR2 proteins was also reported in *M. oryzae* and *S. cerevisiae* (Pisat *et al.* 2009; Reza *et al.* 2016). Conversely, proteins belonging to the two other CorA-like sub-families localized to the mitochondrial membrane (MRS2) or to the plasmamembrane (ALR1/2) (Payandeh and Pai 2006; Niegowski and Eshaghi 2007).



### 2.3.5. Effect of the *MNR2* mutation on the tolerance to TE in yeast and in *Leptodontidium sp.*

The mutant T1 has a T-DNA-derived insertional mutation in the *MNR2* gene and is Zn-sensitive. In order to determine whether this mutation also alters the tolerance to other TE, growth of T1 was compared to that of the wild-type in the presence of various TE. MIC values (**Table V-4**) for both isolates were therefore determined. First, we confirmed the high sensitivity of the T1 transformant with a MIC value of 2 mM whereas that of the wild-type was 3.5 times higher. Moreover, the deletion of *MNR2* involved a severe sensitivity to Ni. The MIC value of T1 was indeed very low (0.2 mM) compared to that of the wild-type (1 mM). To a lesser extent, the *MNR2* mutant was also more sensitive to Mn, Cu, Cd, and Co (but not to Pb) when compared to the wild-type. The mutation of *MNR2* therefore confers sensitivity to a large set of TE in *Leptodontidium sp.*.

Similar results were described in the yeast model, *S. cerevisiae*. This mutant was indeed sensitive to high concentrations of different TE, and were also sensitive to high Ca and Mg (Arita *et al.* 2009; Pisat *et al.* 2009). Consequently, and in order to confirm that the mutation in *LpMNR2* is responsible for the metal-sensitive phenotype of *Leptodontidium sp.*, *LpMNR2* was expressed in the  $\Delta mnr2$  yeast mutant and growth was monitored on either control (SD-URA) or metal-supplemented media **Figure V-15**. Growth was also monitored for

the BY4741 wild-type and the  $\Delta mnr2$  mutant strains both transformed with the pYES2 empty vector. The wild-type was able to grow at high concentrations of Co, Ni, Mn, and Zn, as well on high Ca and Mg. Conversely, the  $\Delta mnr2$  mutant was sensitive to these elements, as previously reported by Pisat *et al.* (2009). The growth of LpMNR2-expressing  $\Delta mnr2$  cells was fully restored on high Mg, Co, and Zn (**Figure V-15**). The growth was also rescued, but to a lesser extent on high Ca, Ni, and Mn. The rescue of the growth-deficient phenotype of  $\Delta mnr2$  by LpMNR2 suggests that LpMNR2 has a similar role than ScMNR2 when expressed in yeast. Therefore, LpMNR2 has likely the same role in *Leptodontidium* sp.. Moreover, these results argue against the role of any putative unknown mutation - other than the detected T-DNA in LpMNR2 - in the metal-sensitive phenotypes of the T1 transformant. Thus, the TE-sensitive phenotype of T1 is the consequence of the insertional T-DNA mutation in LpMNR2.

**Table V-4: Minimal inhibitory concentrations for Co, Mn, Ni, and Zn for *Leptodontidium* sp. (WT) and transformant T1.**

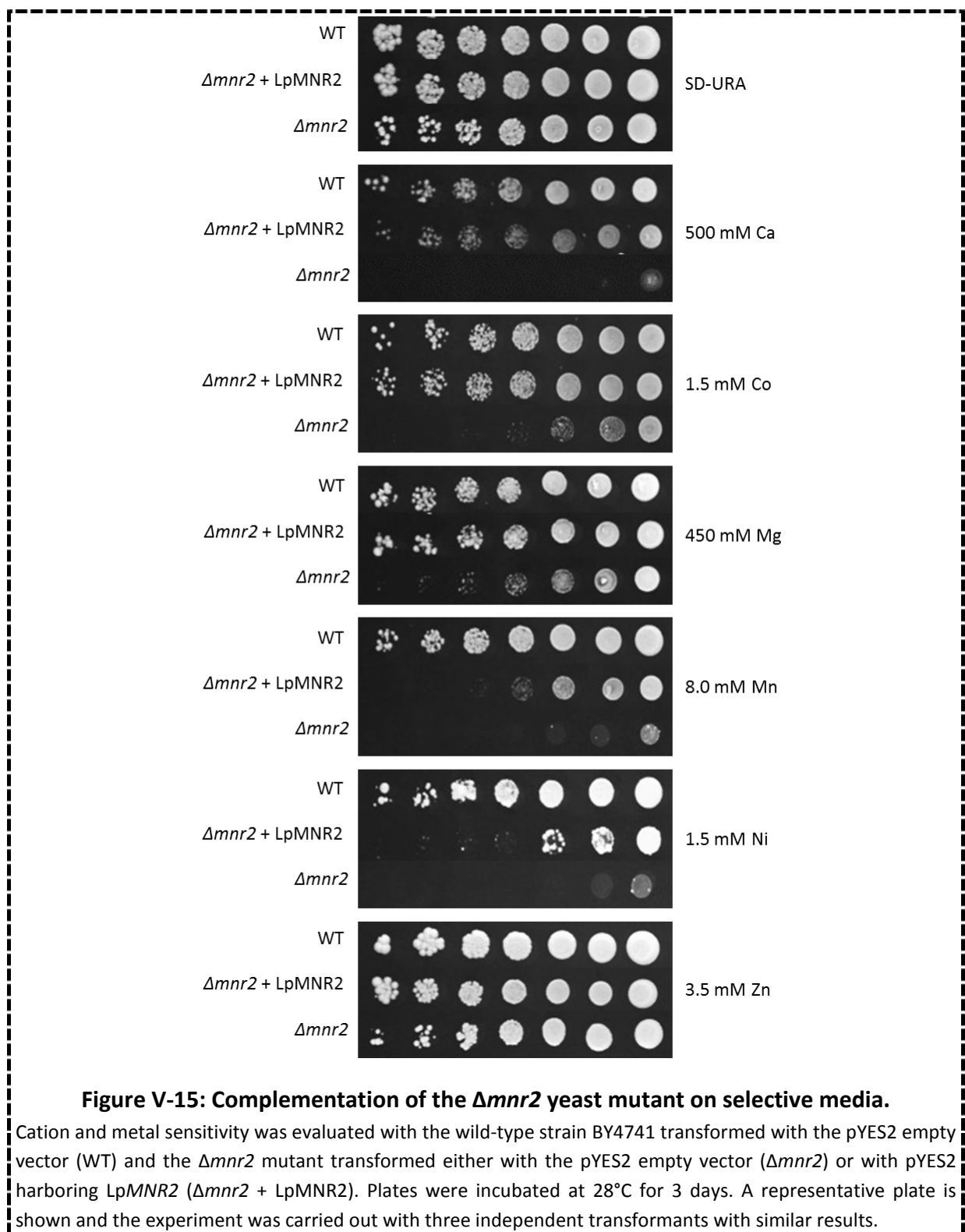
| Element | Minimum inhibitory concentration (mM) |     |
|---------|---------------------------------------|-----|
|         | WT                                    | T1  |
| Cd      | 1.2                                   | 0.6 |
| Co      | 1.2                                   | 0.6 |
| Cu      | 1.5                                   | 1   |
| Mn      | 10                                    | 8   |
| Ni      | 1                                     | 0.2 |
| Pb      | 2                                     | 2   |
| Zn      | 8                                     | 2   |

MIC is the minimum inhibitory concentration of metal that completely inhibited fungal growth.

#### **2.3.6. Effect of the MNR2 mutation on TE accumulation in *Leptodontidium* sp.**

The potential role of LpMNR2 in divalent cation homeostasis was further investigated by comparing the total elemental content of WT and T1 strains grown on a Zn concentration gradient. The range of Zn concentrations (0.25 to 1 mM) was chosen to ascertain sub-toxic concentrations. The growth of both strains was indeed not significantly affected by the concentrations we used (**Table V-5**). Mg and Zn contents were significantly different between the two strains. Zn content of T1 was approximately twice of that of the wild-type, irrespectively of the Zn concentration in the medium. The ratio of Zn content in the mutant to that of the wild-type was 1.8 in the control treatment, and it varied from 1.8 at 1.5 mM Zn to 2.2 at 0.75 mM Zn in the medium. A similar result was observed for Mg content. The ratio of Mn content in the mutant to that of the wild-type was 1.7 in the control treatment. This ratio was slightly lower (1.4) whatever the Zn concentration applied in the growth medium. The deletion of *MNR2* in *M. oryzae* also induced a higher Mg accumulation in hyphae (Reza

*et al.* 2016). Under Mg-replete conditions, Mg and Zn contents of yeast were respectively 1.7 and 1.3 higher in the  $\Delta mnr2$  strain when compared to the wild-type strain (Pisat *et al.* 2009).



Under Mg-deficiency Zn and Co cellular contents were higher than those from cells grown under Mg-replete condition, and the  $\Delta mnr2$  strain accumulated two-fold more Zn and Co when compared to the wild-type. Under these conditions, Mg content also dramatically increased in the  $\Delta mnr2$  strain (5.4 times more than in the wild-type).

**Table V-5: Growth and elemental content in mycelia of T1 and WT exposed to Zn.**

| Strain | Element<br>( $\mu\text{g/g DW}$ ) | Zinc concentration in medium (mM) |                                 |                                 |                                 |                                 |
|--------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|        |                                   | 0                                 | 0.25                            | 0.5                             | 0.75                            | 1                               |
| WT     | Ca                                | 774 $\pm$ 20 <sup>a</sup>         | 657 $\pm$ 49 <sup>a</sup>       | 611 $\pm$ 14 <sup>a</sup>       | 729 $\pm$ 94 <sup>a</sup>       | 636 $\pm$ 18 <sup>a</sup>       |
| T1     |                                   | 809 $\pm$ 4 <sup>a</sup>          | 687 $\pm$ 37 <sup>a</sup>       | 883 $\pm$ 170 <sup>a</sup>      | 638 $\pm$ 24 <sup>a</sup>       | 773 $\pm$ 168 <sup>a</sup>      |
| WT     | Cu                                | 4.9 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>        | 4.8 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>      | 5.1 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>      | 6.1 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>      | 5.4 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>      |
| T1     |                                   | 6.9 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>        | 4.5 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>      | 5.1 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>      | 5.4 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>      | 5.3 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>      |
| WT     | Fe                                | 57.8 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>       | 70.7 $\pm$ 6.3 <sup>a</sup>     | 139.5 $\pm$ 33.7 <sup>a</sup>   | 74.0 $\pm$ 9.8 <sup>a</sup>     | 73.4 $\pm$ 2.9 <sup>a</sup>     |
| T1     |                                   | 99.6 $\pm$ 16.9 <sup>a</sup>      | 73.0 $\pm$ 5.1 <sup>a</sup>     | 79.5 $\pm$ 8.8 <sup>a</sup>     | 72.6 $\pm$ 5.9 <sup>a</sup>     | 57.2 $\pm$ 4.3 <sup>b</sup>     |
| WT     | K                                 | 14,746 $\pm$ 277 <sup>a</sup>     | 13,572 $\pm$ 1,110 <sup>a</sup> | 15,601 $\pm$ 430 <sup>a</sup>   | 13,097 $\pm$ 1,209 <sup>a</sup> | 13,009 $\pm$ 493 <sup>a</sup>   |
| T1     |                                   | 16,373 $\pm$ 757 <sup>a</sup>     | 12,783 $\pm$ 1,160 <sup>a</sup> | 11,347 $\pm$ 1,530 <sup>b</sup> | 10,977 $\pm$ 390 <sup>a</sup>   | 10,642 $\pm$ 1,095 <sup>b</sup> |
| WT     | Mg                                | 1519 $\pm$ 35 <sup>a</sup>        | 1476 $\pm$ 36 <sup>a</sup>      | 1482 $\pm$ 14 <sup>a</sup>      | 1340 $\pm$ 20 <sup>a</sup>      | 1345 $\pm$ 24 <sup>a</sup>      |
| T1     |                                   | 2540 $\pm$ 178.8 <sup>b</sup>     | 2011 $\pm$ 158 <sup>b</sup>     | 2116 $\pm$ 157 <sup>b</sup>     | 1849 $\pm$ 53 <sup>b</sup>      | 1860 $\pm$ 33 <sup>b</sup>      |
| WT     | Mn                                | 19.5 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>       | 21.6 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>     | 16.1 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>     | 18.4 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>     | 17.8 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>     |
| T1     |                                   | 15.3 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>       | 15.9 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>     | 15.1 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>     | 14.6 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>     | 13.4 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>     |
| WT     | P                                 | 10,801 $\pm$ 256 <sup>b</sup>     | 11,210 $\pm$ 236 <sup>a</sup>   | 11,150 $\pm$ 183 <sup>a</sup>   | 10,946 $\pm$ 440 <sup>a</sup>   | 10,434 $\pm$ 145 <sup>a</sup>   |
| T1     |                                   | 12,811 $\pm$ 412 <sup>a</sup>     | 10,175 $\pm$ 744 <sup>a</sup>   | 10,974 $\pm$ 704 <sup>a</sup>   | 10,390 $\pm$ 263 <sup>a</sup>   | 10,083 $\pm$ 203 <sup>a</sup>   |
| WT     | S                                 | 3,311 $\pm$ 74 <sup>a</sup>       | 2,729 $\pm$ 137 <sup>a</sup>    | 2946 $\pm$ 58 <sup>a</sup>      | 2651 $\pm$ 66 <sup>a</sup>      | 2457 $\pm$ 37 <sup>a</sup>      |
| T1     |                                   | 3,117 $\pm$ 210 <sup>a</sup>      | 2,201 $\pm$ 165 <sup>b</sup>    | 2366 $\pm$ 188 <sup>b</sup>     | 2236 $\pm$ 37 <sup>b</sup>      | 2363 $\pm$ 38 <sup>a</sup>      |
| WT     | Zn                                | 31.8 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>       | 319.3 $\pm$ 18.8 <sup>a</sup>   | 689.7 $\pm$ 8.6 <sup>a</sup>    | 761.5 $\pm$ 52.7 <sup>a</sup>   | 1055.7 $\pm$ 17.2 <sup>a</sup>  |
| T1     |                                   | 58.2 $\pm$ 13.5 <sup>b</sup>      | 664.7 $\pm$ 57.3 <sup>b</sup>   | 1252.3 $\pm$ 95.3 <sup>b</sup>  | 1692.4 $\pm$ 41.1 <sup>b</sup>  | 2199.9 $\pm$ 76.7 <sup>b</sup>  |
| Strain | Dry weight<br>(mg)                | Zn concentration in medium (mM)   |                                 |                                 |                                 |                                 |
|        |                                   | 0                                 | 0.25                            | 0.5                             | 0.75                            | 1                               |
| WT     |                                   | 0.30 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>      | 0.38 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>    | 0.33 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>    | 0.33 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>    | 0.33 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>    |
| T1     |                                   | 0.33 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>      | 0.43 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>    | 0.43 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>    | 0.31 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>    | 0.27 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>    |

For each element different letters represent significant differences between WT and T1 strains ( $P < 0.05$ , Kruskal-Wallis) whereas for biomass data different letters represent significant differences between Zn treatments ( $P < 0.05$ , Kruskal-Wallis)

### 2.3.7. Conclusions

Taken together these results suggest that LpMNR2 was localized on the vacuole membrane where it could play a key role on Mg remobilization from the vacuole to the cytosol. Further experiments are needed to demonstrate the role of LpMNR2 in Mg transport and remobilization from this vacuolar storage compartment. However, the deletion of this gene in *Leptodontidium* involves the hypersensitivity to a wide range of TE (e.g. Co, Ni, Cd, Cu, and Zn). Previously the same observation in yeast was performed by Pisat *et al.* (2009) and Reza *et al.* (2016) and these authors suggested that this sensitivity was due to the overexpression of the plasmalemma Mg-uptake system mediated by ALR1/2 transporters to cope with Mg deficiency. These transporters are indeed not Mg-specific and could also transport Ca and several trace elements (Ni, Co, Zn). *ALR1/ALR2* upregulation induced the massive import of TE in yeast cells and generated cell toxicity as observed by MacDiarmid and Gardner (1998). This hypothesis was further confirmed by several studies where mutation of the *ALR* genes induced tolerance to Al, Cd, Co, and Ni (Gibson *et al.* 1991; MacDiarmid and Gardner 1998; Kern *et al.* 2005b; Sarikaya *et al.* 2006).

Altogether, our results suggest that *Leptodontidium* hyphae could tolerate a higher TE stress under Mg-deficient conditions, as previously reported for the non-filamentous model *S. cerevisiae* (Pisat *et al.* 2009). Moreover, the present data extend our knowledge on the interplay between Mg and Zn homeostasis/tolerance from the laboratory yeast model to an environmental endophytic model.

Recently, the presence of MNR2 was reported to be essential for the establishment of *Magnaporthe oryzae* virulence in rice (Reza *et al.* 2016). Further studies are required to determine whether MNR2 is also essential for *Leptodontidium* sp. to successfully colonize roots of host plants. In the case of a positive root colonization by the mutant strain, it will be particularly interesting to evaluate its impact on plant tolerance under TE-stress conditions.



### **3. Unravelling the role of melanin in trace element tolerance and accumulation of three dark septate endophytic species.**

#### **Abstract**

Dark septate endophytes (DSE) are trace element (TE)-tolerant fungi and are abundant in TE-polluted environments. Yet, underlying mechanisms involved in TE tolerance have not been identified. The production of melanin, a black polymer found in cell walls was hypothesized by several authors to play a role to TE tolerance. To test this hypothesis, we established a series of experiments using isogenic low-pigmented strains and melanin inhibitors and tested the responses to TE. Six strains of DSE belonging to *Cadophora*, *Leptodontidium* and *Phialophora*, we evaluated (i) to identify the pathway(s) of melanin biosynthesis used by these strains, (ii) to monitor the effect of melanin on TE tolerance and (iii) accumulation. All DSE strains mainly produced 1,8-dihydroxynaphtalene (DHN) melanin and three strains also produced 3,4-dihydroxyphenylalanin (DOPA) melanin but in lower amounts. Inhibition of melanin synthesis only affected As, Zn, Cd and Cu accumulation but not TE tolerance. This suggests that melanin production is not an important functional trait that contributes to TE tolerance by DSEs but rather contribute to TE accumulation.

#### **3.1. Introduction**

Dark septate endophytes (DSE) are polyphyletic, sterile or conidial, ascomycetes characterized by dark pigmented mycelia and septate hyphae (Jumpponen and Trappe 1998a). They have been observed in roots of more than 600 plant species spanning 100 plant families (Mandyam and Jumpponen 2005). DSE have a wide geographical distribution (*e.g.* arctic, boreal, alpine, temperate forest, or tropical ecosystems) and display strong abilities to tolerate a range of environmental stress (*e.g.* drought, salinity, pollution) (Mandyam and Jumpponen 2005; Likar and Regvar 2013). Regarding metal contaminated soils, DSE colonization was reported in plant roots of Pb and/or Zn mining or smelting sites and Ni/Cu smelter areas (Ruotsalainen *et al.* 2007; Likar and Regvar 2013; Zhang *et al.* 2013). Moreover, in these environments, the relative abundance of DSE increased with TE stress compared to other root-associated fungi (Ruotsalainen *et al.* 2007; Likar and Regvar 2013). This tolerance towards TE stress has also been confirmed *in vitro* using agar-plate tests (Ban *et al.* 2012; Likar and Regvar 2013; Berthelot *et al.* 2016). However, the current knowledge of the physiological traits underlying DSE tolerance to TE is scarce, especially at the molecular and cellular levels. Recent studies (Gorfer *et al.* 2009; Zhao *et al.* 2015) suggested that DSE could survive in TE-contaminated environments through three mechanisms: (i) extracellular chelation to prevent TE penetration into cells, (ii) complexation and sequestration of TE in cellular compartments to inhibit their toxicity and (iii) restoration of TE-induced injuries. Several authors hypothesized that the relative high TE tolerance of

DSE and their TE accumulation capacities could be partially explained by the high melanin-derived pigmentation in the mycelia of DSE (Zhan *et al.* 2011, 2016).

Melanin is a common compound found in animals, plants, bacteria and fungi (Butler and Day 1998). Fungal melanins are present in cell walls and spores, associated with protein or carbohydrates, or can be released in the extracellular fraction (Gessler *et al.* 2014). They are biopolymers synthesized from phenolic or indolic compounds. While they are non-essential in primary metabolic pathways, melanins may still serve essential survival functions, particularly under stressful environmental conditions such as TE-contaminated soils (Fogarty and Tobin 1996; Butler and Day 1998; Gessler *et al.* 2014). Indeed, carboxyl and hydroxyl groups of melanin can bind TE with a high affinity. However, the nature and content of melanin vary drastically among fungi modifying its capacity towards TE binding. As a matter of fact, there are three main types of melanin: (i) 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)-melanin, (ii) pheomelanin, and (iii) allomelanin (including 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN)-melanin, catechol-melanin,  $\gamma$ -glutamyl-4-hydroxybenzene (GDHB)-melanin and pyomelanin) (Gessler *et al.* 2014). They are all synthesized from the tyrosine precursor at the exception of DHN-melanin which is synthesized from malonyl- or acetyl-coA precursors. It is assumed by several authors that the type of melanin produced by fungi would be largely governed by their phylogeny: for instance basidiomycetes produce GDHB-, catechol- and DOPA-melanins whereas ascomycetes produce DHN-, pyomelanin and sometimes DOPA-melanin (Wheeler 1983; Gessler, Egorova and Belozerskaya 2014). However recent studies reported several exceptions and knowledge about melanin biosynthesis pathways in fungi needs further detailed investigation. Melanin-specific metabolic inhibitors and the use of albino mutants represent powerful strategies to decipher the properties of fungal melanin and the biosynthetic pathways that are involved (Frederick *et al.* 1999).

A number of studies were performed by the past, on melanin pathways and melanin properties of human pathogenic fungi (Butler, Gardiner and Day 2005). Conversely, studies concerning melanin in DSE are limited (Zhan *et al.* 2011, 2016). More generally, the relationship between melanin content and TE-tolerance and TE-accumulation in ascomycetes is ambiguous and is still under debate. For instance, a recent publication focusing on the DSE *Exophiala pisciphila* reported that melanin was necessary for Cd tolerance (Zhan *et al.* 2016) whereas Cd tolerance was unchanged between a melanized strain of the root-rot pathogen *Gaeumannomyces graminicola* and its isogenic albino strain (Frederick *et al.* 1999). These results suggest that melanin would not be the major factor of TE tolerance in these fungi. The same controversy emerges for the relationship between melanin content and TE accumulation by DSE. Indeed, Gadd and Rome, (1988) and Siegel *et al.* (1990) reported a decreased accumulation of TE in melanin-inhibited *Cladosporium* sp. whereas that was not the case for *E. pisciphila* (Zhan *et al.* 2016). However, whether

melanin plays an important role in TE tolerance and accumulation in DSE still needs to be demonstrated.

Therefore, in the present study, we investigated the role of melanin in As, Cd, Cu, and Zn tolerance and accumulation in six DSE strains belonging to three genera of the Helotiales differing in their mycelial melanin concentration. In a first approach, *in silico* analyses and *in vitro* tests were performed to reveal which pathways were involved in melanin biosynthesis. Second, we investigated whether melanin accumulation was induced under TE stress. Third, melanin-specific metabolic inhibitors and albino mutants of *Leptodontidium* sp. were used to reveal a putative relationship between TE tolerance and accumulation with melanin content in mycelia.

## **3.2. Materials and methods**

### **3.2.1. Searching for homologous genes**

The JGI website portal with the *Cadophora* sp. DSE 1049 (<http://genome.jgi.doe.gov/Cadsp1/Cadsp1.home.html>) and *Leptodontidium* sp. PMI\_412 (<http://genome.jgi.doe.gov/Leptod1/Leptod1.home.html>) genomes was used to identify genes involved in melanin biosynthesis pathways. Complete sequences of known genes or conserved regions of these gene sequences from other species (**Table V-6**) were used to search for orthologous genes in the *Leptodontidium* sp. PMI\_412 and *Cadophora* sp. DSE 1049 genomes. The blast option with the standard BLOSUM 62 scoring matrix was used for protein sequence alignment. Only sequences with e-value up to  $10^{-50}$  were used

### **3.2.2. Strains and culture medium**

Six DSE strains were used in the present study. Strains Me07 and Pr30 belong to *Leptodontidium* sp.; strains Fe06 and DSE 1049 belong to *Cadophora* sp., and strains Pr29 and Va46 belong to *Phialophora* sp. They were all previously described by Berthelot *et al.* (2016) (Chapter III-1). The strain DSE 1049 was a generous gift from Dr Gabor Kovács (University of Budapest, Hungary).

We also used seven isogenic low-pigmented and albino mutant strains of *Leptodontidium* sp.. They were obtained from agrotransformation of the strain *Leptodontidium* sp. Me07 (Chapter V-2). The strains were cultured on Pachlewski (Pachlewski and Pachlewska 1974) agar medium at 24°C in the dark.

### **3.2.3. Strain sensitivity to melanin inhibitors and to TE**

The strain sensitivity to different melanin biosynthesis inhibitors was evaluated by investigating the minimum inhibitory concentration (MIC) of three melanin inhibitors on fungal growth. Kojic acid inhibits tyrosinase which catalyzes two steps (tyrosine oxidation to

DOPA and conversion of DOPA to dopaquinone) of the DOPA-melanin pathway (Zhan *et al.* 2011). Tricyclazole inhibits both tetra- and tri-hydroxynaphthalene reductases in the DHN-melanin pathway. These enzymes catalyze the reduction of 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene to scytalone and 1,3,8-trihydroxy-naphthalene to vermeline, respectively (Gessler, Egorova and Belozerskaya 2014). And finally, sulcotrione inhibits the p-dihydroxyphenylpyruvate dehydrogenase which catalyzes the dehydrogenation of 4-hydroxyphenylpyruvate to homogentisic acid in the pyomelanin pathway (Almeida-Paes *et al.* 2012). Plugs (6 mm) were cut from the edge of actively growing two-week-old fungal colonies and placed on solid Pachlewski medium amended with melanin inhibitors at the following concentrations: 0 to 100 µg/ml tricyclazole (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), 0 to 1000 µg/ml kojic acid (Sigma-Aldrich), and 0 to 200 µg/ml sulcotrione (Sigma-Aldrich). TE tolerance tests were performed with or without tricyclazole and the following concentrations of TE: 0 to 30 mM of Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>, or 0 to 0.3 mM CdCl<sub>2</sub>, or 0 to 7 mM ZnCl<sub>2</sub>. TE tolerance of isogenic albino and low-pigmented strains was also evaluated with the following concentrations: 0 to 3 mM Na<sub>2</sub>AsHO<sub>4</sub>; 0 to 9 mM ZnCl<sub>2</sub> and 0 to 1.5 mM CdCl<sub>2</sub>. For all treatments, diameter of colony and mycelial pigmentation were observed after two weeks of incubation at 24°C.

#### **3.2.4. Effect of melanin inhibitors and TE on mycelial melanin content**

Quantification of melanin content in mycelia was performed with fungal strains cultured on Pachlewski agar media covered with sterile cellophane sheets and amended with or without TE and melanin synthesis inhibitors. Tricyclazole (10 µg/ml) and kojic acid (50 µg/ml) were used separately or in combination in the culture medium. Sulcotrione was removed from this experiment because it had no impact on strain pigmentation. TE were used as follows: Na<sub>2</sub>AsHO<sub>4</sub> and ZnCl<sub>2</sub> at 1 and 2 mM; CdCl<sub>2</sub> and CuCl<sub>2</sub> at 200 and 500 µM. Cultures with both TE and inhibitors were also performed, and in this case only the lowest concentration of the four TE was used. Mycelia were harvested after two weeks of growth. They were dried overnight at 60°C, weighed and ground into powder.

For the determination of melanin content in mycelia, the extraction protocol was carried out according to a modified method of Zou *et al.* (2010). The powder (1g) was washed for 5 min with 30 ml of distilled water, followed by a centrifugation step at 4,000 rpm for 5 min. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended with NaOH 6M to reach a final pH of 12. The mixture was sonicated for 24 h at 50°C and 40 Hz, and centrifuged at 4,000 rpm for 5 min. The alkaline pigmented extract was then acidified to pH 2 with HCl 8M to precipitate melanin, followed by a centrifugation step at 10,000 rpm for 20 min. Melanin was finally washed with chloroform and ethyl acetate. For quantification, melanin was dissolved in NaOH 0.1M and the OD<sub>400nm</sub> of the solution was determined. Blanks were performed with NaOH 0.1M. A standard curve was obtained with synthetic melanin (Sigma-Aldrich).

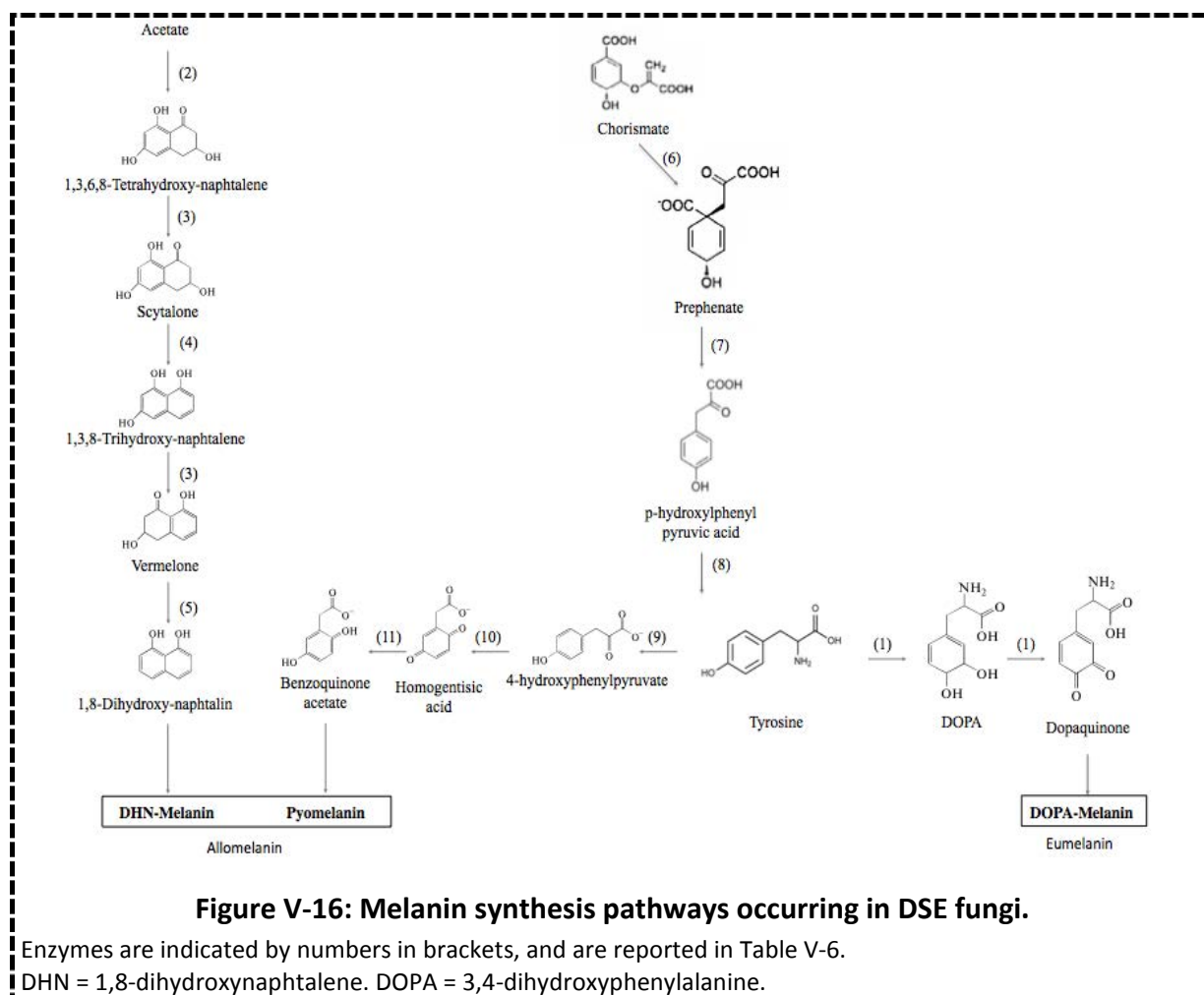
To measure the concentrations of TE in mycelia, dried biomass (100 mg) was digested by HNO<sub>3</sub> in a MARS 5 (CEM®, Saclay) microwave oven with the following program: 15 min at 170°C and 20 bars followed by 30 min cooling. The solutions were analyzed by inductively coupled plasma - atomic emission spectroscopy (Varian, Victoria, Australia). Two tobacco (INCT OBTL5 ichtj, Warsaw, Poland) and ryegrass (CD281 O204, ERM®, Geel, Belgium) standard references were submitted to the same digestion procedure and analyzed as part of the quality control of the protocol.

### 3.2.5. Statistical analyses

Statistical analyses were performed with R 3.1.3 (R Core Team2013) software. Normality of the data was tested using a Shapiro-Wilk test. Data were then analyzed by one-way ANOVA or by a one-way non-parametric Kruskal-Wallis test (alpha level of 0.05). Pearson correlation was used to evaluate the relationship between concentration of melanin in mycelia and TE-tolerance. All values reported are means ± standard errors (SE). Percentage values were *arcsin* transformed before statistical analyses.

## 3.3. Results

### 3.3.1. Enzymes involved in melanin biosynthetic pathways



We identified melanin biosynthesis proteins from *Cadophora* sp. and the *Leptodontidium* sp. genomes by a blastP search using the full length *Penicillium chrysogenum*, *Aeromonas media*, *Agaricus bisporus* and *Aspergillus fumigatus* protein sequences (Pihet *et al.* 2009; Weijn *et al.* 2013; Vasanthakumar *et al.* 2015; Wang *et al.* 2015). Proteins retrieved from the *Cadophora* sp. DSE 1049 and *Leptodontidium* sp. PMI\_412 genomes are depicted in **Figure V-16**. The numbers in brackets correspond to the enzymatic steps given in **Table V-6**. The analyses identified 25 genes in the *Leptodontidium* sp. PMI\_412 genome whereas 28 genes were identified from the *Cadophora* sp. DSE 1049 genome. Another major difference between both DSE resides in the number of putative polyketide synthases. Seven were identified in the *Cadophora* sp. genome whereas only three were retrieved in the *Leptodontidium* sp. genome.

### 3.3.2. Effect of biochemical inhibitors on melanin synthesis

Each strain was grown in presence of the three melanin inhibitors: sulcotrione, tricyclazole and kojic acid. In presence of sulcotrione neither growth inhibition nor pigmentation decrease was observed for all strains tested (data not shown).

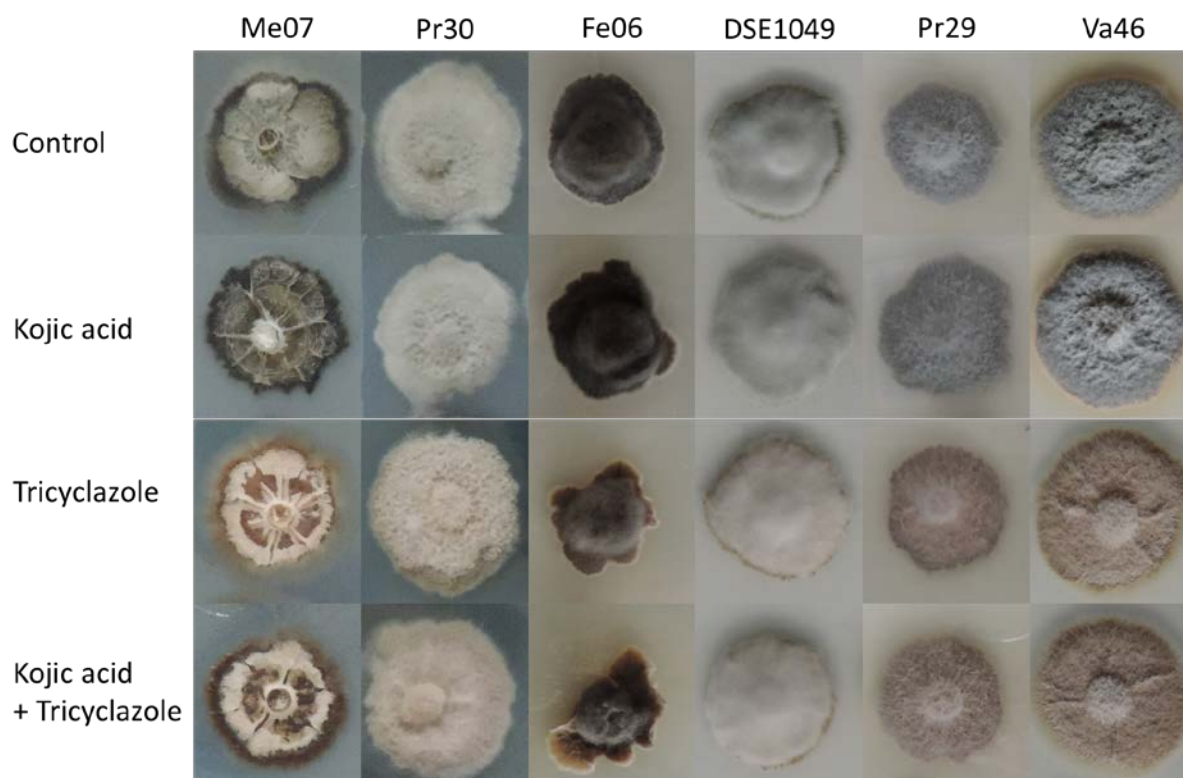
In the presence of tricyclazole, fungal growth was only inhibited at 100 µg/ml. Whatever the tricyclazole concentration, the gray/dark phenotype of the colonies was however less pronounced when compared to the non-treated control. Instead, we noted a reddish/brown pigmentation of the colonies, but also of the medium surrounding the colonies. The diameter of the red/brown halo enlarged with increasing concentrations of tricyclazole. In presence of kojic acid no growth inhibition was reported. Likewise, pigmentation of strains Pr30, Me07 and Pr29 remained unchanged. Conversely pigmentation of Fe06, DSE1049, and Va46 were lighter at 100 and 200 µg/ml kojic acid.

Because tricyclazole and kojic acid addition induced a variation in pigmentation, we further performed melanin quantification from mycelia grown on agar plates amended with or without 50 µg/ml kojic acid, 10 µg/ml tricyclazole or a combination of both compounds (**Figure V-17**). The same color phenotypes were recorded in this experiment (**Figure V-17**). Except a slight decrease for Pr30 in the presence of kojic acid, growth of the strains was not affected (**Table V-7**). Kojic acid reduced melanin content of Fe06, DSE 1049, and Va46 by 14, 23, and 44%, respectively. However, it did not significantly affect melanin content of the three other strains. Tricyclazole inhibited melanin content of all strains. The strongest reduction in melanin content was observed for Fe06 and Va46 (-77% and -60%, respectively). Moreover, the combination of both inhibitors induced the strongest reduction in melanin content. However there was no significant difference between the tricyclazole treatment and the combinatory treatment (**Table V-7**).

**Table V-6: Identified proteins in *Leptodontidium* sp. and *Cadophora* sp. genomes putatively involved in melanin biosynthesis.**

|      | Origine of sequence (protein ID)                           | Gene function                              | Protein ID                                                             |                                                                                    |
|------|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
|      |                                                            |                                            | <i>Leptodontidium</i> sp.                                              | <i>Cadophora</i> sp.                                                               |
| (1)  | <i>Agaricus bisporus</i> <sup>1</sup> (194055, 191532)     | Tyrosinase                                 | 376110 (+); 525002 (+)                                                 | 518430 (+); 448694 (+)                                                             |
| (2)  | <i>Aspergillus fumigatus</i> <sup>2</sup> (CAA46695)       | Polyketide synthase                        | 526612 (+); 474795 (+); 473902 (+)                                     | 606172 (+); 482874 (+); 658146 (+); 476551 (+); 558525 (+); 639029 (+); 477463 (+) |
| (3)  | <i>Aspergillus fumigatus</i> <sup>2</sup> (AAF03314)       | HN reductase                               | 350316 (+); 345903 (+)                                                 | 445556 (+)                                                                         |
| (4)  | <i>Aspergillus fumigatus</i> <sup>2</sup> (BAA13009)       | Scytalone dehydratase                      | 380224 (+); 516759 (+); 430560 (-)                                     | 557078 (+); 648036 (+)                                                             |
| (5)  | <i>Aspergillus fumigatus</i> <sup>2</sup> (AAF03353)       | Dehydratase                                | 528691 (+); 107642 (+); 350614 (+); 370797 (-); 308936 (+); 509146 (+) | 413886 (+); 474444 (+); 445897 (+); 594672 (+); 471895 (+); 56531 (+)              |
| (6)  | <i>Agaricus bisporus</i> <sup>1</sup> (193694)             | Chorismate mutase                          | 422416 (+)                                                             | 147006 (+)                                                                         |
| (7)  | <i>Agaricus bisporus</i> <sup>1</sup> (226049)             | Prephenate dehydrogenase                   | 388317 (+)                                                             | 514557 (+)                                                                         |
| (8)  | <i>Agaricus bisporus</i> <sup>1</sup> (191838)             | (4-hydroxy)phenylpyruvate aminotransferase | 435401 (+); 525973 (+)                                                 | 517077 (+); 402501 (+); 477092 (+)                                                 |
| (9)  | <i>Aeromonas media</i> <sup>3</sup> (615554453)            | Tyrosine aminotransferase                  | 382671 (+); 422393 (+); 404642 (-)                                     | 486122 (+); 415422 (+); 457200 (+); 662248 (+)                                     |
| (10) | <i>Penicillium chrysogenum</i> <sup>4</sup> (XP_002557734) | (4-hydroxy) phenylpyruvate dioxygenase     | 348899 (+); 334198 (+)                                                 | 455878 (+)                                                                         |

<sup>1</sup> Weijn *et al.* 2013; <sup>2</sup> Tsai *et al.* 1999 ; <sup>3</sup> Wang *et al.* 2015; <sup>4</sup> Vasanthakumar *et al.* 2015. Putative expressed-genes were reported by (+) whereas putative non-expressed genes were reported by (-). Blast analyses are detailed in Annexe 5.



**Figure V-17: Inhibition of melanin synthesis by tricyclazole and kojic acid.**

DSE were grown for two weeks on Pachlewski medium amended with 50 mg/ml kojic acid, 10 µg/ml tricyclazole or a combination of both compounds. A representative picture is shown and the experiment was carried out six times with similar results.

### 3.3.3. Relationship between TE stress and melanin production

Extraction and quantification of melanin were performed with strains grown in presence of toxic concentrations of four TEs. In most cases, the addition of TE induced a reduction in fungal growth (**Table V-9**). Only the growth of Me07 (with Zn addition), Va46 (with Cu addition), and Fe06 (will all TE) was not significantly affected when compared to the non TE-amended controls at two different concentrations (**Table V-9**). Results showed that the effect of TE on melanin content in DSE mycelia was highly dependent on both the fungal strain, the concentration of TE, and the TE species. However, no relationship was found between melanin content and DSE growth (data not shown, **Table V-8**). The addition of 1 or 2 mM Zn lead to the decrease of melanin content for Me07, Pr30 and Fe06 while only the higher Zn concentration induced its reduction in Pr29 (**Table V-8**). Similarly, Me07 and Va46 (at 0.2 mM Cd) and Me07 and Fe06 (in Cd- or As-amended media) had also lower contents of melanin. Conversely, DSE 1049 and Va46 had a higher melanin content at 1 mM and 2 mM Zn, respectively. It also increased for DSE 1049 under Cd and As stress. The same conclusion was found for Pr30 and Va46 under Cu stress, as well for Pr30 under As stress, it was tripled for Va46. Melanin content of mycelium of a given strain could be increased by one TE and decreased by another one as exemplified with strain Me07 in presence of Zn and Cu (**Table V-8**).

**Table V-7: Effect of tricyclazole and kojic acid on melanin accumulation and fungal growth.**

| Strain  | Melanin content (mg/g DW) |                           |                           |                          | Relative growth (% of the control) |                      |                       |                       |
|---------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
|         | Control                   | Kojic                     | Tricyclazole              | Kojic + tricyclazole     | Control                            | Kojic                | Tricyclazole          | Kojic + tricyclazole  |
| Me07    | 0.89 ± 0.02 <sup>b</sup>  | 0.97 ± 0.01 <sup>a</sup>  | 0.57 ± 0.11 <sup>c</sup>  | 0.47 ± 0.05 <sup>c</sup> | 100 ± 3 <sup>a</sup>               | 101 ± 6 <sup>a</sup> | 98 ± 4 <sup>a</sup>   | 97 ± 7 <sup>a</sup>   |
| Pr30    | 1.51 ± 0.03 <sup>a</sup>  | 1.27 ± 0.19 <sup>ab</sup> | 1.06 ± 0.06 <sup>bc</sup> | 0.82 ± 0.07 <sup>c</sup> | 100 ± 2 <sup>a</sup>               | 90 ± 2 <sup>c</sup>  | 103 ± 2 <sup>a</sup>  | 97 ± 1 <sup>b</sup>   |
| Fe06    | 6.67 ± 0.24 <sup>a</sup>  | 5.73 ± 0.10 <sup>b</sup>  | 1.52 ± 0.16 <sup>c</sup>  | 1.31 ± 0.09 <sup>c</sup> | 100 ± 2 <sup>c</sup>               | 112 ± 5 <sup>a</sup> | 101 ± 1 <sup>bc</sup> | 109 ± 4 <sup>ab</sup> |
| DSE1049 | 3.33 ± 0.11 <sup>a</sup>  | 2.58 ± 0.02 <sup>b</sup>  | 2.07 ± 0.08 <sup>bc</sup> | 0.83 ± 0.04 <sup>c</sup> | 100 ± 12 <sup>b</sup>              | 115 ± 2 <sup>a</sup> | 112 ± 4 <sup>a</sup>  | 110 ± 2 <sup>a</sup>  |
| Va46    | 3.73 ± 0.39 <sup>a</sup>  | 2.11 ± 0.09 <sup>b</sup>  | 1.50 ± 0.04 <sup>bc</sup> | 0.99 ± 0.04 <sup>c</sup> | 100 ± 9 <sup>a</sup>               | 107 ± 4 <sup>a</sup> | 102 ± 8 <sup>a</sup>  | 117 ± 4 <sup>a</sup>  |
| Pr29    | 1.43 ± 0.22 <sup>a</sup>  | 1.30 ± 0.01 <sup>a</sup>  | 0.99 ± 0.14 <sup>b</sup>  | 0.94 ± 0.19 <sup>b</sup> | 100 ± 4 <sup>a</sup>               | 96 ± 4 <sup>a</sup>  | 95 ± 6 <sup>a</sup>   | 97 ± 4 <sup>a</sup>   |

Mycelia were grown for two weeks on Pachlewski medium amended with 50 µg/ml kojic acid, 10 µg/ml tricyclazole or a combination of both compounds. Values are means ± SE (n=9). Statistically significant differences between treatments (P<0.05, Kruskal-Wallis test) are indicated by different letters.

**Table V-8: Effect of trace elements on melanin content in DSE mycelia.**

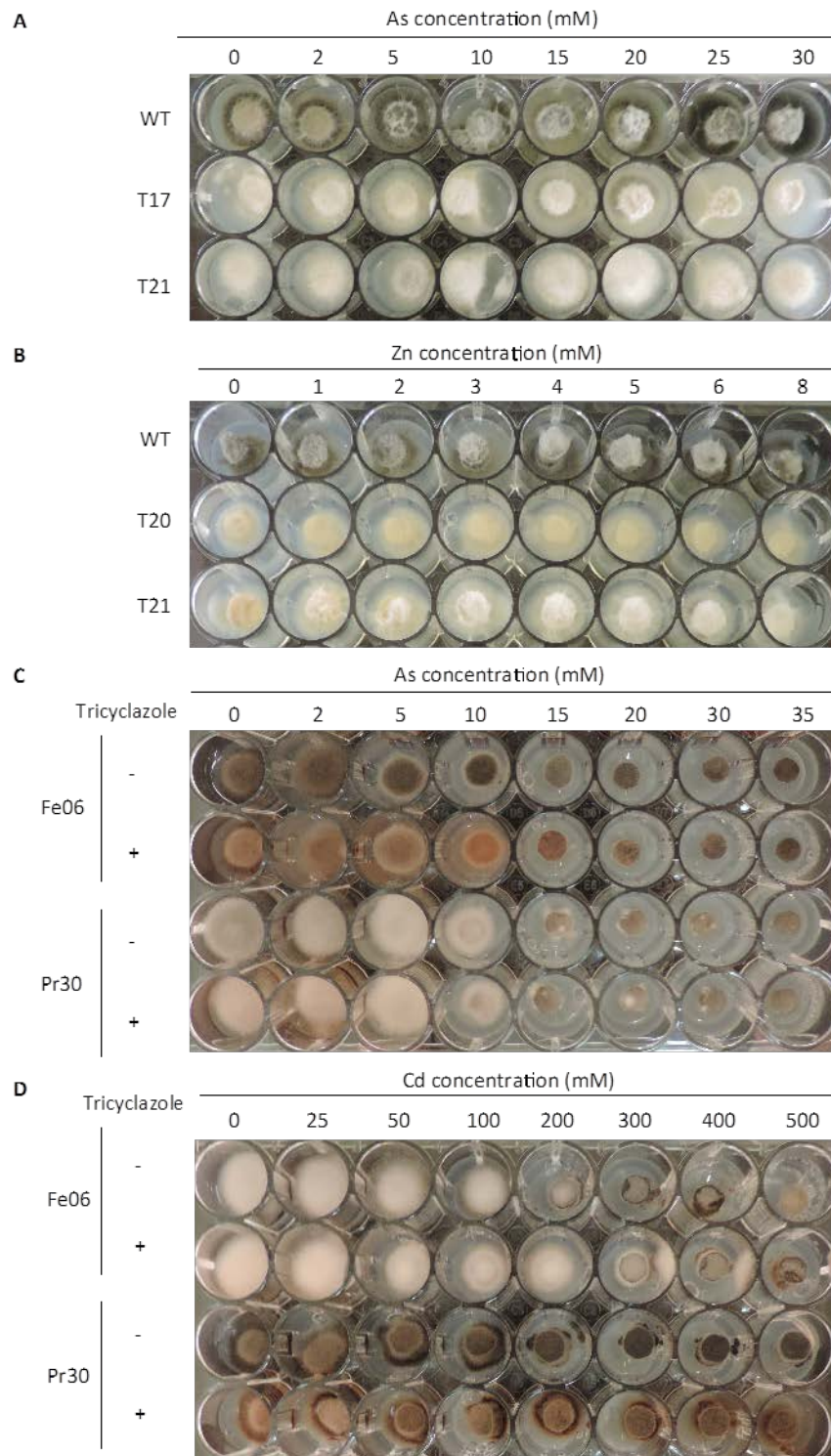
| Strains | Melanin concentration (mg/g dry wt) |                        |                        |                        |                         |                        |                        |                        |                        |
|---------|-------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|         | Zn (mM)                             |                        |                        | Cd (mM)                |                         | As (mM)                |                        | Cu (mM)                |                        |
|         | 0                                   | 1                      | 2                      | 0.2                    | 0.5                     | 1                      | 2                      | 0.2                    | 0.5                    |
| Me07    | 0.9 ± 0.1 <sup>a</sup>              | 0.3 ± 0.1 <sup>b</sup> | 0.4 ± 0.0 <sup>b</sup> | 0.6 ± 0.1 <sup>b</sup> | 1.2 ± 0.1a              | 0.7 ± 0.0 <sup>b</sup> | 0.2 ± 0.0 <sup>b</sup> | 1.2 ± 0.0 <sup>a</sup> | 2.2 ± 0.1 <sup>a</sup> |
| Pr30    | 1.2 ± 0.5 <sup>a</sup>              | 0.4 ± 0.1 <sup>b</sup> | 0.3 ± 0.1 <sup>b</sup> | 0.8 ± 0.1 <sup>a</sup> | 1.2 ± 0.1 <sup>a</sup>  | 2.3 ± 0.2 <sup>b</sup> | 2.4 ± 0.1 <sup>b</sup> | 1.7 ± 0.7 <sup>b</sup> | 1.6 ± 0.7 <sup>b</sup> |
| Fe06    | 6.8 ± 0.1 <sup>a</sup>              | 3.3 ± 0.5 <sup>b</sup> | 4.2 ± 0.0 <sup>b</sup> | 4.6 ± 0.2 <sup>b</sup> | 2.6 ± 0.6 <sup>b</sup>  | 5.9 ± 0.2 <sup>a</sup> | 7.1 ± 0.4 <sup>a</sup> | 6.3 ± 0.4 <sup>a</sup> | 5.0 ± 0.0 <sup>b</sup> |
| DSE1049 | 3.1 ± 0.1 <sup>a</sup>              | 4.3 ± 0.2 <sup>b</sup> | 2.3 ± 0.6 <sup>a</sup> | 7.5 ± 0.2 <sup>b</sup> | 12.3 ± 0.2 <sup>b</sup> | 3.2 ± 0.2 <sup>a</sup> | 4.6 ± 0.2 <sup>b</sup> | 3.8 ± 0.2 <sup>a</sup> | 2.8 ± 0.2 <sup>a</sup> |
| Pr29    | 1.8 ± 0.2 <sup>a</sup>              | 1.8 ± 0.1 <sup>a</sup> | 0.9 ± 0.2 <sup>b</sup> | 1.8 ± 0.0 <sup>a</sup> | 2.4 ± 0.3 <sup>a</sup>  | 1.6 ± 0.2 <sup>a</sup> | 2.1 ± 0.0 <sup>a</sup> | 1.1 ± 0.1 <sup>a</sup> | 1.1 ± 0.1 <sup>a</sup> |
| Va46    | 3.2 ± 0.5 <sup>a</sup>              | 4.1 ± 0.2 <sup>a</sup> | 8.7 ± 0.1 <sup>b</sup> | 1.5 ± 0.2 <sup>b</sup> | 2.8 ± 0.3 <sup>a</sup>  | 3.1 ± 0.3 <sup>a</sup> | 0.9 ± 0.1 <sup>b</sup> | 6.4 ± 0.4 <sup>b</sup> | 4.9 ± 0.2 <sup>b</sup> |

Mycelia were grown for two weeks on Pachlewski medium amended with TE. Values are means ± SE (n=9). Statistically significant differences between treatments (P<0.05, Kruskal-Wallis test) are indicated by different letters.

**Table V-9: Effect of TE on mycelial growth of DSE in presence or not of tricyclazole.**

| Strains |                | Biomass (% of control)  |                         |                        |                        |                       |                         |                        |                        |                             |
|---------|----------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------|
|         |                | Zn (mM)                 |                         |                        | Cd (mM)                |                       | As (mM)                 |                        | Cu (mM)                |                             |
|         |                | 0                       | 1                       | 2                      | 0.2                    | 0.5                   | 1                       | 2                      | 0.2                    | 0.5                         |
| Me07    | None           | 100.0±3.1 <sup>a</sup>  | 104.5±3.7 <sup>a</sup>  | 95.6±1.7 <sup>a</sup>  | 88.7±0.8 <sup>b</sup>  | 77.5±0.7 <sup>c</sup> | 90.9±2.2 <sup>b</sup>   | 65.4±5.0 <sup>c</sup>  | 90.4±1.6 <sup>b</sup>  | 86.1±0.8 <sup>c</sup>       |
|         | + Tricyclazole | 100.0±6.9 <sup>ab</sup> | 93.7±5.6 <sup>abc</sup> | -                      | 76.3±4.8 <sup>c</sup>  | -                     | 84.4±7.1 <sup>bc</sup>  | -                      | 116.8±9.8 <sup>a</sup> | -                           |
| Pr30    | None           | 100.0±6.9 <sup>a</sup>  | 73.3±2.9 <sup>b</sup>   | 71.7±1.7 <sup>b</sup>  | 75.3±2.4 <sup>b</sup>  | 48.7±1.3 <sup>c</sup> | 61.7±1.1 <sup>b</sup>   | 55.2±1.9 <sup>c</sup>  | 57.9±6.9 <sup>b</sup>  | 69.5±4.4 <sup>c</sup>       |
|         | + Tricyclazole | 100.0±6.8 <sup>a</sup>  | 90.7±4.9 <sup>ab</sup>  | -                      | 79.6±7.0 <sup>b</sup>  | -                     | 99.0±11.1 <sup>ab</sup> | -                      | 104.8±7.2 <sup>a</sup> | -                           |
| Fe06    | None           | 100.0±3.1 <sup>a</sup>  | 102.1±0.8 <sup>a</sup>  | 86.6±3.6 <sup>ab</sup> | 83.±6.1 <sup>ab</sup>  | 61.2±8.8 <sup>b</sup> | 104.6±3.2 <sup>a</sup>  | 92.9±4.0 <sup>a</sup>  | 99.9±1.1 <sup>a</sup>  | 99.8±0.1 <sup>a</sup>       |
|         | + Tricyclazole | 100.0±0.5 <sup>a</sup>  | 90.0±3.1 <sup>ab</sup>  | -                      | 92.1±0.8 <sup>b</sup>  | -                     | 97.4±2.7 <sup>ab</sup>  | -                      | 70.0±3.4 <sup>a</sup>  | -                           |
| DSE1049 | None           | 100.0±5.5 <sup>a</sup>  | 92.3±9.4 <sup>a</sup>   | 70.0±5.0 <sup>b</sup>  | 34.3±2.2 <sup>c</sup>  | 30.1±2.6 <sup>c</sup> | 108.0±11.4 <sup>a</sup> | 105.1±8.1 <sup>a</sup> | 71.9±3.0 <sup>b</sup>  | 68.7±1.8 <sup>b</sup>       |
|         | + Tricyclazole | 100.0±4.8 <sup>a</sup>  | 74.7±6.8 <sup>b</sup>   | -                      | 56.5±4.2 <sup>c</sup>  | -                     | 105.7±5.5 <sup>a</sup>  | -                      | 64.6±4.2 <sup>bc</sup> | -                           |
| Pr29    | None           | 100.0±1.8 <sup>a</sup>  | 79.9±1.4 <sup>b</sup>   | 80.6±3.2 <sup>b</sup>  | 62.8±1.2 <sup>b</sup>  | 50.8±1.2 <sup>b</sup> | 83.2±1.3 <sup>b</sup>   | 81.6±3.1 <sup>b</sup>  | 82.6±0.7 <sup>b</sup>  | 73.0±1.4 <sup>b</sup>       |
|         | + Tricyclazole | 100.0±2.9 <sup>a</sup>  | 82.7±2.0 <sup>a</sup>   | -                      | 76.2±10.7 <sup>a</sup> | -                     | 90.4±8.9 <sup>a</sup>   | -                      | 89.2±10.7 <sup>a</sup> | -                           |
| Va46    | None           | 100.0±7.5 <sup>ab</sup> | 69.2±5.5 <sup>ef</sup>  | 73.1±1.4 <sup>de</sup> | 56.0±1.4 <sup>f</sup>  | 56.8±2.8 <sup>f</sup> | 85.7±2.9 <sup>cd</sup>  | 106.8±3.9 <sup>a</sup> | 90.2±3.9 <sup>bc</sup> | 101.8±2.6 <sup>a</sup><br>b |
|         | + Tricyclazole | 100.0±6.7 <sup>a</sup>  | 111.8±3.0 <sup>a</sup>  | -                      | 80.8±3.0 <sup>b</sup>  | -                     | 108.9±6.2 <sup>a</sup>  | -                      | 106.1±4.7 <sup>a</sup> | -                           |

Values are means ± SEs (n=9). Statistically significant differences between control (None) and treatment (+Tricyclazole) (P<0.05, Kruskal-Wallis test) are indicated by different letters.



**Figure V-18: Tolerance to TE of albino and melanin-inhibited strains.**

A, B: Growth of *Leptodonditium* sp. Me07 (WT) and their isogenic low-pigmented mutants (T17, T20 and T21) on As and Zn-amended media. C,D: Growth of *Cadophora* sp. Fe06 and *Leptodonditium* sp. Pr30 on As and Cd-amended media. Media were amended or not with tricyclazole (10 µg/ml). Pictures were taken after two weeks of growth. Representative plates are shown and the experiment was carried out three times with similar results.

The relationship between melanin content in hyphae and fungal tolerance to TE was studied by using strains with contrasted melanin contents. A first experiment was performed by adding tricyclazole in the growth medium of the six DSE strains in order to inhibit, as described above, their major melanin-biosynthetic pathway (**Table V-10, Figure V-18 C et D**). MIC values for As, Cd and Zn were not different between treated and non-treated strains. The sole exception was Va46, which displayed a MIC value of 20 mM for As in tricyclazole-amended media whereas it reached 30 mM in the absence of the inhibitor.

**Table V-10: Impact of tricyclazole on As, Cd and Zn tolerance of six DSE strains.**

| Strains  | Tricyclazole   | MIC (mM) |     |    |
|----------|----------------|----------|-----|----|
|          |                | As       | Cd  | Zn |
| Me07     | none           | 35       | 1.5 | 8  |
|          | + tricyclazole | 35       | 1.5 | 8  |
| Pr30     | none           | 10       | 0.3 | 9  |
|          | + tricyclazole | 10       | 0.3 | 9  |
| Fe06     | none           | 10       | 0.2 | 9  |
|          | + tricyclazole | 10       | 0.2 | 9  |
| DSE 1049 | none           | 35       | 0.3 | 9  |
|          | + tricyclazole | 35       | 0.3 | 9  |
| Va46     | none           | 30       | 0.3 | 10 |
|          | + tricyclazole | 20       | 0.3 | 10 |
| Pr29     | none           | 35       | 0.3 | 7  |
|          | + tricyclazole | 35       | 0.3 | 7  |

MIC is the minimum inhibitory concentration of metal that completely inhibited fungal growth. Media were amended or not with tricyclazole (10 µg/ml). The experiments were repeated three times with similar results. Cultures were performed for 15 days before analyses.

In a second experiment, we compared the melanin-producing reference wild-type *Leptodontidium* sp. Me07 strain with isogenic low-pigmented mutant strains (**Figure V-18 A and B, Table V-11**). Melanin content of these strains ranged from 0.23 to 0.48 mg/g DW which was significantly lower than that of the wild-type strain (0.89 mg/g DW). TE tolerance (expressed as MIC values) was no different between the wild-type and low-pigmented strains. When compared to that of the wild-type, the MIC value for Zn was however lower for strains T18 and T21. A similar finding was also observed for strain T21 with Cd tolerance (**Table V-11**). However, Pearson correlation coefficients showed no significant relationship between melanin content and TE tolerance within the isogenic mutants (As and Zn:  $P=0.89$ ; Cd,  $P=0.92$ ).

**Table V-11: TE tolerance and melanin content in mycelia of wild-type and isogenic low-pigmented strains.**

| Strain    | Melanin (mg/g DW)        | MIC (mM) |     |    |
|-----------|--------------------------|----------|-----|----|
|           |                          | As       | Cd  | Zn |
| Me07 (WT) | 0.89 ± 0.02 <sup>a</sup> | 30       | 1.5 | 8  |
| T16       | 0.29 ± 0.04 <sup>c</sup> | 30       | 1.5 | 8  |
| T17       | 0.44 ± 0.03 <sup>b</sup> | 30       | 1.5 | 8  |
| T18       | 0.39 ± 0.03 <sup>b</sup> | 30       | 0.8 | 8  |
| T19       | 0.43 ± 0.02 <sup>b</sup> | 30       | 1.5 | 8  |
| T20       | 0.23 ± 0.01 <sup>c</sup> | 30       | 1.5 | 8  |
| T21       | 0.48 ± 0.03 <sup>b</sup> | 30       | 0.8 | 6  |

MIC is the minimum inhibitory concentration of metal that completely inhibited fungal growth. Values are means ± SE (n=6). Statistically significant differences in melanin contents between strains (P<0.05, Kruskal-Wallis test) are indicated by different letters.

**Table V-12: Content of TE (mg/kg DW) in DSE mycelia treated or not by tricyclazole**

|         |                | Metal added in agar medium (mM)   |                       |                       |                        |
|---------|----------------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
|         |                | As (1)                            | Cd (0.2)              | Cu (0.2)              | Zn (1)                 |
| Strain  | Treatment      | Metal content in mycelia (ug/gDW) |                       |                       |                        |
|         |                | As                                | Cd                    | Cu                    | Zn                     |
| Me07    | none           | 297 ± 5 <sup>b</sup>              | 124 ± 3 <sup>a</sup>  | 544 ± 8 <sup>a</sup>  | 109 ± 1 <sup>b</sup>   |
|         | + tricyclazole | 321 ± 4 <sup>a</sup>              | 103 ± 2 <sup>b</sup>  | 465 ± 3 <sup>b</sup>  | 865 ± 7 <sup>a</sup>   |
| Pr30    | none           | 228 ± 1 <sup>a</sup>              | 277 ± 6 <sup>a</sup>  | 541 ± 15 <sup>a</sup> | 357 ± 4 <sup>b</sup>   |
|         | + tricyclazole | 246 ± 10 <sup>a</sup>             | 87 ± 4 <sup>b</sup>   | 476 ± 12 <sup>b</sup> | 898 ± 23 <sup>a</sup>  |
| Fe06    | none           | 125 ± 1 <sup>a</sup>              | 348 ± 2 <sup>a</sup>  | 360 ± 4 <sup>a</sup>  | 907 ± 2 <sup>a</sup>   |
|         | + tricyclazole | 102 ± 0 <sup>a</sup>              | 101 ± 3 <sup>b</sup>  | 364 ± 1 <sup>a</sup>  | 665 ± 17 <sup>b</sup>  |
| DSE1049 | none           | 195 ± 2 <sup>a</sup>              | 344 ± 4 <sup>a</sup>  | 324 ± 1 <sup>a</sup>  | 683 ± 2 <sup>b</sup>   |
|         | + tricyclazole | 149 ± 7 <sup>b</sup>              | 117 ± 6 <sup>b</sup>  | 319 ± 8 <sup>a</sup>  | 717 ± 3 <sup>a</sup>   |
| Pr29    | none           | 344 ± 11 <sup>a</sup>             | 379 ± 6 <sup>a</sup>  | 458 ± 12 <sup>b</sup> | 909 ± 34 <sup>b</sup>  |
|         | + tricyclazole | 151 ± 5 <sup>b</sup>              | 120 ± 3 <sup>b</sup>  | 579 ± 24 <sup>a</sup> | 1354 ± 13 <sup>a</sup> |
| Va46    | none           | 748 ± 2 <sup>a</sup>              | 524 ± 10 <sup>a</sup> | 433 ± 14 <sup>b</sup> | 802 ± 27 <sup>b</sup>  |
|         | + tricyclazole | 222 ± 1 <sup>b</sup>              | 117 ± 0 <sup>b</sup>  | 486 ± 9 <sup>a</sup>  | 1397 ± 32 <sup>a</sup> |

Values are means ± SE (n=6). Cultures were performed for two weeks before harvest. Statistically significant differences between tricyclazole treated-mycelia and control mycelia for a given strain (P<0.05, Kruskal-wallis test) are indicated by different letters.

### 3.3.4. Relationship between mycelial melanin concentration and TE accumulation

The accumulation of TE by tricyclazole-treated or non-treated mycelia was studied with colonies grown for two weeks in the presence of As, Cd, Cu and Zn. Results showed that, in the presence or absence of tricyclazole, As and Cu accumulation was strain-dependent. However, Cu contents in the treated-mycelia of Me07, Pr30, Pr29, and Va46 varied for less than 25% when compared to the non-treated mycelia. Under tricyclazole treatment, As content increased by 8% for Me07, and decreased by 24, 56, and 70% for DSE 1049, Pr29, and Va46, respectively (**Table V-12**). Zn content was significantly higher in tricyclazole-treated mycelia when compared to non-treated mycelia. The only exception was Fe06 for which Zn content was reduced by 27%. Whatever the strain, Cd content decreased in tricyclazole-treated mycelia when compared to non-treated mycelia. It decreased moderately by 17% for Me07. However, Cd content was more markedly reduced for the other five strains. It was indeed reduced between 66% (DSE 1049) to 78% (Va46).

## 3.4. Discussion

### 3.4.1. Melanin biosynthetic pathways in *Leptodontidium* sp., *Cadophora* sp., and *P. mustea*

The present study investigated melanin biosynthesis in six DSE strains belonging to *Leptodontidium* sp., *Cadophora* sp. and *Phialophora mustea*. *In silico* studies were first performed to identify putative genes/proteins involved in the biosynthetic pathways of melanin. In the absence of a released genome for *Phialophora mustea*, we focused our study on the analysis of *Leptodontidium* sp. and *Cadophora* sp. genomes. We considered three melanin-specific biosynthetic pathways (pyomelanin, DHN- and DOPA-melanin) that have been already identified in Ascomycota (Gessler *et al.* 2014). The enzymes catalyzing the different steps of melanin synthesis, as well as the corresponding encoding genes from *Aspergillus fumigatus*, *Agaricus bisporus*, *Aeromonas media* and *Penicillium chrysogenum* were previously identified (Tsai *et al.* 1999; Weijn *et al.* 2013; Vasanthakumar *et al.* 2015; Wang *et al.* 2015). The presence of orthologous genes encoding enzymes from the three pathways were identified from the genomes of *Leptodontidium* sp. and *Cadophora* sp.. Moreover, RNA-seq data associated to the genomic data revealed that all genes were transcribed in both fungi. Altogether, these results suggest that *Leptodontidium* sp. and *Cadophora* sp. have the genomic potential to synthesize the three different forms of melanin.

However several authors reported that several enzymes from the melanin pathways are not melanin-specific. Instead, they could be involved in the synthesis of numerous polyketides as well as in a large class of secondary metabolites including melanin (Baldrian 2006; Fujieda *et al.* 2012). Hence, although the *in silico* study provided essential data, these results need to be completed by additional information. To this purpose, we used a

pharmacological approach to demonstrate the existence of the three major pathways involved in melanin synthesis in the three DSE species. Three metabolic inhibitors were consequently used (kojic acid, tricyclazole and sulcotrione) and melanin content was quantified. Extracted compounds displayed the same characteristics as those from synthetic melanin. The black extracted compounds were indeed bleached in the presence of  $H_2O_2$ , precipitated with  $FeCl_3$  and did not solubilize in water and organic solvents but solubilized in NaOH (Zhan *et al.* 2011). We extracted from 0.9 (Me07) to 6.7 (Fe06) mg of melanin per gram of dry mycelium. These data are therefore consistent with previous melanin quantification in the DSE *Gaeumannomyces cylindrosporum* (mean value of 1.8 mg/g DW) and *E. pisciphila* (9.1 mg/g DW) (Zhan *et al.* 2011; Ban *et al.* 2012).

In our study, sulcotrione did not affect melanin content for all the strains suggesting that pyomelanin is either absent or is a minor type of melanin in the three DSE species. Low concentrations of tricyclazole were highly effective in reducing the total content of melanin. High concentrations of tricyclazole (100  $\mu$ g/ml) inhibited fungal growth. Likewise, previous studies reported toxicity values ranging from 20 (*Exophiala pisciphila*) to 216  $\mu$ g/ml (*Magnaporthe oryzae*) (Kunova *et al.* 2013; Zhan *et al.* 2016). Generally, it is accepted that ascomycetous fungi produce allomelanin from the DHN-melanin pathway whereas basidiomycetous fungi produce GDHB- and DOPA-melanin (Gessler *et al.* 2014). However, our results show that kojic acid also significantly reduced the black pigmentation of *Cadophora* sp. and *Phialophora mustea*. Moreover, when both tricyclazole and kojic acid were used simultaneously, melanin content was significantly more reduced compared to the individual inhibitory treatments. These observations suggest that these two DSE species could also produce melanin through the DOPA-melanin pathway. The activity of several melanin pathways was previously described for several fungi. For instance, *A. fumigatus* was reported to synthesize pyomelanin and DHN-melanin whereas *A. bisporus* produces both DOPA- and GDHB-melanin (Youngchim 2004; Weijn *et al.* 2013). However in our study, the use of both inhibitors did not completely abolish melanin production. These results suggest either that another type of melanin was synthesized (e.g. catechol, GDHB), or that melanin precursors such as flaviolin, 2-HJ, 3-HJ accumulated following the addition of tricyclazole and absorbed at the same wavelength as melanin. Red/brown pigments accumulated in mycelia and diffused also in the agar media in the tricyclazole treatment. Further experiments will be needed to determine the nature of these pigments. It is also possible that another type of melanin (e.g. catechol, pheomelanin) could be specifically produced by spores as suggested previously by (Henson, Butler and Day 1999; Pal, Gajjar and Vasavada 2013).

In conclusion, our data suggest that both DHN- and DOPA-melanin could co-occur and that DHN-melanin is the main pathway for melanin synthesis in *Cadophora* sp. and *Phialophora mustea*. The DSE *E. pisciphila* also produce DHN melanin (Zhan *et al.* 2011). The production of DOPA-melanin by *Leptodontidium* sp. remains however to be demonstrated. The non-inhibitory effect of kojic acid might be explained by a too low proportion of DOPA-

melanin over the total pool of melanin. The present data further extend the knowledge of melanin production by other DSE species of this environmentally important group of highly melanized fungi.

### **3.4.2. TE stress and melanin production**

Melanized fungi are often found in degraded or polluted area (Fogarty and Tobin 1996; Gessler, Egorova and Belozerskaya 2014). Based on these observations, several authors suggested a relationship between TE addition and melanin content in hyphae (Fogarty and Tobin 1996; Zhan *et al.* 2011; Ban *et al.* 2012). Under high concentrations of TE, we observed that melanin content was strain- and TE species-dependent. Indeed, we reported both an increase and a decrease of melanin production in response to different TE. For instance, Cu increased melanin biosynthesis of the two *Leptodontidium* sp. strains and *P. mustea* Va46. Similar observations have been frequently reported (Gadd and de Rome 1988; Caesar-Tonthat *et al.* 1995; Fogarty and Tobin 1996; West and Strohfus 1997). Cu-induced melanin production could be associated to the role of Cu as a cofactor of enzymes such as laccases and tyrosinases involved in the biosynthetic pathways of melanin (Bell and Wheeler 1986; Eisenman and Casadevall 2012). Conversely, Zn decreased melanin content by the two *Leptodontidium* sp. strains, Fe06 and Pr29. In previous studies, melanin production by *Aureobasidium pullulans* was decreased by Mn, unaffected by Mg and Zn, and increased by Cu, Co, Cd, Pb, and Fe (Caesar-Tonthat *et al.* 1995; West and Strohfus 1997). Conversely to Mn, Cu decreased or unaffected melanin production by *Yarrowia lipolytica* (Ito *et al.* 1998).

### **3.4.3. Melanin content and TE tolerance**

Accumulation of melanin in cell walls is common among fungi. It has been suggested that this function is indispensable to survive in TE-stress conditions (Fogarty and Tobin 1996; Ban *et al.* 2012; Gessler *et al.* 2014). This hypothesis has been generally accepted but experimental confirmation is still lacking. To investigate this point, we adopted two experimental strategies. We first evaluated the level of TE tolerance for six DSE strains under DHN-melanin inhibiting conditions. This pathway was particularly targeted because it represents the main pathway of melanin in the fungal species we studied. The concentration of tricyclazole that we used significantly decreased melanin content in mycelia but did not affect fungal growth. Tricyclazole treated-strains did not show altered tolerance towards Zn, Cd, Cu, and As when compared to the untreated controls. These results suggest that the tolerance level to TE is not melanin-dependent. We further confirmed this finding in *Leptodontidium* sp. by studying the tolerance level to As, Cd, Cu and Zn of low-pigmented strains. Generally, the tolerance level to the different TE was the same between low-pigmented strains and their isogenic wild-type strain. Frederick *et al.* (1999) also reported that the wild-type pigmented strain and their isogenic albino mutants of *Gaeumannomyces graminis* had the same tolerance to Cu and Cd. Likewise, comparisons of Ni and Co tolerance between pigmented and non-pigmented strains of *A. nidulans* lead to

the same conclusions (Tripathi and Srivastava 2007a, 2007b). Taken together, these results provide direct evidence that melanin is not the major mechanism of TE tolerance in *Leptodontidium* sp., *Cadophora* sp. and *Phialophora mustea*. Other intra- or extra-cellular mechanisms must occur. This could include either non-enzymatic or enzymatic efficient detoxifying processes against TE-induced ROS, as reported for *E. pisciphila* and *G. cylindrosporus* (Ban *et al.* 2012; Zhao *et al.* 2015). Moreover, efflux transport systems, sequestration into vacuoles, or intracellular chelation usually represent the major components of metal tolerance in other fungi (Daghino, Martino and Perotto 2016; Gube 2016). Such mechanisms have also been proposed from transcriptomic data of mycelia exposed to TE in the DSE fungi *E. pisciphila* and *Cadophora finlandica* (Gorfer *et al.* 2009; Ban *et al.* 2012; Zhao *et al.* 2015), but the identification and the functional characterization of the genes/proteins that are involved have not been performed yet.

#### **3.4.4. Melanin content and TE accumulation**

Numerous studies reported the ability of melanin to bind different metal ions (Fogarty and Tobin 1996; Hong and Simon 2007). We showed, in the present study, that the six studied strains mainly produced DHN-melanin. The monomer unit contains two hydroxyl radicals that could bind metal cations, and free hydroxyl radicals are still present in the cross-linked DHN polymer. In order to evaluate the role of melanin in TE-accumulation by DHN-producing DSE fungi, we compared TE accumulation between tricyclazole-treated or untreated mycelia. Analyses showed that accumulation of As and Cu was strain-dependent. In agreement with Siegel *et al.* (1990) and Gadd, (1981), we report that accumulation of Cd was more important by melanized mycelium. Conversely, Zn accumulated more in low-pigmented strains when compared to the non-treated strains. This observation was previously reported for Cu in *G. graminis*. In this study, the authors hypothesized that melanin precursors such as flaviolin, 2-Hydroxy-juglone and 3-Hydroxyjuglone could bind TE (Caesar-Tonthat *et al.* 1995). In our study, tricyclazole treatments induced the accumulation of red/brown pigments that could be responsible for the high Zn accumulation by mycelia. The variability of TE biosorption by between strains could be due to the preferential affinity of melanin binding sites and to competition for the fixation sites (Fogarty and Tobin 1996; Hong and Simon 2007).

However, melanin only represents a minor proportion of fungal biomass (0-5% of the mass of cell walls) compared to chitin, chitosans and glucans which dominate (respectively 8-39, 5-33, and 6-56%) (Siegel *et al.* 1990). These latter compounds are also well known in TE adsorption and could participate in the reduction of TE influx into cells (Bellion *et al.* 2006; Gube 2016). For instance, Lanfranco *et al.* (2002) reported a significant increase in the content of chitin by an ericoid mycorrhizal fungus when exposed to TE. Although melanin represents a small proportion of the total fungal biomass, the different accumulation patterns observed for Cd between tricyclazole- and untreated-mycelia suggest that melanin content could be a major player in Cd adsorption by cell walls. Short-term uptake

experiments could be done to compare the binding capacity of tricyclazole-treated mycelia *versus* untreated mycelia. Cell wall preparations could also be achieved from these contrasted culture conditions and further analysed for their Cd accumulation properties. More generally, further ICP-AES analyses should be performed with the low-pigmented strains of *Leptodontidium* to provide further evidence of melanin-dependent TE accumulation by DSE mycelia.

In conclusion, we have shown that DSE mainly produce 1,8-dihydroxynaphtalene (DHN) melanin and several of them could also produce 3,4-dihydroxyphenylalanin (DOPA) melanin. Using albinos strains of *Leptodontidium* sp. and melanin biosynthesis inhibitor, we conclude that melanin did not provides protection to DSE studied cells against As, Cd, Cu and Zn. We speculate that the tolerance was achieved through another mechanisms such as chelation or sequestration in cells. At the opposite, we suggested that melanin was involved in TE accumulation. To fully understand the proposed mechanisms, further studies are needed.



## **VI. Discussion générale et conclusions**

---



L'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire s'inscrit dans le cadre général du projet régional LORVER, qui vise à créer une filière de production de biomasse végétale à usage non-alimentaire par la valorisation de sites dégradés et de sous-produits industriels délaissés. Dans ce projet, les travaux de cette thèse avaient pour but d'apporter des connaissances visant à mieux comprendre les interactions plantes-champignons dans les sols pollués en vue de l'utilisation potentielle de ces microorganismes en phytomanagement des sols pollués par les ETM. Nous avons porté une attention particulière à une classe de champignons endophytes racinaires : les endophytes bruns septés (DSE). Trois questions majeures ont structuré cette thèse :

- *Quelles sont les caractéristiques des DSE provenant de sols pollués par des ETM ? Sont-ils capables de s'associer avec des plantes et sont-ils compatibles avec d'autres souches fongiques et si oui, quel est leur effet sur ces organismes ?*
- *Spécifiquement, dans le cas de sols pollués par des ETM, (i) quel est l'effet de l'inoculation de champignons DSE sur la croissance de plantes (ii) Comment interagissent une souche DSE et une souche mycorhizienne sur la croissance de ray-grass ?*
- *Quels sont les mécanismes permettant aux DSE de tolérer les ETM ? Plus spécifiquement, quels sont les gènes impliqués ? et quelle est la part de la mélanine dans ce phénomène ?*

Chaque questionnement a ainsi fait l'objet d'un chapitre de ce mémoire de thèse.

## 1. L'identification et la caractérisation métabolique de souches de DSE.

Des racines de peupliers ont été prélevées sur les dispositifs expérimentaux de Pierrelaye (Région Parisienne), Leforest et Fresnes-sur-Escaut (Nord) en octobre 2012 (thèses de L. Lacercat et J. Foulon). Cette campagne a permis l'isolement de souches fongiques mycorhiziennes, endophytiques et de sept souches DSE. L'étude d'une partie des souches endophytiques et mycorhiziennes a fait l'objet d'une publication en collaboration avec Laurence Lacercat, et présentée en **Annexe 1**, tandis que les souches DSE ont été étudiées en détail dans ce manuscrit. Ces dernières ont été identifiées comme appartenant aux Ascomycètes, à l'ordre des *Helotiales* et aux genres ***Leptodontidium*, *Cadophora*, *Phialocephala* et *Phialophora***.

Bien que les DSE soient abondants dans de très nombreux écosystèmes, nos connaissances sur leur rôle écologique sont limitées. Ces lacunes concernent notamment leur métabolisme et leur impact sur les plantes hôtes. Dans le chapitre III-1 nous avons caractérisé taxonomiquement et métaboliquement sept souches DSE. Toutes les souches testées dégradent des sources **de carbone simples** (e.g. glucose, xylose), et **polymérisées** (e.g. saccharose, amidon). Ces observations appuient de précédentes études suggérant que les DSE possèdent des capacités saprophytiques permettant de dégrader la matière

organique (Mandyam *et al.* 2010; Knapp et Kovács 2016). En outre, la dégradation des composés tels que les xylanes et la cellulose suggère que ces DSE pourraient digérer les parois des cellules végétales, et ainsi pénétrer dans ces dernières (Caldwell *et al.* 2000).

En conditions contrôlées, chaque souche a colonisé le ray-grass, le bouleau et l'eucalyptus en formant des structures de type **microsclérotés et des hyphes brun septés**. Plus précisément, nous avons relevé la présence de trois types de microsclérotés (*brain-like*, *loosely-packed* et *fully-packed*) dont la répartition ne semble **reliée ni au type de plantes colonisées, ni à la souche fongique, ni au type de tissu racinaire colonisé** (*e.g.* cortex, cylindre central). Cependant les études traitant du rôle, de la diversité et de la morphologie des hyphes septés et des microsclérotés sont rares. Yu *et al.* (2001) ont étudié la morphologie et le rôle des microsclérotés de *P. fortinii* : une accumulation de glycogène et de polyphosphates dans ces structures a été observée, mais aucun rôle n'a pu être déterminé. Ce domaine reste donc à étudier :

- Afin de vérifier si la répartition des microsclérotés est « aléatoire » ou « structurée » des inoculations d'un nombre important de plantes (*e.g.* herbacées et ligneuses, monocotylédones et dicotylédones) par une souche pourraient être réalisées. Des observations de coupes **longitudinales et transversales** des racines pourrait mettre en évidence une éventuelle répartition des sclérotés en fonction du type de plante ou de la zone racinaire pour une souche donnée.
- L'utilisation d'isotopes marqués de P, C, N ou l'utilisation de la tomographie par positron (PET-SCAN), communément utilisée en médecine, permettrait d'étudier le rôle des microsclérotés (*e.g.* zone d'échange, d'ancrage ou de réserve).
- D'autre part, la **miniaturisation** des protocoles est une approche nécessaire au criblage de la métabolisation d'un plus grand nombre de substrats carbonés, azotés ou phosphatés. L'utilisation de plaques biologiques adaptées pour les champignons représente un outil peu onéreux, viable et très informatif pour la caractérisation du métabolisme fongique. Par ces techniques, Knapp and Kovács (2016) ont récemment pu caractériser métaboliquement quinze souches de DSE en s'intéressant à 114 paramètres (95 sources de carbones et 19 enzymes dont certaines impliquées dans le métabolisme carboné).

L'inoculation des plantes par les DSE génère des réponses souches- et plantes-dépendantes variant du **parasitisme** (une observation) au **mutualisme** (onze observations) (**Figure VI-1**, bleu). Particulièrement, suite à l'inoculation par ***Phialophora mustea* Pr27 et *Leptodontidium* sp. Pr30**, des augmentations de croissance de l'ordre de **2,5 à 6 fois** par rapport aux plantes témoins ont été observées. Les souches de *Cadophora* sp. Fe06, *Leptodontidium* sp. Me10, *Leptodontidium* sp. Pr30, *P. mustea* Pr27 et *P. mustea* Pr29 ont également stimulé la croissance du tabac sans aucun contact physique (**Figure VI-1**, vert). L'identification des composés organiques volatiles (COV) émis a été réalisée par SPME-

GCMS pour *Cadophora* sp. Fe06 et *Leptodontidium* sp. Pr30. Cette analyse **qualitative** a mis en évidence différents composés dont certains ont été préalablement identifiés et ayant des fonctions **phytostimulantes ou anti-phytopathogènes** (e.g. 2 et 3-méthyl-butanol, chamigrène). Toutefois, l'émission de ces COV semble **souche-dépendante** et demande à être affinée par l'identification des COV produits par **d'autres souches**. D'autre part, tous les DSE étudiés synthétisent des molécules indoliques en présence de tryptophane dans leur milieu de culture (**Figure VI-1**, violet). Ces molécules, et plus particulièrement l'auxine, sont connues pour jouer un rôle important dans la croissance et notamment dans l'élongation et la ramification racinaire (Sukumar *et al.* 2013). Cependant, l'étude des dérivés indoliques et l'identification des COV ont été réalisées en l'absence de plantes-hôtes, ainsi le rôle, ou la part de ces composés dans la promotion de croissance végétale reste encore à vérifier.

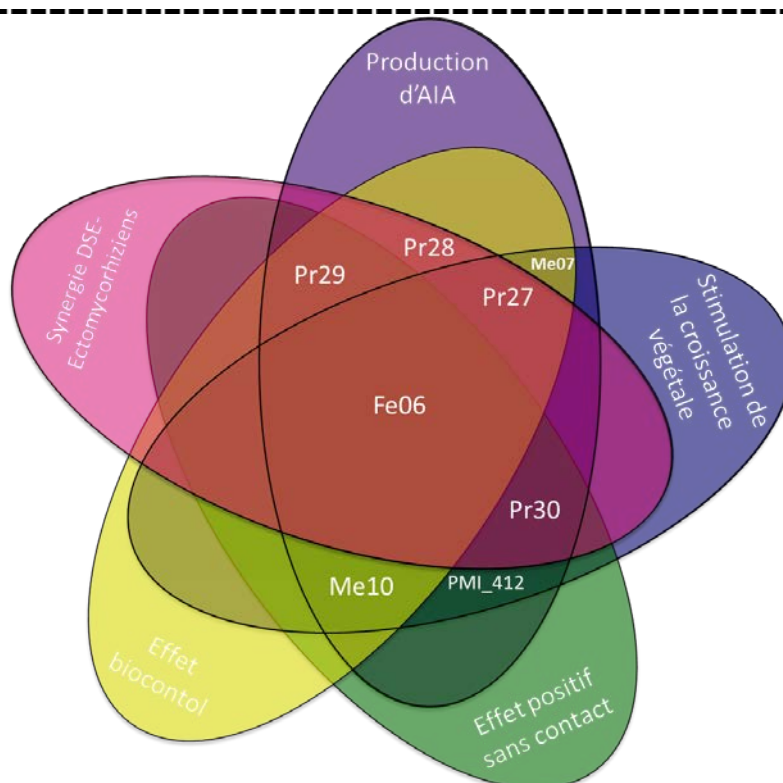
- Dans le but de comprendre le rôle des dérivés indoliques, et/ou des COV sur la croissance végétale, chacun de ces composés pourrait être ajouté **individuellement ou en mélange** à une plante (Sirrenberg *et al.* 2007; Naznin *et al.* 2013).
- L'utilisation de champignons mutants incapables de produire ces composés ou bien, de plantes insensibles à ces derniers permettrait de comprendre le rôle et la part de ces composés dans la croissance des plantes (Crutcher *et al.* 2013; Turgeman *et al.* 2016).
- Afin de dissocier le rôle du CO<sub>2</sub> de celui des COV, des expériences utilisant un absorbeur de CO<sub>2</sub> pourraient être mises en place. Toutefois, afin de ne pas inhiber les capacités photosynthétiques de la plante, le dispositif devra être compartimenté afin de ne séquestrer que le CO<sub>2</sub> émis par le partenaire fongique (Naznin *et al.* 2013).
- Les COV et les composés indoliques secrétés par les microorganismes peuvent jouer un rôle important dans la protection des plantes contre les stress biotiques et abiotiques. Ainsi, il serait intéressant d'étudier et de quantifier l'émission de ces molécules en présence de différents stress.
- Seuls les dérivés indoliques ont été analysés dans ce manuscrit. Cependant, différents auteurs ont mis en évidence que certains endophytes sécrètent des cytokinines et des gibbérellines pour stimuler la croissance végétale en conditions stressantes (e.g. stress salin ou hydrique) (Khan *et al.* 2011; Waqas *et al.* 2012) ou non (Khan *et al.* 2012).

*In situ*, les DSE ne sont pas les seuls champignons présents dans les racines, ainsi nous avons également souhaité caractériser le type d'interaction s'établissant d'une part entre différents DSE, et d'autre part entre les DSE et des champignons ECM (*H. cylindrosporum* et *P. involutus*), pathogènes (*H. annosum*) ou des oomycètes (*P. citricola*, *P. ultimum*). Les relations observées varient du **parasitisme** à la **synergie** et font intervenir

différents mécanismes dont des **variations morphologiques** (e.g. pigmentation, déformation) et des **secrétions de métabolites**. Au travers de ces résultats nous avons également pu mettre en lumière que certaines DSE diminuent la croissance des souches phytopathogènes (**Figure VI-1**, jaune), tandis que d'autres forment des associations synergiques avec des champignons ECM (**Figure VI-1**, rose). Cette expérimentation a au final permis d'étudier un grand nombre d'interactions (110 couples testés).

Au final, le recensement de l'ensemble des capacités PGP des DSE étudiés est résumé sous forme d'un diagramme de Venn présenté dans la **Figure VI-1**. *Cadophora* sp. Fe06 possède l'intégralité des activités testées tandis que *P. mustea* Pr29, *P. mustea* Pr27, *Leptodontidium* sp. Pr30 et *Leptodontidium* sp. Me10 présentent quatre des cinq paramètres et *Leptodontidium* sp. Me07, *Leptodontidium* sp. PMI\_412 et *Phialocephala fortinii* Pr28 ne possèdent que trois de ces activités PGP. De surcroît, en tenant compte de l'intensité des promotions de croissance engendrées par chacune des souches sur le ray-grass, l'eucalyptus et le bouleau, il ressort que les souches les plus prometteuses pour la promotion de croissance sont *Cadophora* sp. Fe06, *P. mustea* Pr27 et *Leptodontidium* sp. Pr30.

- Une caractérisation des métabolites émis lors des différents tests cités préalablement pourrait être réalisée via des analyses de types *metabolites profiling* (Schliemann *et al.* 2008) ou par l'analyse du sécrétome (Vincent *et al.* 2012) des DSE. Ces résultats permettraient de dresser un inventaire des protéines et métabolites sécrétés par les souches en présence de stress biotiques ou abiotiques et/ou en présence de plantes. De telles approches ont d'ores et déjà été appliquées au DSE *H. oryzae* dont le sécrétome a été comparé à celui du phytopathogène *M. oryzae* (Xu *et al.* 2014). Néanmoins, ces approches n'ont pas encore été appliquées à des DSE, en présence de plantes, ou en conditions de stress biotiques ou abiotiques.
- D'autre part, les tests menés dans cette première partie sont préliminaires et les dispositifs utilisés sont simples et peu représentatifs des conditions *in situ*. Or, il a été montré que (i) les conditions environnementales (e.g. le climat, la compétition avec l'inoculum endogène), le type et la présence de plantes sont des facteurs influençant de manière importante le comportement des DSE (Jumpponen et Trappe 1998b; Newsham 2011; Reininger et Sieber 2012). Ainsi, des expérimentations de type **mésocosmes impliquant des plantes-sols-consortia** de champignons seront nécessaires pour confirmer nos résultats.



**Figure VI-1 : Diagramme de Venn résumant l'ensemble des capacités PGP relevées chez chacune des souches DSE étudiées.**

*P. indica* a été retiré de cette analyse car il n'appartient pas aux DSE.

Dans un dernier temps, la capacité de tolérance des différentes souches isolées a été 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.* 2006; Jourand *et al.* 2010). Toutefois, notre faible nombre d'échantillons ne nous a pas permis d'observer des relations genre- ou origine- dépendants, mais nous avons mis en évidence une résistance **souche- et élément- dépendants**. Ces observations sont en concordance avec les résultats de Zhang *et al.* (2008) et de Ban *et al.* (2012) traitant tous deux d'isolats de DSE.

- ✿ Afin d'obtenir des souches tolérantes au ETM, une des approches possibles serait **l'acclimatation *in vitro*** des souches. Ce procédé consiste à réaliser des cultures *in vitro* successives sur un gradient d'ETM afin d'augmenter progressivement la tolérance des souches (Tripathi et Srivastava 2007a).
- ✿ Pour compléter ces informations, il serait souhaitable de s'intéresser aux capacités **de mobilisation et d'accumulation** des ETM des souches de DSE.

En bilan, ce premier chapitre a permis de caractériser chacune des souches isolées de racines de peuplier se développant en présence d'ETM. Ces connaissances permettront à

l'avenir de sélectionner facilement et rapidement les souches à utiliser suivant les besoins des expériences à réaliser. De plus, trois souches (***Cadophora* sp. Fe06**, ***P. mustea* Pr27** et ***Leptodontidium* sp. Pr30**) ont montré leurs capacités à promouvoir significativement et efficacement la **croissance végétale** ainsi qu'à **tolérer les ETM**. Des tests supplémentaires permettront de conclure si ces souches peuvent être un atout en tant qu'inoculum pour des activités d'horticulture, de foresterie ou de phytomanagement.

## 2. Impact des DSE sur la croissance de plantes hôtes en présence d'un stress métallique

L'objectif du chapitre IV était de sélectionner une ou plusieurs souches permettant d'améliorer la croissance de plantes en présence d'ETM. Pour tenir compte de la variabilité liée à l'espèce végétale et aux propriétés édaphiques, deux plantes et deux sols ont été utilisés. *Cadophora* sp Fe06, *Leptodontidium* sp. Pr30 et *P. mustea* Pr27 ont colonisé le bouleau et le peuplier et leur colonisation **n'a pas été influencée ni par le choix de l'espèce végétale ni par celui du sol**. A l'inverse de la colonisation, la **promotion de croissance est dépendant du sol considéré** et n'a été observée que dans un seul substrat. Selon certains auteurs, la teneur en carbone, en azote organique et le pH influenceraient la relation s'établissant entre le DSE et la plante (Jumpponen et Trappe 1998b; Jumpponen *et al.* 1998; Mayerhofer *et al.* 2013).

La promotion de croissance engendrée par les DSE a pu être accompagnée de l'augmentation **du transfert de certains éléments majeurs** (e.g. K, P). En présence de la souche ***Leptodontidium* sp. Pr30**, la teneur en **chlorophylles a été augmentée** et la souche ***Cadophora* sp. Fe06 a diminué la concentration en Cd dans les parties aériennes** du bouleau. Cependant, **aucun de ces mécanismes n'est généralisable à l'ensemble des souches** étudiées. La compréhension de la promotion de croissance reste donc encore à étudier plus attentivement.

- Afin de vérifier l'étendue de ces résultats, l'inoculation avec ces souches devra être réalisée sur un plus grand nombre de plantes et de sols différents.
- Bien que coûteuse, l'utilisation de techniques d'étude du transcriptome (**puces à ADN ou RNA-seq**), peut être un outil pour identifier quels gènes ou quelles familles de gènes sont surexprimés ou sous-exprimés en présence de DSE. Ces approches ont notamment été utilisées pour évaluer l'impact du DSE *Microdochium* sp. sur *A. thaliana* et de *Picea abies* sur le métabolisme de *Phialocephala subalpina* (Mandyam et Jumpponen 2014; Reininger et Schlegel 2016). Aucune étude comparable n'a cependant porté sur des plantes colonisées par des DSE en présence d'ETM.

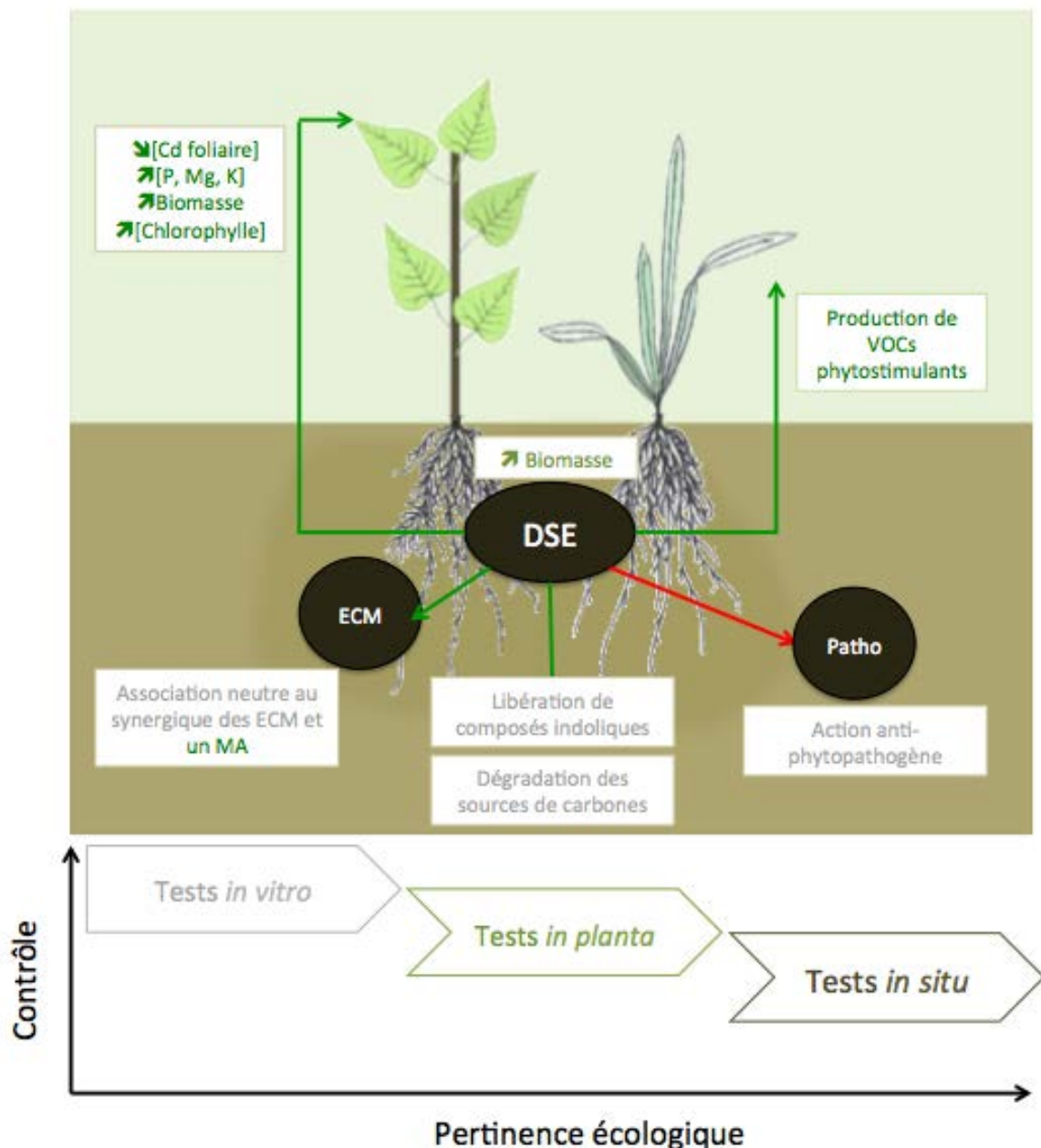
Avec l'objectif d'utiliser des DSE en phytomanagement de sols pollués par les ETM nous avons étudié la possibilité de créer des associations de souches fongiques associant les capacités PGP de différentes souches. L'établissement d'un tel inoculum nécessite de prendre en compte de nombreuses considérations. En effet des compétitions pour l'espace

ou pour les ressources nutritives peuvent s'établir entre deux champignons possédant des vitesses de croissance et des modes de vie différents (Zadworny *et al.* 2004). Précédemment, nous avons mis en évidence que certains DSE peuvent stimuler la croissance de souches de champignons ECM *in vitro*. Cependant une telle expérimentation n'a pu être menée avec des souches de champignons MA, ces derniers se prêtant mal aux cultures *in vitro*. La possibilité d'associer les DSE et les champignons MA a donc été testée directement au travers d'une expérimentation *in planta* (ray-grass) alliant le DSE *Cadophora* sp. Fe06 au champignon endomycorhizien *F. mosseae*. Le ray-grass était colonisé à la fois par *Cadophora* sp. Fe06 et par *F. mosseae*. La colonisation fongique et la croissance du ray-grass sont restées inchangées suivant les trois modalités (DSE seul, champignon MA seul et co-inoculation). Précédemment, de tels résultats ont été rapportés entre *Phialocephala glaciensis* et *Gigaspora rosea* mais le paramètre pollution n'avait pas été pris en compte (Della Monica *et al.* 2015).

L'inoculation par *F. mosseae* a stimulé la production de biomasse aérienne du ray-grass, a **augmenté la concentration en P foliaire et l'activité de la phosphatase alcaline dans le sol** tandis que la souche *Cadophora* sp. Fe06 **n'a pas eu d'effet** sur ces paramètres. D'autre part, le consortium a permis une **diminution de la concentration du Cd foliaire**.

De plus, le développement d'une méthode de quantification par qRT-PCR pour mesurer le taux de colonisation racinaire par les deux champignons nous a permis d'obtenir un outil fiable, offrant différents avantages dont (i) un gain de temps et de précision et (ii) la possibilité de s'affranchir du biais engendré par l'observateur lors de mesures par microscopie.

- La réalisation de qRT-PCR devra être réalisée sur le sol rhizosphérique du ray-grass afin de comprendre si l'absence d'activité phosphatase alcaline dans le traitement « DSE » est liée à l'absence de mycélium extra-racinaire ou à l'absence de stimulation de cette activité chez le DSE utilisé.
- D'autres associations fongiques, d'autres plantes, et d'autres environnements devront être testés afin de caractériser plus finement ces phénomènes d'interactions.
- Après quelques adaptations, la méthode de qRT-PCR développée dans cette thèse pourra être étendue aux études *in situ* afin de pouvoir comparer l'abondance relative de différents types de champignons (*e.g.* MA, DSE) dans un même échantillon.



**Figure VI-2 : Schéma récapitulatif des mécanismes utilisés par les DSE pour promouvoir la croissance des plantes hôtes.**

En gris sont représentés les résultats obtenus lors d'expériences *in vitro*, tandis qu'en vert sont représentés ceux issus d'expériences *in planta*. La pertinence écologique de chacune de ces expérimentations est exprimée en fonction du niveau de contrôle de l'expérience. Les crochets traduisent la notion de concentration, tandis que ECM, MA et Patho représentent respectivement les souches fongiques ectomycorhiziennes, endomycorhiziennes et pathogènes.

L'ensemble des études plantes-DSE réalisée dans ce manuscrit souligne que l'inoculation par certaines souches de DSE peut jouer un rôle important dans la **croissance** des plantes ligneuses et herbacées, sous certaines conditions environnementales. A partir d'expérimentations à différentes échelles nous avons mis en évidence certains **mécanismes** pouvant intervenir dans la promotion de croissance (**Figure VI-2**). Toutefois ces résultats ont

été obtenus sur des durées de croissance végétale **très courtes** par rapport à la **longévité réelle** des plantes et dans des conditions de croissance ne prenant pas en compte **les contraintes climatiques et/ou les conditions de stress nutritifs ou de compétitions biotiques**. Ces expériences demandent donc à être poursuivies, pour pouvoir extrapoler ces résultats à des conditions *in situ* (**Figure VI-2**). De plus, **une inoculation à l'échelle de la parcelle** nécessite certaines validations avant d'être effective.

- Le suivi temporel et spatial de l'inoculum doit pouvoir être réalisé. La recherche de **Simple Sequence Repeats (SSR)**, des motifs nucléiques petits et propres à chaque souche, dans l'ADN fongique pourrait permettre le suivi de la souche inoculée dans le sol (Reineke *et al.* 2014).
- Les conditions du terrain ne doivent pas engendrer un changement du comportement de l'inoculum introduit.
- L'inoculum doit pouvoir être produit en grande quantité ce qui implique l'optimisation de la production en bioréacteur et le choix d'un mode de dissémination adapté. Cette procédure est d'ores et déjà utilisée pour d'autres champignons ectomycorhiziens (*e.g. Pisolithus tinctorius, Laccaria bicolor*) dont le développement est proche de celui de nos souches DSE (*e.g.* croissance, milieu de culture, pH, température). Cette ressemblance permet d'envisager une production facile d'inoculum à grande échelle.
- Des inoculations à l'échelle de la parcelle ont déjà été réalisées avec des consortiums endo- et ectomycorhiziens (projets LORVER et BIOFILTER) mais peu d'études se sont intéressées à la co-inoculation par des DSE/champignons mycorhiziens, ces associations seront donc à tester dans le futur.

En outre, l'inoculation *in situ* de champignons est envisageable uniquement dans les cas où la colonisation endogène est faible voire inexistante. Dans le cas contraire, l'inoculation *in situ* de champignons sélectionnés peut s'avérer inefficace à cause de la compétition avec les autres microorganismes endogènes du sol ou des conditions édaphiques qui empêchent les consortiums utilisés de bien coloniser le milieu et d'avoir les mêmes effets que ceux observés en laboratoire.

Par ailleurs, la pollution résultant des activités sidérurgiques, minières et industrielles n'est souvent pas limitée aux polluants métalliques. Notamment des pollutions par des polluants organiques (*e.g.* HAP) sont souvent retrouvées conjointement aux ETM. De précédents travaux ont mis en évidence la capacité de certaines souches fongiques à dégrader les HAP (Thèse C. Thion, 2012).

- Ainsi, l'évaluation de ces capacités de dégradation chez les souches DSE étudiées sera à considérer.

### 3. Mise en place d'une banque de mutants de *Leptodontidium* sp.

La production de souches fongiques tolérantes aux ETM nécessite notamment une étape de compréhension des mécanismes biochimiques et moléculaires mis en jeu. Les études réalisées jusqu'alors se sont limitées aux réponses de *C. finlandica* et *E. pisciphila* au Cd (Gorfer *et al.* 2009; Zhao *et al.* 2015).

L'étude de ces mécanismes peut se faire par des approches dites « classiques » ou « inverses ». Dans le cas de la génétique classique, deux techniques majoritaires sont employées : le criblage d'une banque de mutants pour un critère choisi, ou l'approche dite « omics » permise par les techniques de séquençage haut débit (NGS). L'absence de génome disponible pour les DSE de notre collection, lors du début de la thèse nous a orientés à ne pas utiliser les approches de NGS. Une banque de mutants a alors été réalisée par agrotransformation (Chapitre V-2 Huit souches de DSE ont pu être transformées avec des efficacités de transformation variant entre 0,6 et 127 %. Pour certains champignons, la transformation était influencée par l'âge du mycélium initial (e.g. *Leptodontidium* sp. Me07 et Pr30, *Cladosporium cladosporioides* CBS 101367, *P. mustea* Pr29). Peu de données sont disponibles à ce sujet dans la littérature. Néanmoins, l'état physiologique de la cellule ou la perméabilité et l'intégrité membranaire peuvent être deux raisons expliquant ces observations.

D'autre part, nous avons observé que la teneur en mélanine est différente dans le mycélium jeune (plus clair) par rapport au mycélium âgé (plus foncé). Ainsi, nous avons également émis l'hypothèse que la mélanine pourrait être un facteur limitant du succès de l'agrotransformation. En modifiant le contenu en mélanine des hyphes par un ajout de Cu ou de tricyclazole nous avons au final réfuté cette hypothèse (Figure VI-3).

- Des techniques de microscopie (à transmission ou à balayage) peuvent être employées dans le but de visualiser l'intégrité membranaire et la présence de mélanine (Zhan *et al.* 2016). Par ailleurs la mesure de certains marqueurs physiologiques (e.g. MDA, GSH, SDH) ou l'analyse de l'expression de certains gènes permettrait de contrôler l'état physiologique de la souche fongique.
- D'autre part, le tricyclazole inhibe la synthèse de mélanine DHN, néanmoins ce composé peut aussi engendrer des modifications physiologiques (e.g. toxicité, dérèglement de l'homéostasie) non perceptibles mais ayant des répercussions sur l'efficacité de l'agrotransformation. En outre, son action est limitée à une enzyme et donc des précurseurs de la DHN peuvent s'accumuler ou d'autres formes de mélanine peuvent être encore présentes. Ainsi pour éviter ces biais, l'utilisation de mutants albinos pourrait être plus judicieuse.

La souche *Leptodontidium* sp. Me07, de par son efficience à être transformée, sa résistance aux ETM et sa capacité à promouvoir la croissance du ray-grass a été choisie comme souche modèle dans la suite de cette thèse (Chapitre III-1 et V-1). **Mille trois cent**

**mutants**, dont une dizaine albinos ont été obtenus par agrotransformation (Chapitre V-2). Ce nombre de mutants représente une couverture au **maximum de 6% des gènes de *Leptodontidium* sp.** (22000 gènes<sup>21</sup>) en considérant que (i) l'ensemble des inserts sont positionnés au niveau de gènes différents, (ii) et qu'il n'y a pas eu d'insertions multiples. En comparaison, un taux de 6,5% de transformation est obtenu pour *Oidiodendron maius* (1087/16703 gènes) (Khouja 2011), 9,4% pour *Setosphaeria turcica* (1265/13422 gènes)(Xue *et al.* 2013), 21,8% pour *Colletotrichum gloeosporioides* (4128/18975 gènes)(Cai *et al.* 2013), *Monascus ruber* 52,8% (5100/9650 gènes) (Shao *et al.* 2009) et *Magnaporthe oryzae* >100% (55000/12593 gènes)(Betts *et al.* 2007). Cependant, à l'exception de l'étude réalisée avec *O. maius*, l'ensemble de ces études a été réalisé à partir de spores, tandis que la faible capacité de *Leptodontidium* sp. Me07 à sporuler a imposé l'utilisation de mycélium comme matériel initial. Ce choix a rendu l'expérience plus complexe et plus longue. De plus, l'efficacité de la transformation peut être influencée par le choix de la souche bactérienne, des conditions de co-cultures (*e.g.* milieu gélosé, température et pH) (Michielse *et al.* 2005), mais aussi par les moyens humains (chronophage) et matériel (besoin de zone de stockage importante) disponibles. La variabilité entre tous ces paramètres rend compliquée voire caduque la comparaison entre ces différentes études.

Quoiqu'il en soit, la maîtrise de la transformation génétique des champignons est un atout majeur en vue de la réalisation de complémentations fonctionnelles, de surexpressions ou de sous-expressions de gènes par insertion d'une cassette de transformation. La banque de mutants réalisée dans ce travail est ainsi la première concernant les DSE.

- Cependant, afin de pouvoir étudier l'intégralité du génome par cette stratégie, il serait nécessaire d'obtenir **davantage de mutants**.
- Grâce à cette banque, des études pourraient être menées afin d'identifier les déterminants géniques de la tolérance à d'autres ETM, à d'autres stress (*e.g.* salin, hydrique) ou bien encore pour identifier les gènes nécessaires à la colonisation racinaire et à la communication entre la plante hôte et le DSE.
- En outre, les mutants albinos seront un atout précieux pour élucider le rôle de la mélanine dans différents processus biologiques (*e.g.* colonisation des plantes, résistance à différents facteurs).

#### 4. Les mécanismes de tolérance aux métaux chez les DSE

La recherche de mutants sensibles au Zn au sein de la banque a mené à l'obtention de dix-huit candidats. Ces derniers sont deux à trois fois plus sensibles et certains présentent des capacités d'accumulation du Fe, du Zn et du Mn deux à sept fois plus importante que la souche sauvage. L'identification des séquences nucléotidiques avoisinant l'insertion du T-

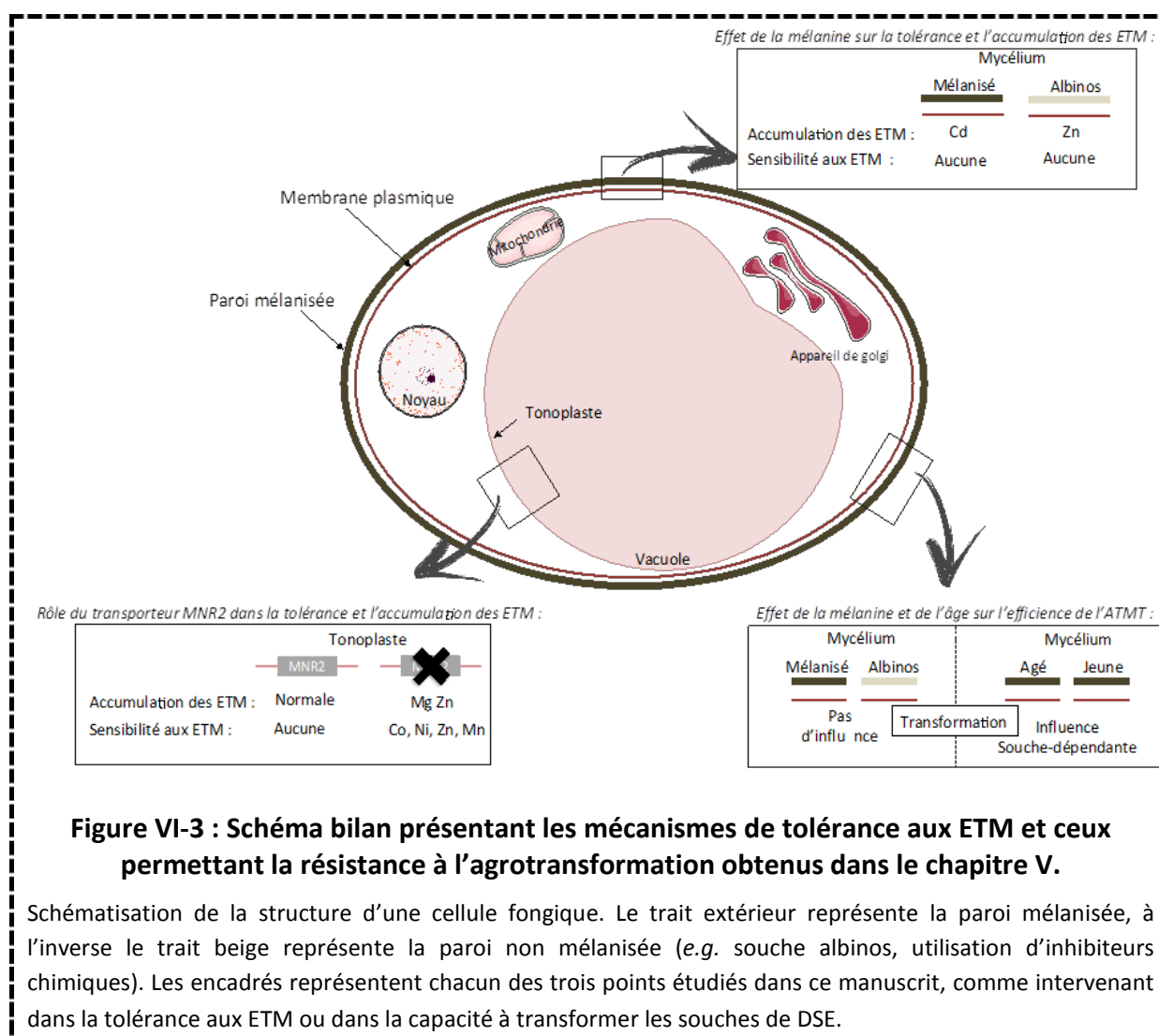
<sup>21</sup> <http://genome.jgi.doe.gov/Leptod1/Leptod1.info.html>

DNA a été l'un des **verrous techniques** les plus importants de cette étude. En effet seule une mutation a pu être identifiée avec succès. Les problèmes rencontrés ont pu être classés en deux types : (i) soit il n'y avait pas **d'amplicon par TAIL-PCR**, soit (ii) celui-ci était de **taille insuffisante pour permettre l'identification** par BLAST.

- La **caractérisation fonctionnelle** des dix-huit mutants sensibles sera à compléter. Pour ce faire, différents tests pourront être réalisés comme (i) identifier l'ensemble des ETM pour lesquels les transformants sont sensibles, (ii) identifier la zone mutée en comparant au génome de la souche *Leptodontidium* sp. PMI\_412, (iii) effectuer une caractérisation fonctionnelle chez la levure (*e.g.* localisation, régulation).
- Des **améliorations du protocole de la TAIL-PCR** sont préconisées : une augmentation du nombre d'amorces dégénérées ou la mise en place d'une étape d'amplification supplémentaire comme relaté par Wu *et al.* (2015) pourrait permettre une meilleure identification.
- L'utilisation de méthodes de **NGS**, plus onéreuses, représente également une alternative à l'utilisation de la TAIL-PCR (van Opijnen *et al.* 2009; Boyle *et al.* 2013).
- L'optimisation d'autres méthodes d'identification par PCR pourrait également représenter une solution (inverted-PCR, cassette-PCR, ...) (Leoni *et al.* 2011).

L'agrotransformation se résume à l'insertion d'un ADN-T dans l'ADN du champignon. Néanmoins, il se peut que deux ADN-T soient insérés. Lorsqu'un tel événement se produit, il est compliqué de comprendre la relation s'établissant entre le phénotype observé et les ADN-T insérés. Ce nombre d'insertion est variable selon les études, chez *Coniothyrium minitans* 82,7% des mutants ont présenté une simple insertion (Li *et al.* 2005), 69% chez *Verticillium dahliae* (Maruthachalam *et al.* 2011) tandis que 80% des mutants présentaient une double insertion chez *Colletotrichum graminicola* (Flowers et Vaillancourt 2005).

- Pour vérifier ce point précis dans notre collection de mutants, des Southern blot sont actuellement en cours de réalisation dans l'équipe du Dr Edgar Peiter (Université de Hall-Witterberg, Allemagne).



Une souche délétée pour un gène codant un transporteur de la famille des transporteurs de Mg « CorA » a été obtenue à l'issue du criblage de la banque de mutants. Une analyse phylogénétique a mis en évidence la présence des protéines appartenant aux trois sous-familles ALR1/ALR2, MRS2 et MNR2 chez *Leptodontidium* sp. PMI\_412 (souche de référence). Plus particulièrement, le gène délété chez le mutant d'intérêt de *Leptodontidium* sp. Me07 code pour **un transporteur MNR2**. La souche  $\Delta Lpmnr2$  présente une **sensibilité accrue au Zn, au Ni** et une **sensibilité moins importante au Cd, Cu, Pb et au Mn** et a une capacité **double à accumuler le Zn et le Mg** par rapport à la souche sauvage (**Figure VI-3**).

- La sensibilité aux ETM a été mesurée par l'utilisation de l'indice MIC et demande maintenant à être précisée par la mesure de l'indice  $EC_{50}$  pour chaque élément.
- L'évaluation des capacités d'accumulation devrait être menée en présence d'autres ETM afin de vérifier si la relation est Zn-spécifique ou non.

La complémentation hétérologue de *S. cerevisiae* par LpMNR2a mis en évidence un retour de la tolérance aux ETM lorsque la levure exprime le gène. A l'inverse, la souche délétée présente une **sensibilité accrue au Ni, Mn, Ca** et une **sensibilité moins importante au Co, Mg et Zn**. Cette sensibilité est expliquée par Pisat *et al.* (2009) : Succinctement, l'absence de MNR2 supprime la remobilisation du Mg depuis la vacuole et, le maintien de l'homéostasie au Mg est ainsi assuré par l'absorption du Mg depuis l'espace extracellulaire. La surexpression de transporteurs de Mg plasmiques (*e.g.* ALR1 et ALR2) permet alors l'entrée de Mg mais aussi d'autres cations toxiques. C'est cette entrée de cations toxiques qui engendrerait la toxicité et la sensibilité aux ETM (MacDiarmid et Gardner 1998; Lim *et al.* 2011). Cependant ces études restent à compléter car les mécanismes expliquant le lien entre l'absence de MNR2 et la surexpression des transporteurs plasmiques restent encore incompris et complexe (Lim *et al.* 2011). D'autre part, le clonage de la fusion LpMNR2::GFP a permis de localiser le transporteur au niveau de la membrane vacuolaire conformément aux études réalisées par Pisat *et al.* (2009) avec l'orthologue ScMNR2.

- L'utilisation d'**inhibiteurs** chimiques **spécifiques des CorA** tel que le cobalt(III)hexaamine ou la trypsine bovine permettrait de confirmer ou d'infirmer si la sur-accumulation de Zn et de Mg est en lien avec les transporteurs CorA ou avec d'autres mécanismes parallèles.
- La réalisation d'une analyse transcriptomique comparative entre la souche LpMNR2 et la souche sauvage, en présence ou non de Mg, permettrait de mettre en évidence l'ensemble des gènes **sous- ou sur-régulés** consécutivement à la délétion. Ainsi, le phénotype de tolérance et/ou d'accumulation pourrait être expliqué.
- Enfin, Le gène LpMNR2 et la construction LpMNR2::GFP devront être clonés et exprimé dans la souche *Lpmnr2* afin de conforter les observations faites chez la levure.

La délétion des transporteurs CorA chez *M. oryzae* engendre une diminution de la virulence et peut affecter les mécanismes de pénétration mis en place par le champignon (Reza *et al.* 2016).

- Il serait intéressant de vérifier les capacités de colonisation du mutant *Lpmnr2* et d'évaluer son effet sur la croissance végétale et le transfert des éléments majeurs et traces.

Dans un second temps nous nous sommes intéressés aux rôles de la mélanine dans la tolérance aux métaux (Chapitre V-0). Pour quantifier ce pigment nous avons optimisé une méthode d'extraction, **fiable et répétable à partir d'une faible quantité de mycélium fongique**.

La mélanine joue un rôle dans la tolérance aux stress abiotiques (Fernandez et Koide 2013; Gessler *et al.* 2014) et différents auteurs ont suggéré son implication dans la tolérance aux

ETM, mais peu d'expériences viennent étayer leurs hypothèses. Nous avons mis en évidence à partir d'une étude basée sur six DSE (deux *Cadophora* sp., deux *Leptodontidium* sp. et deux *P. mustea*) que la mélanine est majoritairement synthétisée à partir de la **voie DHN**. Cette observation est en accord avec la seule étude réalisée jusqu'alors chez les DSE (Zhan *et al.* 2011). Néanmoins les souches *Phialophora mustea* Va47, *Cadophora* sp. Fe06 et *Cadophora* sp. DSE 1049 utilisent également la **voie L-DOPA** pour produire une faible proportion de mélanine.

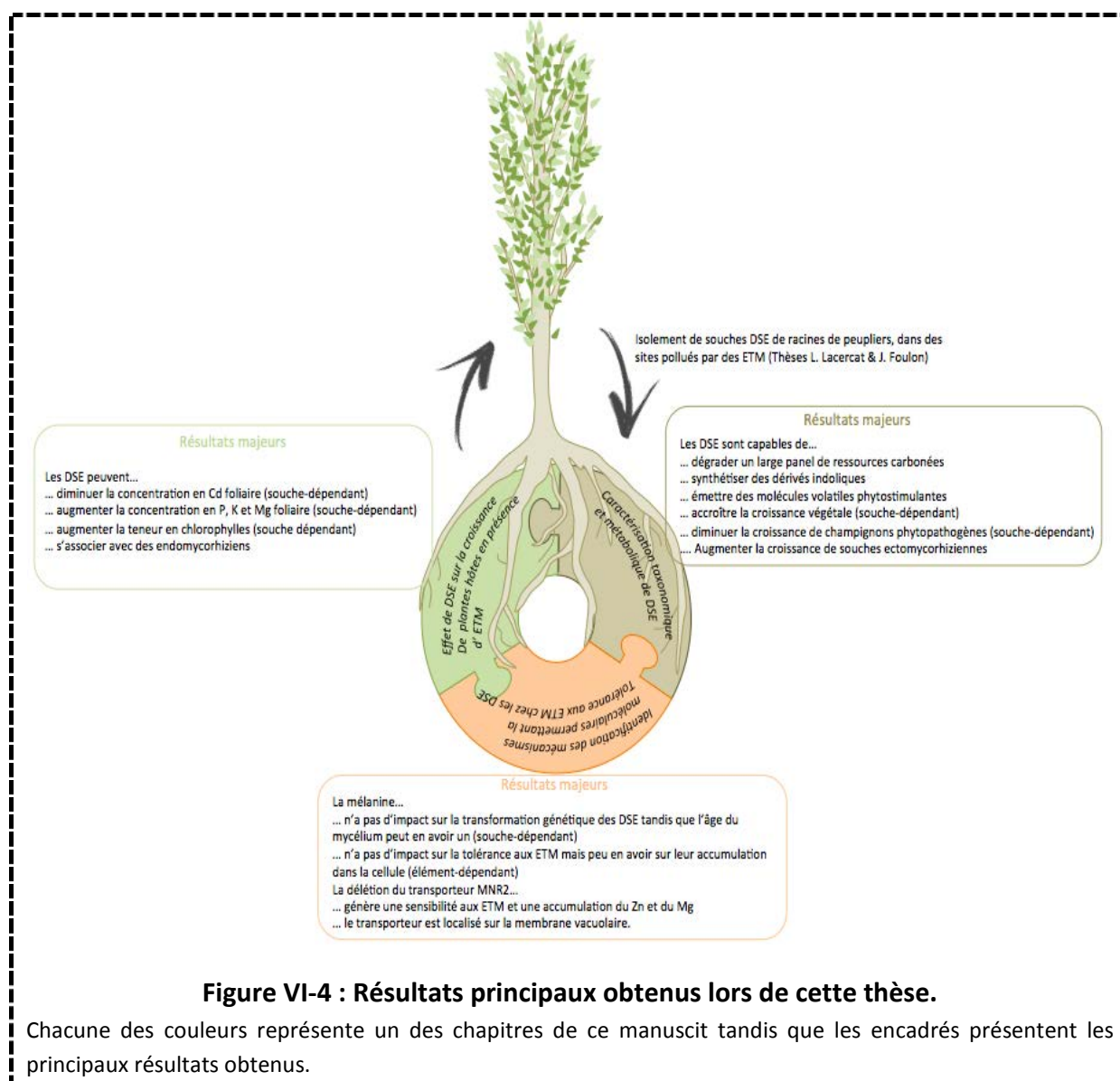
- Ces études *in silico* et *in vitro* devront être confirmées par des approches de biologie moléculaire (qPCR). Dans cette optique, des oligonucléotides spécifiques à certains gènes codant des enzymes clés de chaque voie de biosynthèse sont en cours de design et de test par D. Gaber (Leibniz-Institute of Vegetable and Ornamental Crops, Allemagne).
- Une observation du spectre infrarouge (*i.e.* FITR) de la molécule extraite permettrait de s'assurer que la molécule extraite est effectivement de la mélanine
- Plus précisément, une analyse de la composition en N et en S permettrait de mettre en évidence les différents types de mélanine.

Ensuite, en utilisant à la fois des mutants albinos et des inhibiteurs de la biosynthèse de la mélanine nous avons montré que la mélanine n'est pas **le paramètre principal expliquant la tolérance aux ETM chez les DSE (Figure VI-3)**. Cette même conclusion a été obtenue avec *Gaeumannomyces graminis*, et *Aspergillus nidulans* vis à vis, respectivement, du Cd, du Co et du Zn (Frederick *et al.* 1999; Tripathi et Srivastava 2007a, 2007b). Ces observations pourraient être expliquées par la faible proportion de mélanine présente dans les parois cellulaires fongiques (entre 0 et 5% en masse de la paroi) ainsi que par la mise en place de nombreux autres mécanismes de défense contre les métaux (*e.g.* SOD, CAT, POD) (Siegel *et al.* 1990; Zhao *et al.* 2015). A l'inverse, les relations entre les capacités d'absorption/d'adsorption et la teneur en mélanine semblent plus complexes. A partir de souches dépigmentées par l'ajout d'un inhibiteur, nous avons mis en évidence que la mélanine n'influence **pas l'accumulation de l'As, mais joue un rôle clef dans celle du Cd** **Figure VI-3**. De manière étonnante la présence de mélanine diminue l'accumulation du Zn dans les cinq souches de DSE. Cette observation pourrait être le résultat des capacités **d'absorption des précurseurs** (*e.g.* flavioline, 2-hydroxyjuglone) de la mélanine de type DHN qui possèdent eux-mêmes des capacités de fixation importantes (Caesar-Tonthat *et al.* 1995).

- La tolérance aux ETM des souches mélanisées ou non mélanisées, a été évaluée par la mesure des MIC. De ce fait, pour approfondir davantage ces premiers résultats, il serait souhaitable de mesurer l'indice  $EC_{50}$  de chaque souche pour chaque ETM.
- D'autre part, des mutants albinos pourraient être utilisés pour pallier aux problèmes dûs à l'utilisation du tricyclazole (*e.g.* désordres physiologiques, capacité de fixation des ETM des précurseurs de la mélanine).
- En outre, la désorption séquentielle, en présence ou non de mélanine, avec un isotope marqué permettrait de mieux comprendre où les métaux sont adsorbés ou séquestrés dans la cellule fongique (Blaudez *et al.* 2000).

## 5. Conclusion générale

L'objectif de ce travail de thèse était de caractériser le complexe « Endophyte brun septés (DSE) - sols pollués par des éléments traces métalliques (ETM)- plante ». Pour répondre à cette problématique, trois axes de recherche ont été développés : la caractérisation (i) de souches fongiques DSE, (ii) de leur effet sur les plantes hôtes en présence d'ETM et (iii) de leurs mécanismes de tolérance aux ETM. Ces trois points sont résumés par la **Figure IV-4**.



Les DSE étudiés ont été isolés de racines de peupliers poussant en présence d'ETM. Les résultats de ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence les capacités des DSE à coloniser différentes plantes herbacées et ligneuses (*e.g.* observation de structures, capacité à dégrader les composés pariétaux), et à promouvoir leur croissance en conditions contrôlées. Cette étude a ensuite été extrapolée à des conditions *in planta* en présence de sols pollués aux ETM. A l'instar des études réalisées avec d'autres microorganismes, les

résultats se sont avérés variables en fonction des conditions édaphiques de l'étude et des souches fongiques utilisées, et sont difficilement généralisables à l'ensemble des DSE. Cependant, au travers de cette variété, ces résultats montrent ainsi l'aspect fondamental de l'étude des relations sols pollués-plantes-DSE, jusqu'alors inconnu car l'essentiel des études réalisées portaient sur un sol, une plante ou une souche.

En outre, sous certaines conditions édaphiques, l'inoculation des plantes par des DSE semble être une solution très intéressante pour promouvoir les stratégies de phytomanagement (*i.e.* augmentation de la production de la biomasse, séquestration des ETM dans les parties racinaires). De plus, l'association de souches fongiques en consortia semble également être une voie d'étude à approfondir afin de répondre à des situations de pollutions multiples, ou de plantation mixte (*e.g.* herbacées, ligneux). Toutefois, les travaux exposés dans ce manuscrit mettent également en exergue la nécessité de préciser les mécanismes qui contrôlent à la fois les effets des DSE sur la plante et ceux expliquant la tolérance des DSE aux ETM. L'essor des techniques « omics » et la diminution des coûts d'analyse, et l'augmentation du nombre des génomes fongiques séquencés sont autant d'éléments qui pourront permettre d'élucider ces mécanismes.

Dans ce manuscrit, une approche de caractérisation des mécanismes de tolérance au ETM a été menée. Cette étude préliminaire est un premier pas dans l'avancée de la compréhension à la fois du rôle de la mélanine dans la tolérance et l'accumulation des ETM chez les DSE ainsi que sur le rôle de certains transporteurs dans la tolérance au Zn. De plus, pour l'étude de ces mécanismes, une banque de mutants de la souche *Leptodontidium* sp. Me07 a été créée. Celle-ci est la première réalisée chez ce groupe de champignons. L'utilisation de la banque pour l'étude de différents stress ou mécanismes, ou encore couplée à des approches « omics » pourrait permettre des avancées notables dans la compréhension de la physiologie des DSE, qui reste encore trop peu connue.

Au final, en considérant l'abondance des DSE dans les sols pollués et leur potentiel effet sur la croissance végétale, l'étude de ces organismes, jusqu'alors limitée, devrait donc être intégrée de manière plus systématique, au même titre que l'étude des champignons mycorhiziens, aux travaux d'évaluation de l'impact des pollutions. En outre, l'étude des DSE développée dans la thèse pourrait être transposée à d'autres problématiques environnementales. Ces travaux complémentaires pourraient notamment appuyer les considérations liées aux changements climatiques (*e.g.* stress hydrique) ou aux cas de multipollutions (*e.g.* hydrocarbures, métaux, pesticides et dérivés chlorés).

## Références bibliographiques

---

### A

- Adams P, De-Leij FAAM, Lynch JM. *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 mediates growth promotion of crack willow (*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal-contaminated soil. *Microb Ecol* 2007;**54**:306–13.
- Addy HD, Piercey MM, Currah RS. Microfungal endophytes in roots. *Can J Bot* 2005;**83**:1–13.
- Adriaensen K, Vangronsveld J, Colpaert J V. Zinc-tolerant *Suillus bovinus* improves growth of Zn-exposed *Pinus sylvestris* seedlings. *Mycorrhiza* 2006;**16**:553–8.
- Alberton O, Kuyper TW, Summerbell RC. Dark septate root endophytic fungi increase growth of Scots pine seedlings under elevated CO<sub>2</sub> through enhanced nitrogen use efficiency. *Plant Soil* 2009;**328**:459–70.
- Alikhani M, Khatabi B, Sepehri M *et al.* A proteomics approach to study the molecular basis of enhanced salt tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) conferred by the root mutualistic fungus *Piriformospora indica*. *Mol Biosyst* 2013;**9**:1498–510.
- Alloway B. Heavy Metals in Soils. *Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils*. Vol 3. 2012, 16–9.
- Almeida-Paes R, Frases S, de Sousa Araujo G *et al.* Biosynthesis and functions of a melanoid pigment produced by species of the sporothrix complex in the presence of L-Tyrosine. *Appl Environ Microbiol* 2012;**78**:8623–30.
- Altschul SF, Gish W, Miller W *et al.* Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;**215**:403–10.
- Andrade-Linares DR, Grosch R, Restrepo S *et al.* Effects of dark septate endophytes on tomato plant performance. *Mycorrhiza* 2011;**21**:413–22.
- Ansari MW, Trivedi DK, Sahoo RK *et al.* A critical review on fungi mediated plant responses with special emphasis to *Piriformospora indica* on improved production and protection of crops. *Plant Physiol Biochem* 2013;**70**:403–10.
- Arita A, Zhou X, Ellen TP *et al.* A genome-wide deletion mutant screen identifies pathways affected by nickel sulfate in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* 2009;**10**:524.
- Arnon DI, Stout PR. The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. *Plant Physiol* 1939;**14**:371–5.
- Arriagada C, Almonacid L, Cornejo P *et al.* Influence of an organic amendment comprising saprophytic and mycorrhizal fungi on soil quality and growth of *Eucalyptus globulus* in

the presence of sewage sludge contaminated with aluminium. *Arch Agron Soil Sci* 2014;**60**:1229–48.

Avery S V. Molecular targets of oxidative stress. *Biochem J* 2011;**434**:201–10.

Azcón-Aguilar C, Barea JM. Nutrient cycling in the mycorrhizosphere. *J Soil Sci Plant Nutr* 2015;**25**:372–96.

## **B**

Babu AG, Shea PJ, Oh BT. *Trichoderma* sp. PDR1-7 promotes *Pinus sylvestris* reforestation of lead-contaminated mine tailing sites. *Sci Total Environ* 2014;**476–477**:561–7.

Bäck J, Aaltonen H, Hellén H *et al.* Variable emissions of microbial volatile organic compounds (MVOCs) from root-associated fungi isolated from Scots pine. *Atmos Environ* 2010;**44**:3651–9.

Bagyaraj DJ, Sharma MP, Maiti D. Phosphorus nutrition of crops through arbuscular mycorrhizal fungi. *Curr Sci* 2015;**108**:1288–93.

Baize D. Teneurs totales en “ métaux lourds ” dans les sols français résultats généraux du programme ASPITET. 1997:1–14.

Baize D, Tercé M. Approches fonctionnelles et spatiales. *Les Éléments Traces Métalliques Dans Les Sols*. INRA Editi. Paris, 2002.

Baker A. Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. *J Plant Nutr Soil Sci* 1981;**3**:643–54.

Baldrian P. Fungal laccases occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev* 2006;**30**:215–42.

Ban Y, Tang M, Chen H *et al.* The response of dark septate endophytes (DSE) to heavy metals in pure culture. *PLoS One* 2012;**7**:e47968.

Bargagli R. *Trace Elements in Terrestrial Plants: An Ecophysiological Approach to Biomonitoring and Biorecovery*. Springer-Verlag (ed.), 1998.

Barrow JR. Atypical morphology of dark septate fungal root endophytes of *Bouteloua* in arid southwestern USA rangelands. *Mycorrhiza* 2003;**13**:239–47.

Barrow JR, Osuna P. Phosphorus solubilization and uptake by dark septate fungi in fourwing saltbush, *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. *J Arid Environ* 2002;**51**:449–59.

Bartholdy B, Berreck M, Haselwandter K. Hydroxamate siderophore synthesis by *Phialocephala fortinii*, a typical dark septate fungal root endophyte. *Biometals* 2001;**14**:33–42.

Beauchamp VB, Stromberg JC, Stutz JC. Interactions between *Tamarix ramosissima* (saltcedar), *Populus fremontii* (cottonwood), and mycorrhizal fungi: Effects on seedling growth and plant species coexistence. *Plant Soil* 2005;**275**:221–31.

Beauséjour J, Beaulieu C. Characterization of *Streptomyces scabies* mutants deficient in

- melanin biosynthesis. *Can J Microbiol* 2004;**50**:705–9.
- Op De Beeck M, Ruytinx J, Smits MM *et al.* Belowground fungal communities in pioneer Scots pine stands growing on heavy metal polluted and non-polluted soils. *Soil Biol Biochem* 2015;**86**:58–66.
- Bell AA, Wheeler MH. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu Rev Phytopathol* 1986;**24**:411–51.
- Bellion M, Courbot M, Jacob C *et al.* Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Lett* 2006;**254**:173–81.
- Bellion M, Courbot M, Jacob C *et al.* Metal induction of a *Paxillus involutus* metallothionein and its heterologous expression in *Hebeloma cylindrosporum*. *New Phytol* 2007;**174**:151–8.
- Bert V, Allemon J, Sajet P *et al.* Torrefaction and pyrolysis of metal-enriched poplars from phytotechnologies: Effect of temperature and biomass chlorine content on metal distribution in end-products and valorization options. *Biomass and Bioenergy* 2017;**96**:1–11.
- Berthelot C, Leyval C, Foulon J *et al.* Plant growth promotion, metabolite production and metal tolerance of dark septate endophytes isolated from metal-polluted poplar phytomanagement sites. *FEMS Microbiol Ecol* 2016;**92**:fiw144.
- Betts MF, Tucker SL, Galadima N *et al.* Development of a high throughput transformation system for insertional mutagenesis in *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet Biol* 2007;**44**:1035–49.
- Bewley RJF. Effects of heavy metal pollution on oak leaf microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 1980;**40**:1053–9.
- Bisessar S. Effect of heavy metals on microorganisms in soils near a secondary lead smelter. *Appl Environ Microbiol* 1982;**17**:305–8.
- Blaby-Haas CE, Merchant SS. The ins and outs of algal metal transport. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2012;**1823**:1531–52.
- Blaudez D, Botton B, Chalot M. Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Microbiology* 2000;**146**:1109–17.
- Blaudez D, Chalot M. Characterization of the ER-located zinc transporter ZnT1 and identification of a vesicular zinc storage compartment in *Hebeloma cylindrosporum*. *Fungal Genet Biol* 2011;**48**:496–503.
- Blaudez D, Kohler A, Martin F *et al.* Poplar Metal Tolerance Protein 1 Confers Zinc Tolerance and Is an Oligomeric Vacuolar Zinc Transporter with an Essential Leucine Zipper Motif. *Plant Cell* 2003;**15**:2911–28.
- Bleackley M, Macgillivray R. Transition metal homeostasis: from yeast to human disease.

*Biometals* 2011;**24**:785–809.

Bloomfield BJ, Alexander M. Melanins and resistance of fungi to lysis. *J Bacteriol* 1967;**93**:1276–80.

Bois G, Bertrand A, Piché Y *et al.* Growth, compatible solute and salt accumulation of five mycorrhizal fungal species grown over a range of NaCl concentrations. *Mycorrhiza* 2006;**16**:99–109.

Bojarczuk K, Karliński L, Hazubska-Przybył T *et al.* Influence of mycorrhizal inoculation on growth of micropropagated *Populus × canescens* lines in metal-contaminated soils. *New For* 2014;**46**:195–215.

Bolan NS, Park JH, Robinson B *et al.* Chapter four : Phytostabilization: A green approach to contaminant containment. *Advances in Agronomy*. Vol 112. 2011, 145–204.

Bolchi A, Ruotolo R, Marchini G *et al.* Genome-wide inventory of metal homeostasis-related gene products including a functional phytochelatin synthase in the hypogeous mycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. *Fungal Genet Biol* 2011;**48**:573–84.

Bonfante P, Genre A. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat Commun* 2010;**48**:1–11.

Bonito G, Hameed K, Ventura R *et al.* Isolating a functionally relevant guild of fungi from the root microbiome of *Populus*. *Fungal Ecol* 2016;**22**:35–42.

Bourrelier PH, Berthelin J, Pédro G. Contamination des sols par les éléments en traces: les risques et leur gestion. In: Doc T& (ed.). Académie des Sciences, 1998.

Boyle B, Brisson N, Material P *et al.* Time- and Cost-Efficient Identification of T-DNA Insertion Sites through Targeted Genomic Sequencing. *PLoS One* 2013;**8**:e70912.

Brundrett M. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol Rev* 2004;**79**:473–95.

Burd G, Dixon G, Glick B. A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Appl Environ Microbiol* 1998;**64**:3663–8.

Busby PE, Ridout M, Newcombe G. Fungal endophytes: modifiers of plant disease. *Plant Mol Biol* 2016;**90**:645–55.

Butler M, Day A. Fungal melanins: a review. *Can J Microbiol* 1998;**44**:1115–36.

Butler MJ, Gardiner RB, Day AW. Degradation of melanin or inhibition of its synthesis: are these a significant approach as a biological control of phytopathogenic fungi? *Biol Control* 2005;**32**:326–36.

## C

Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* 2000;**3**:3–8.

- Cabral L, Soares CRFS, Giachini AJ *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of contaminated areas by trace elements: mechanisms and major benefits of their applications. *World J Microbiol Biotechnol* 2015;**31**:1655–64.
- Caesar-Tonthat TC, Van Ommen F, Geesey GG *et al.* Melanin production by a filamentous soil fungus in response to copper and localization of copper sulfide by sulfide-silver staining. *Appl Environ Microbiol* 1995;**61**:1968–75.
- Cai Z, Li G, Lin C *et al.* Identifying pathogenicity genes in the rubber tree anthracnose fungus *Colletotrichum gloeosporioides* through random insertional mutagenesis. *Microbiol Res* 2013;**168**:340–50.
- Caldwell BA, Jumpponen A, Trappe JM. Utilization of major detrital substrates by dark-septate, root endophytes. *Mycologia* 2000;**92**:230–2.
- Calvet C, Barea JM, Pera J. In vitro interactions between the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and some saprophytic fungi isolated from organic substrates. *Soil Biol Biochem* 1992;**24**:775–80.
- Cano C, Bago A. Competition and substrate colonization strategies of three polyxenically grown arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia* 2005;**97**:1201–14.
- Cardoso PG, De Queiroz MV, Pereira OL *et al.* Morphological and molecular differentiation of the pectinase producing fungi *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum*. *Brazilian J Microbiol* 2007;**38**:71–7.
- Čevnik M, Jurc M, Vodnik D. Filamentous fungi associated with the fine roots of *Erica herbacea* L. from the area influenced by the Žerjav lead smelter (Slovenia). *Phyt - Ann Rei Bot* 2000;**40**:61–4.
- Chadha N, Mishra M, Prasad R *et al.* Root Endophytic Fungi: Research Update. *J Biol Life Sci* 2014;**5**:135–58.
- Chalot M, Blaudez D, Rogaume Y *et al.* Fate of trace elements during the combustion of phytoremediation wood. *Environ Sci Technol* 2012;**46**:13361–9.
- Chamnongpol S, Groisman EA. Mg<sup>2+</sup> homeostasis and avoidance of metal toxicity. 2002;**44**:561–71.
- Chen BD, Zhu YG, Duan J *et al.* Effects of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on growth and metal uptake by four plant species in copper mine tailings. *Environ Pollut* 2007;**147**:374–80.
- Chen ECF, Su YH, Kanagarajan S *et al.* Development of an activation tagging system for the basidiomycetous medicinal fungus *Antrodia cinnamomea*. *Mycol Res* 2009;**113**:290–7.
- Citterio S, Prato N, Fumagalli P *et al.* The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* induces growth and metal accumulation changes in *Cannabis sativa* L. *Chemosphere* 2005;**59**:21–9.

- Collin-Hansen C, Pedersen S, Andersen R *et al.* First report of phytochelatins in a mushroom: induction of phytochelatins by metal exposure in *Boletus edulis*. *Mycologia* 2007;**99**:161–74.
- Colpaert J V., Muller L, Lambaerts M *et al.* Evolutionary adaptation to Zn toxicity in populations of Suilloid fungi. *New Phytol* 2004;**162**:549–59.
- Colpaert J V., Wevers JHL, Krzmaric E *et al.* How metal-tolerant ecotypes of ectomycorrhizal fungi protect plants from heavy metal pollution. *Ann For Sci* 2011;**68**:17–24.
- Combiér JP, Melayah D, Raffier C *et al.* *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *FEMS Microbiol Lett* 2003;**220**:141–8.
- Crutcher FK, Parich A, Schuhmacher R *et al.* A putative terpene cyclase, *vir4*, is responsible for the biosynthesis of volatile terpene compounds in the biocontrol fungus *Trichoderma virens*. *Fungal Genet Biol* 2013;**56**:67–77.

## D

- Daghino S, Martino E, Perotto S. Model systems to unravel the molecular mechanisms of heavy metal tolerance in the ericoid mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 2016;**26**:263–74.
- Dalcorso G, Manara A, Furini A. An overview of heavy metal challenge in plants: from roots to shoots. *Metallomics* 2013;**5**:1117–32.
- David AS, Haridas S, Labutti K *et al.* Draft genome sequence of *Microdochium bolleyi*, a dark septate fungal endophyte of beach grass. *Am Soc Microbiol* 2016;**4**:1–2.
- Debaud JC, Gay G. *in vitro* fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* associated with *Pinus pinaster*. *New Phytol* 1987;**105**:429–35.
- Demyttenaere JCR, Moriña RM, De Kimpe N *et al.* Use of headspace solid-phase microextraction and headspace sorptive extraction for the detection of the volatile metabolites produced by toxigenic *Fusarium* species. *J Chromatogr A* 2004;**1027**:147–54.
- Deram A, Languereau-Leman F, Howsam M *et al.* Seasonal patterns of cadmium accumulation in *Arrhenatherum elatius* (Poaceae): Influence of mycorrhizal and endophytic fungal colonisation. *Soil Biol Biochem* 2008;**40**:845–8.
- Deram A, Languereau F, Haluwyn C Van. Mycorrhizal and endophytic fungal colonization in *Arrhenatherum elatius* L. roots according to the soil contamination in heavy metals. *Soil Sediment Contam* 2011;**20**:114–27.
- Diao YH, Li T, Zhao ZW. Zinc accumulation characteristics of two *Exophiala* strains and their antioxidant response to Zn<sup>2+</sup> stress. *J Environ Prot (Irvine, Calif)* 2013;**2013**:12–9.
- Doelman P, Haanstra L. Short-and long-term effects of heavy metals on urease activity in

soils. *Biol Fertil Soils* 1986;**2**:213–8.

Dolatabadi HK, Goltapeh EM, Jaimand K *et al.* Effects of *Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera* on growth and yield of essential oil in fennel (*Foeniculum vulgare*) under greenhouse conditions. *J Basic Microbiol* 2011;**51**:33–9.

Dominguez-Nunez JA, Benito B, Berrocal-Lobo M *et al.* Mycorrhizal fungi: Role in the solubilization of potassium. In: Meena VS, Maurya BH, Verma JP, *et al.* (eds.). *Optimum Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture*. Springer India, 2016, 77–98.

Duin D Van, Casadevall A, Nosanchuk JD. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;**46**:3394–400.

Duxbury T. Ecological Aspects of Heavy Metal Responses in Microorganisms. In: Marshall KC (ed.). *Advances in Microbial Ecology*. New York: Plenum Press, 1985, 185–235.

## **E**

Eide DJ. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2006;**1763**:711–22.

Eisenman HC, Casadevall A. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;**93**:931–40.

Endlweber K, Scheu S.. Establishing arbuscular mycorrhiza-free soil: A comparison of six methods and their effects on nutrient mobilization. *Appl Soil Ecol* 2006 ; **34**: 276–279.

Evangelou MWH, Deram A. Phytomanagement : A realistic approach to soil remediating phytotechnologies with new challenges for plant science. *Int J Plant Bio Res* 2014;**2**:1–4.

Evangelou MWH, Papazoglou EG, Robinson BH *et al.* Phytomanagement : Phytoremediation on Contaminated Land Introduction : From Remediation. 2015;**1**:115–32.

## **F**

Felsenstein J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution (N Y)* 1985;**39**:783.

Fernandez CW, Koide RT. The function of melanin in the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* under water stress. *Fungal Ecol* 2013;**6**:479–86.

Fernando A, Currah R. A comparative study of the effects of the root endophytes *Leptodontidium orchidicola* and *Phialocephala fortinii* (fungi imperfecti) on the growth of some subalpine plants in culture. *Can J Bot* 1996;**74**:1071–8.

Fitzgerald A, Mudge A, Gleave A *et al.* Agrobacterium and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. *Mycol Res* 2003;**107**:803–10.

- Flowers JL, Vaillancourt LJ. Parameters affecting the efficiency of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Colletotrichum graminicola*. *Curr Genet* 2005;**48**:380–8.
- Fogarty RV, Tobin JM. Fungal melanins and their interaction with metals. *Enzyme Microb Technol* 1996;**19**:311–7.
- Fomina M, Hillier S, Charnock JM *et al*. Role of oxalic acid overexcretion in transformations of toxic metal minerals by *Beauveria caledonica*. *Appl Environ Microbiol* 2005;**71**:371–81.
- Foulon J, Zappelini C, Durand A *et al*. Impact of poplar-based phytomanagement on soil properties and microbial communities in a metal- contaminated site. *FEMS Microbiol Ecol* 2016;**92**:fiw163.
- Franken P. The plant strengthening root endophyte *Piriformospora indica*: potential application and the biology behind. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;**96**:1455–64.
- Frederick BA, Caesar-Tonthat T-C, Wheeler MH *et al*. Isolation and characterisation of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* melanin mutants. *Mycol Res* 1999;**103**:99–110.
- Fritsch C, Coeurdassier M, Giraudoux P *et al*. Spatially explicit analysis of metal transfer to biota: Influence of soil contamination and landscape. *PLoS One* 2011;**6**:26–9.
- Fryar SC, Booth W, Davies J *et al*. Evidence of in situ competition between fungi in freshwater. *Fungal Divers* 2005:59–71.
- Fuentes A, Almonacid L, Ocampo JA *et al*. Synergistic interactions between a saprophytic fungal consortium and *Rhizophagus irregularis* alleviate oxidative stress in plants grown in heavy metal contaminated soil. *Plant Soil* 2016;**407**:355–66.
- Fujieda N, Murata M, Yabuta S *et al*. Multifunctions of MelB , a Fungal Tyrosinase from *Aspergillus oryzae*. *ChemBioChem* 2012;**13**:193–201.

## G

- Gadd GM. Mechanisms implicated in the ecological success of polymorphic fungi in metal-polluted habitats. *Environ Technol* 1981;**2**:531–6.
- Gadd GM. Metals and microorganisms: A problem of definition. *FEMS Microbiol Lett* 1992;**100**:197–203.
- Gadd GM. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol* 1993;**124**:25–60.
- Gadd GM. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma* 2004;**122**:109–19.
- Gadd GM, Griffiths a. J. Effect of copper on morphology of *Aureobasidium pullulans*. *Trans Br Mycol Soc* 1980;**74**:387–92.
- Gadd GM, Rhee YJ, Stephenson K *et al*. Geomycology: Metals, actinides and biominerals.

- Environ Microbiol Rep* 2012;**4**:270–96.
- Gadd GM, de Rome L. Biosorption of copper by fungal melanin. *Appl Microbiol Biotechnol* 1988;**29**:610–7.
- Gamalero E, Lingua G, Berta G *et al.* Beneficial role of plant growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant responses to heavy metal stress. *Can J Microbiol* 2009;**55**:501–14.
- Gardea-Torresdey JL, Peralta-Videa JR, De La Rosa G *et al.* Phytoremediation of heavy metals and study of the metal coordination by X-ray absorption spectroscopy. *Coord Chem Rev* 2005;**249**:1797–810.
- Gehring CA, Ji B, Fong S *et al.* Hybridization in *Populus* alters the species composition and interactions of root-colonizing fungi: consequences for host plant performance. *Botany* 2014;**92**:287–93.
- Gessler NN, Egorova AS, Belozerskaya TA. Melanin pigments of fungi under extreme environmental conditions (Review). *Appl Biochem Microbiol* 2014;**50**:105–13.
- Ghabooli M, Khatabi B, Ahmadi FS *et al.* Proteomics study reveals the molecular mechanisms underlying water stress tolerance induced by *Piriformospora indica* in barley. *J Proteomics* 2013;**94**:289–301.
- Gibson MM, Bagga D., Miller C. *et al.* Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: the influence of new mutations conferring Co<sup>2+</sup> resistance on the CorA Mg<sup>2+</sup> transport system. *Mol Microbiol* 1991;**5**:2753–62.
- Gietz D, St Jean A, Woods R *et al.* Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucl Acid Res* 1992;**20**:1425.
- Gill SS, Gill R, Trivedi DK *et al.* *Piriformospora indica*: Potential and significance in plant stress tolerance. *Front Microbiol* 2016;**7**:1–20.
- Godin P. Sources de contamination et enjeux. *Elements Traces et Pollution Des Sols*. Paris: Ministère de l'environnement, 1982, 58.
- Göhre V, Paszkowski U. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 2006;**223**:1115–22.
- Gonçalves SC, Martins-Loução MA, Freitas H. Evidence of adaptive tolerance to nickel in isolates of *Cenococcum geophilum* from serpentine soils. *Mycorrhiza* 2009;**19**:221–30.
- Gorfer M, Klaubauf S, Bandian D *et al.* *Cadophora finlandica* and *Phialocephala fortinii*: Agrobacterium-mediated transformation and functional GFP expression. *Mycol Res* 2007;**111**:850–5.
- Gorfer M, Persak H, Berger H *et al.* Identification of heavy metal regulated genes from the root associated ascomycete *Cadophora finlandica* using a genomic microarray. *Mycol Res* 2009;**113**:1377–88.

Green VS, Stott DE, Diack M. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. *Soil Biol Biochem* 2006;**38**:693–701.

Grünig CR, Queloz V, Sieber TN *et al.* Dark septate endophytes (DSE) of the *Phialocephala fortinii* s.l. – *Acephala applanata* species complex in tree roots: classification, population biology, and ecology. *Botany* 2008;**86**:1355–69.

Grünig CR, Queloz V, Sieber TN. Structure of diversity in dark septate endophytes : from species to genes. *Endophytes of Forest Trees*. 2011, 3–30.

Gube M. Fungal Molecular Response to Heavy Metal Stress. In: Dirk Hoffmeister (ed.). *The Mycota III. Biochemistry and Molecular Biology*. Springer-V. Berlin Heidelberg, 2016, 47–68.

## H

Harman GE, Howell CR, Viterbo A *et al.* *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol* 2004;**2**:43–56.

Hashimoto Y, Hyakumachi M. Effects of isolates of ectomycorrhizal fungi and endophytic *Mycelium radialis atrovirens* that were dominant in soil from disturbed sites on growth of *Betula platyphylla* var. *japonica* seedlings. *Ecol Res* 2001;**16**:117–25.

Hassan SE, Hijri M, St-Arnaud M. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on trace metal uptake by sunflower plants grown on cadmium contaminated soil. *N Biotechnol* 2013;**30**:780–7.

Hassan SED, Boon E, St-Arnaud M *et al.* Molecular biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trace metal-polluted soils. *Mol Ecol* 2011;**20**:3469–83.

He L, Yang H, Yu Z *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungal phylogenetic groups differ in affecting host plants along heavy metal levels. *J Environ Sci (China)* 2014;**26**:2034–40.

Henson JM, Butler MJ, Day AW. The dark side of the mycelium: Melanins of phytopathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* 1999;**97**:447–71.

Herrera-estrella A, Olmedo-monfil V, Cortés-penagos C. Three decades of fungal transformation : key concepts and applications . *Methods in Molecular Biology*. 2004, 297–313.

Hilbert M, Voll LM, Ding Y *et al.* Indole derivative production by the root endophyte *Piriformospora indica* is not required for growth promotion but for biotrophic colonization of barley roots. *New Phytol* 2012;**196**:520–34.

Hildebrandt U, Regvar M, Bothe H. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 2007;**68**:139–46.

Hong L, Simon JD. Current understanding of the binding sites, capacity, affinity and biological significance of metals in melanin. *J Phys Chem B* 2007;**111**:7938–47.

Hryniewicz K, Baum C, Leinweber P *et al.* The significance of rotation periods for mycorrhiza formation in Short Rotation Coppice. *For Ecol Manage* 2010;**260**:1943–9.

- Hu J, Wu S, Wu F *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi enhance both absorption and stabilization of Cd by Alfred stonecrop (*Sedum alfredii* Hance) and perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) in a Cd-contaminated acidic soil. *Chemosphere* 2013;**93**:1359–65.
- Huang J., Chen J, Berti WR *et al.* Phytoremediation of lead-contaminated soils: Role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environ Sci Technol* 1997;**31**:800–5.
- Hung R, Lee S, Bennett JW. *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of Trichoderma volatile organic compounds. *Fungal Ecol* 2013;**6**:19–26.
- Hunt AJ, Anderson CWN, Bruce N *et al.* Phytoextraction as a tool for green chemistry. *Green Process Synth* 2014;**3**:3–22.

## I

- Ingrid L, Lounès-Hadj Sahraoui A, Frédéric L *et al.* Arbuscular mycorrhizal wheat inoculation promotes alkane and polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation: Microcosm experiment on aged-contaminated soil. *Environ Pollut* 2016;**213**:549–60.
- Ito H, Inouhe M, Tohoyama H *et al.* Characteristics of copper tolerance in *Yarrowia lipolytica*. 1998;**20**:773–80.

## J

- Järup L. Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull* 2003;**68**:167–82.
- Javot H, Pumplin N, Harrison MJ. Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: Transport properties and regulatory roles. *Plant, Cell Environ* 2007;**30**:310–22.
- Jentschke G, Godbold DL. Minireview Metal toxicity and ectomycorrhizas. *Physiol Plant* 2000;**109**:107–16.
- Jiang D, Zhu W, Wang Y *et al.* Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi: recent advances and new strategies. *Biotechnol Adv* 2013;**31**:1562–74.
- John J, Lundholm J, Kernaghan G. Colonization of green roof plants by mycorrhizal and root endophytic fungi. *Ecol Eng* 2014;**71**:651–9.
- Joner EJ, Briones R, Leyval C. Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant Soil* 2000;**226**:227–34.
- Joner EJ, Leyval C. Uptake of <sup>109</sup>Cd by roots and hyphae of a *Glomus mosseae*/*Trifolium subterraneum* mycorrhiza from soil amended with high and low concentrations of cadmium. *New Phytol* 1997;**135**:353–60.
- Jourand P, Ducousso M, Reid R *et al.* 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 Physiol* 2010;**30**:1311–9.

- Jumpponen A. Dark septate endophytes - Are they mycorrhizal? *Mycorrhiza* 2001;**11**:207–11.
- Jumpponen A, Trappe JM. Dark septate endophytes: A review with special reference to facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytol* 1998a;**140**:295–310.
- Jumpponen A, Trappe JM. Performance of *Pinus contorta* inoculated with two strains of root endophytic fungus, *Phialocephala fortinii*: effects of synthesis system and glucose concentration. *Can J Bot* 1998b;**76**:1205–13.
- Jumpponen A, Trappe JM, Mattson K. Mycorrhizal functioning of *Phialocephala fortinii* with *Pinus contorta* on glacier forefront soil: interactions with soil nitrogen and organic matter. *Mycorrhiza* 1998;**7**:261–5.
- Juwarkar AA, Nair A, Dubey K V. *et al.* Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils. *Chemosphere* 2007;**68**:1996–2002.

## K

- Kabata-pendias A. Soil – plant transfer of trace elements — an environmental issue. 2004;**122**:143–9.
- Kabata-Pendias A. *Trace Elements in Soils and Plants*. CRC Press, 2011.
- Kauppinen M, Raveala K, Wali PR *et al.* Contrasting preferences of arbuscular mycorrhizal and dark septate fungi colonizing boreal and subarctic *Avenella flexuosa*. *Mycorrhiza* 2014;**24**:171–7.
- Kern AL, Bonatto D, Dias JF *et al.* The importance of yeast Alr proteins in cadmium detoxification as indicated by particle-induced x-ray emission and phenotypic analyses. *X-Ray Spectrom* 2005a;**34**:355–8.
- Kern AL, Bonatto D, Dias JF *et al.* The function of Alr1p of *Saccharomyces cerevisiae* in cadmium detoxification: Insights from phylogenetic studies and particle-induced X-ray emission. *BioMetals* 2005b;**18**:31–41.
- Khan AL, Hamayun M, Ahmad N *et al.* Exophiala sp. LHL08 reprograms *Cucumis sativus* to higher growth under abiotic stresses. *Physiol Plant* 2011;**143**:329–43.
- Khan AL, Shinwari ZK, Kim Y *et al.* Role of endophyte *Chaetomium globosum* LK4 in growth of *Capisum annuum* by production of gibberellins and indole acetic acid. *Pakistan J Bot* 2012;**44**:1601–7.
- Khastini RO, Ogawara T, Sato Y *et al.* Control of Fusarium wilt in melon by the fungal endophyte, *Cadophora* sp. *Eur J Plant Pathol* 2014;**139**:333–42.
- Khouja HR. Identification par approches moléculaires de gènes impliqués dans la tolérance au stress oxydatif chez le champignon oidodendron maius. 2011.
- Khouja HR, Abbà S, Lacercat-Didier L *et al.* 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 Genet Biol* 2013;**52**:53–64.

- Knapp DG, Kovács GM. Interspecific metabolic diversity of root colonizing fungi reveals by enzyme activity tests. *FEMS Microbiol Ecol* 2016;**92**:fiw190.
- Knapp DG, Pintye A, Kovács GM. The dark side is not fastidious-dark septate endophytic fungi of native and invasive plants of semiarid sandy areas. *PLoS One* 2012;**7**:e32570.
- Knoop V, Groth-Malonek M, Gebert M *et al.* Transport of magnesium and other divalent cations: evolution of the 2-TM-GxN proteins in the MIT superfamily. *Mol Genet Genomics* 2005;**274**:205–16.
- Kogel K-H, Franken P, Hückelhoven R. Endophyte or parasite-what decides? *Curr Opin Plant Biol* 2006;**9**:358–63.
- Köhler A, Kuo A, Nagy LG *et al.* Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nat Genet* 2015;**47**:410–5.
- Kottke I, Beiter A, Weiss M *et al.* Heterobasidiomycetes form symbiotic associations with hepatics: Jungermanniales have sebacinoid mycobionts while *Aneura pinguis* (Metzgeriales) is associated with a *Tulasnella* species. *Mycol Res* 2003;**107**:957–68.
- Kramer R, Abraham WR. Volatile sesquiterpenes from fungi: What are they good for? *Phytochem Rev* 2012;**11**:15–37.
- Krpata D, Peintner U, Langer I *et al.* Ectomycorrhizal communities associated with *Populus tremula* growing on a heavy metal contaminated site. *Mycol Res* 2008;**112**:1069–79.
- Kunova A, Pizzatti C, Cortesi P. Impact of tricyclazole and azoxystrobin on growth, sporulation and secondary infection of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Pest Manag Sci* 2013;**69**:278–84.
- Kuo MJ, Alexander M. Inhibition of the lysis of fungi by melanins. *J Bacteriol* 1967;**94**:624–9.
- Lacercat-Didier L, Berthelot C, Errard A *et al.* New mutualistic fungal endophytes isolated from poplar roots display high metal tolerance. *Mycorrhiza* 2016;**26**:1–15.

## L

- Lamy I, Van Oort F, Dère C *et al.* Use of major- and trace-element correlation to assess metal migration in sandu luviosols irrigated with wastewater. *Eur J Soil Sci* 2006;**57**:731–40.
- Lanfranco L, Bolchi A, Ros EC *et al.* Differential expression of a metallothionein gene during the presymbiotic versus the symbiotic phase of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Plant Physiol* 2002;**130**:58–67.
- Leclercq A, Wan H, Abschütz A *et al.* Agrobacterium-mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Curr Genet* 2004;**45**:111–9.
- Lee JM, Gardner RC. Residues of the yeast ALR1 protein that are critical for magnesium uptake. *Curr Genet* 2006;**49**:7–20.

- Leita De Nobili M, Muhlbachova G, Mondini C *et al.* Bioavailability and effects of heavy metals on soil microbial biomass survival during laboratory incubation. *Biol Fertil Soils* 1995;**19**:103–8.
- Lemfack MC, Nickel J, Dunkel M *et al.* MVOC: A database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Res* 2014;**42**:744–8.
- Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature* 2013;**11**:371–84.
- Length F. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *Int J Phys Sci* 2007;**2**:112–8.
- Leoni C, Volpicella M, De Leo F *et al.* Genome walking in eukaryotes. *FEBS J* 2011;**278**:3953–77.
- Li H, Luo N, Zhang LJ *et al.* Do arbuscular mycorrhizal fungi affect cadmium uptake kinetics, subcellular distribution and chemical forms in rice? *Sci Total Environ* 2016;**571**:1183–1190.
- Li M, Gong X, Zheng J *et al.* Transformation of *Coniothyrium minitans*, a parasite of *Sclerotinia sclerotiorum*, with *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microbiol Lett* 2005;**243**:323–9.
- Li T, Liu MJ, Zhang XT *et al.* Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*. *Sci Total Environ* 2011;**409**:1069–74.
- Likar M, Regvar M. Application of temporal temperature gradient gel electrophoresis for characterisation of fungal endophyte communities of *Salix caprea* L. in a heavy metal polluted soil. *Sci Total Environ* 2009;**407**:6179–87.
- Likar M, Regvar M. Isolates of dark septate endophytes reduce metal uptake and improve physiology of *Salix caprea* L. *Plant Soil* 2013;**370**:593–604.
- Lim PH, Pisat NP, Gadhia N *et al.* Regulation of Alr1 Mg Transporter Activity by Intracellular Magnesium. 2011;**6**:e20896.
- Lin Y-F, Aarts MGM. The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. *Cell Mol life Sci* 2012;**69**:3187–206.
- Liu N, Chen G-Q, Ning G-A *et al.* *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation: An efficient tool for insertional mutagenesis and targeted gene disruption in *Harpophora oryzae*. *Microbiol Res* 2016;**182**:40–8.
- Liu Q, Parsons AJ, Xue H *et al.* Functional characterisation and transcript analysis of an alkaline phosphatase from the arbuscular mycorrhizal fungus *Funneliformis mosseae*. *Fungal Genet Biol* 2013;**54**:52–9.
- Liu T, Liu L, Jiang X *et al.* *Agrobacterium*-mediated transformation as a useful tool for the molecular genetic study of the phytopathogen *Curvularia lunata*. *Eur J Plant Pathol* 2010;**126**:363–71.

Luo Z Bin, Wu C, Zhang C *et al.* The role of ectomycorrhizas in heavy metal stress tolerance of host plants. *Environ Exp Bot* 2014;**108**:47–62.

## **M**

Ma Y, Prasad MN V, Rajkumar M *et al.* Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnol Adv* 2011;**29**:248–58.

MacDiarmid CW, Gardner RC. Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* magnesium transport system confers resistance to aluminum ion. *J Biol Chem* 1998;**273**:1727–32.

Maciá-Vicente JG, Jansson H-B, Talbot NJ *et al.* Real-time PCR quantification and live-cell imaging of endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*. *New Phytol* 2009;**182**:213–28.

Macías-Rubalcava ML, Hernández-Bautista BE, Oropeza F *et al.* Allelochemical Effects of volatile compounds and organic extracts from *Muscodor yucatanensis*, a tropical endophytic fungus from *Bursera simaruba*. *J Chem Ecol* 2010;**36**:1122–31.

Maguire ME. Magnesium transporters: properties, regulation and structure. *Front Biosci* 2006;**11**:3149–63.

Mahar A, Wang P, Ali A *et al.* Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review. *Ecotoxicol Environ Saf* 2016;**126**:111–21.

Mahmoud RS, Narisawa K. A new fungal endophyte, *Scolecobasidium humicola*, promotes tomato growth under organic nitrogen conditions. *PLoS One* 2013;**8**:e78746.

Mandyam K, Fox C, Jumpponen A. Septate endophyte colonization and host responses of grasses and forbs native to a tallgrass prairie. *Mycorrhiza* 2012;**22**:109–19.

Mandyam K, Jumpponen A. Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Stud Mycol* 2005;**53**:173–89.

Mandyam K, Loughin T, Jumpponen a. Isolation and morphological and metabolic characterization of common endophytes in annually burned tallgrass prairie. *Mycologia* 2010;**102**:813–21.

Mandyam KG, Jumpponen A. Unraveling the dark septate endophyte functions: insights from the arabidopsis model. In: Verma VC, Gange AC (eds.). *Advances in Endophytic Research*. Springer India, 2014, 115–41.

Mandyam KG, Jumpponen A. Mutualism parasitism paradigm synthesized from results of root-endophyte models. *Front Microbiol* 2015;**5**:1–13.

Mandyam KG, Roe J, Jumpponen A. Arabidopsis thaliana model system reveals a continuum of responses to root endophyte colonization. *Fungal Biol* 2013;**117**:250–60.

- Marchal C. Influence des champignons symbiotiques sur le transfert des métaux aux plantes. 2014.
- Margesin R, Cimadom J, Schinner F. Biological activity during composting of sewage sludge at low temperatures. *Int Biodeterior Biodegrad* 2006;**57**:88–92.
- De Maria S, Rivelli AR, Kuffner M *et al.* Interactions between accumulation of trace elements and macronutrients in *Salix caprea* after inoculation with rhizosphere microorganisms. *Chemosphere* 2011;**84**:1256–61.
- Martino E, Turnau K, Girlanda M *et al.* Ericoid mycorrhizal fungi from heavy metal polluted soils : their identification and growth in the presence of zinc ions. 2000;**104**:338–44.
- Maruthachalam K, Klosterman SJ, Kang S *et al.* Identification of pathogenicity-related genes in the vascular wilt fungus *Verticillium dahliae* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated T-DNA insertional mutagenesis. *Mol Biotechnol* 2011;**49**:209–21.
- Marx M, Wood M, Jarvis SC. A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils. *Soil Biol Biochem* 2001;**33**:1633–40.
- Massenssini AM, Bonduki VHA, Tótola MR *et al.* Arbuscular mycorrhizal associations and occurrence of dark septate endophytes in the roots of Brazilian weed plants. *Mycorrhiza* 2014;**24**:153–9.
- Mayerhofer MS, Kernaghan G, Harper KA. The effects of fungal root endophytes on plant growth: A meta-analysis. *Mycorrhiza* 2013;**23**:119–28.
- Meena VS, Maurya BR, Verma JP. Does a rhizospheric microorganism enhance K<sup>+</sup> availability in agricultural soils? *Microbiol Res* 2014;**169**:337–47.
- Meier S, Borie F, Bolan N *et al.* Phytoremediation of metal-polluted soils by arbuscular mycorrhizal fungi. *Crit Rev Environ Sci Technol* 2012;**42**:741–75.
- Melin E. Über die mykorrhizapilze von *Pinus sylvestris* L. und *Picea abies* (L.) karst. (*vorläufige mitteilungen*). *Sven Bot Tidskr* 1921;**15**:192–203.
- Mench M, Lepp N, Bert V *et al.* Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: Outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *J Soils Sediments* 2010;**10**:1039–70.
- Meng Y, Patel G, Heist M *et al.* A systematic analysis of T-DNA insertion events in *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet Biol* 2007;**44**:1050–64.
- Meyer V. Genetic engineering of filamentous fungi-progress, obstacles and future trends. and future trends. *Biotechnol Adv* 2008;**26**:177–85.
- Michielse CB, Hooykaas PJJ, van den Hondel CAMJJ *et al.* Agrobacterium-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Curr Genet* 2005;**48**:1–17.
- Michielse CB, Salim K, Ragas P *et al.* Development of a system for integrative and stable transformation of the zygomycete *Rhizopus oryzae* by Agrobacterium-mediated DNA transfer. *Mol Genet Genomics* 2004;**271**:499–510.

- Della Monica IF, Saparrat MCN, Godeas AM *et al.* The co-existence between DSE and AMF symbionts affects plant P pools through P mineralization and solubilization processes. *Fungal Ecol* 2015;**17**:10–7.
- Morel JL, Chenu C, Lorenz K. Ecosystem services provided by soils of urban, industrial, traffic, mining, and military areas (SUITMAs). *J Soils Sediments* 2014;**15**:1659–66.
- Mucha J. Changes in hyphal morphology and activity of phenoloxidases during interactions between selected ectomycorrhizal fungi and two species of *Trichoderma*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2011;**100**:155–60.
- Mullins ED, Kang S. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. *Cell Mol Life Sci* 2001;**58**:2043–52.
- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 1962;**15**:473–97.

## N

- Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review. *Environ Chem Lett* 2010;**8**:199–216.
- Narisawa K, Kawamata H, Currah RS *et al.* Suppression of Verticillium wilt in eggplant by some fungal root endophytes. *Eur J Plant Pathol* 2002;**108**:103–9.
- Narisawa K, Ohki KT, Hashiba T. Suppression of clubroot formation in Chinese cabbage by the root endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*. *Plant Pathol* 2000;**49**:141–6.
- Naznin HA, Kimura M, Miyazawa M *et al.* Analysis of volatile organic compounds emitted by plant growth-promoting fungus *Phoma* sp. GS8-3 for growth promotion effects on tobacco. *Microbes Environ* 2013;**28**:42–9.
- Newsham KK. *Phialophora graminicola*, a dark septate fungus, is a beneficial associate of the grass *Vulpia ciliata* ssp. *ambigua*. *New Phytol* 1999;**144**:517–24.
- Newsham KK. A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. *New Phytol* 2011;**190**:783–93.
- Ni Z, Kim E-D, Ha M *et al.* Altered circadian rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids. *Nature* 2009;**457**:327–31.
- Niegowski D, Eshaghi S. The CorA family: structure and function revisited. *Cell Mol Life Sci* 2007;**64**:2564–74.
- Nordgren A, Bååth E. Activity along a heavy metal gradient microfungi and microbial activity along a heavy metal gradient. 1983;**45**:1829–37.

## O

- Oberwinkler F, Riess K, Bauer R *et al.* Enigmatic Sebaciniales. *Mycol Prog* 2013;**12**:1–27.

- Olsrud M, Michelsen A. Ergosterol content in ericaceous hair roots correlates with dark septate endophytes but not with ericoid mycorrhizal colonization. 2007;**39**:1218–21.
- van Opijnen T, Bodi KL, Camilli A. Tn-seq: high-throughput parallel sequencing for fitness and genetic interaction studies in microorganisms. *Nat Methods* 2009;**6**:767–72.
- Osobová M, Urban V, Jedelský PL *et al.* Three metallothionein isoforms and sequestration of intracellular silver in the hyperaccumulator *Amanita strobiliformis*. *New Phytol* 2011;**190**:916–26.

## P

- Pachlewski R, Pachlewska J. Studies on symbiotic properties of mycorrhizal fungi of pine (*Pinus sylvestris* L.) with the aid of the method of mycorrhizal synthesis in pure cultures on agar. 1974:228.
- Pagani MA, Casamayor A, Serrano R *et al.* Disruption of iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* by high zinc levels: A genome-wide study. *Mol Microbiol* 2007;**65**:521–37.
- Pal AK, Gajjar DU, Vasavada AR. DOPA and DHN pathway orchestrate melanin synthesis in *Aspergillus* species. *Med Mycol* 2013;**52**:1–9.
- Pardo AG, Hanif M, Raudaskoski M *et al.* Genetic transformation of ectomycorrhizal fungi mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mycol Res* 2002;**106**:132–7.
- Paul D, Park K. Identification of volatiles produced by *Cladosporium cladosporioides* CL-1, a fungal biocontrol agent that promotes plant growth. *Sensors (Basel)* 2013;**13**:13969–77.
- Payandeh J, Pai EF. A structural basis for Mg<sup>2+</sup> homeostasis and the CorA translocation cycle. *EMBO J* 2006;**25**:3762–73.
- Pelfrêne A, Douay F, Richard A *et al.* Assessment of potential health risk for inhabitants living near a former lead smelter. Part 2: Site-specific human health risk assessment of Cd and Pb contamination in kitchen gardens. *Environ Monit Assess* 2013;**185**:2999–3012.
- Peralta-Videa JR, Lopez ML, Narayan M *et al.* The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: implications for the food chain. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;**41**:1665–77.
- Pereira E, Coelho V, Tavares RM *et al.* Effect of competitive interactions between ectomycorrhizal and saprotrophic fungi on *Castanea sativa* performance. *Mycorrhiza* 2012;**22**:41–9.
- Peterson RL, Wagg C, Pautler M. Associations between microfungal endophytes and roots: do structural features indicate function? *Botany* 2008;**86**:445–56.
- Phielor R, Voit A, Kothe E. Microbially supported phytoremediation of heavy metal contaminated soils: Strategies and applications. In: Schippers A, Glombitza F, Sand W (eds.). *Geobiotechnology I*. Springer Berlin Heidelberg, 2013, 211–35.

- Phillips JM, Hayman DS. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc* 1970;**55**:158–61.
- Pihet M, Vandeputte P, Tronchin G *et al.* Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia. *BMC Microbiol* 2009;**9**:177.
- Pisat NP, Pandey A, Macdiarmid CW. MNR2 regulates intracellular magnesium storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2009;**183**:873–84.
- Porras-Alfaro A, Bayman P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annu Rev Phytopathol* 2011;**49**:291–315.

## R

- Rajapaksha RMCP, Bååth E, Ba E. Metal toxicity affects fungal and bacterial activities in soil differently metal toxicity affects fungal and bacterial activities in soil differently. *Appl Environ Microbiol* 2004;**70**:2966–73.
- Rajkumar M, Sandhya S, Prasad MN V *et al.* Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnol Adv* 2012;**30**:1562–74.
- Rasanayagam S, Jeffries P. Production of acid is responsible for antibiosis by some ectomycorrhizal fungi. *Mycol Res* 1992;**96**:971–6.
- Read DJ, Haselwandter K. Observations on the mycorrhizal status of some alpine plant communities. *New Phytol* 1981;**88**:341–52.
- Reanne DC, Macphee DG, Pressing J. Intrinsic noise and the design of the genetic machinery. *Australian J Biol Sci* 1983;**36**:77–90.
- Redon PO, Béguiristain T, Leyval C. Differential effects of AM fungal isolates on *Medicago truncatula* growth and metal uptake in a multimetallic (Cd, Zn, Pb) contaminated agricultural soil. *Mycorrhiza* 2009;**19**:187–95.
- Regvar M, Likar M, Piltaver A *et al.* Fungal community structure under goat willows (*Salix caprea* L.) growing at metal polluted site: the potential of screening in a model phytostabilisation study. *Plant Soil* 2010;**330**:345–56.
- Reineke A, Bischoff-Schaefer M, Rondot Y *et al.* Microsatellite markers to monitor a commercialized isolate of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in different environments: Technical validation and first applications. *Biol Control* 2014;**70**:1–8.
- Reininger V, Grunig CR, Sieber TN. Host species and strain combination determine growth reduction of spruce and birch seedlings colonized by root-associated dark septate endophytes. *Environ Microbiol* 2012;**14**:1064–76.
- Reininger V, Schlegel M. Analysis of the *Phialocephala subalpina* transcriptome during colonization of its host plant *Picea abies*. *PLoS One* 2016;**11**:1–16.

- Reininger V, Sieber TN. Mycorrhiza reduces adverse effects of dark septate endophytes (DSE) on growth of conifers. *PLoS One* 2012;**7**:e42865.
- Reza MH, Shah H, Manjrekar J *et al.* Magnesium uptake by CorA transporters is essential for growth, development and infection in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS One* 2016;**11**:e0159244.
- Rodriguez RJ, Jr JFW, Arnold AE *et al.* Fungal endophytes : diversity and functional roles. *New Phytol* 2009;**182**:314–30.
- Romero-Martinez R, Wheeler MH, Guerrero-Plata A *et al.* Biosynthesis and function of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect Immun* 2000;**68**:3696–703.
- Ruotolo R, Marchini G, Ottonello S. Membrane transporters and protein traffic networks differentially affecting metal tolerance: a genomic phenotyping study in yeast. *Genome Biol* 2008;**9**:R67.
- Ruotsalainen AL, Markkola A, Kozlov M V. Root fungal colonisation in *Deschampsia flexuosa*: Effects of pollution and neighbouring trees. *Environ Pollut* 2007;**147**:723–8.

## S

- Sá-Correia I, dos Santos SC, Teixeira MC *et al.* Drug: H<sup>+</sup> antiporters in chemical stress response in yeast. *Trends Microbiol* 2009;**17**:22–31.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method - a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;**4**:406–25.
- Salkowski E. Ueber das verhalten des skatocarbonsaur im organismus. *Z physiol Chem* 1885;**9**:23–33.
- Saravesi K, Ruotsalainen AL, Cahill JF. Contrasting impacts of defoliation on root colonization by arbuscular mycorrhizal and dark septate endophytic fungi of *Medicago sativa*. *Mycorrhiza* 2014;**24**:239–45.
- Sarikaya AT, Akman G, Temizkan G. Nickel resistance in fission yeast associated with the magnesium transport system. *Mol Biotechnol* 2006;**32**:139–46.
- Sato T, Ezawa T, Cheng W *et al.* Release of acid phosphatase from extraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus*. *Soil Sci Plant Nutr* 2015;**61**:269–74.
- Scervino JM, Gottlieb a., Silvani V a. *et al.* Exudates of dark septate endophyte (DSE) modulate the development of the arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) *Gigaspora rosea*. *Soil Biol Biochem* 2009;**41**:1753–6.
- Schliemann W, Ammer C, Strack D. Metabolite profiling of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry* 2008;**69**:112–46.
- Schnurer J, Rosswall T. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Appl Environ Microbiol* 1982;**43**:1256–61.
- Schulz B, Boyle C. The endophytic continuum. *Mycol Res* 2005;**109**:661–86.

- Selosse MA, Dubois MP, Alvarez N. Do Sebaciniales commonly associate with plant roots as endophytes? *Mycol Res* 2009;**113**:1062–9.
- Selosse MA, Setaro S, Glatard F *et al.* Sebaciniales are common mycorrhizal associates of Ericaceae. *New Phytol* 2007;**174**:864–78.
- Selosse MA, Le Tacon F. The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends Ecol Evol* 1998;**13**:15–20.
- Serfling A, Wirsel SGR, Lind V *et al.* Performance of the biocontrol fungus *Piriformospora indica* on wheat under greenhouse and field conditions. *Phytopathology* 2007;**97**:523–31.
- Shahabivand S, Maivan HZ, Goltapeh EM *et al.* The effects of root endophyte and arbuscular mycorrhizal fungi on growth and cadmium accumulation in wheat under cadmium toxicity. *Plant Physiol Biochem* 2012;**60**:53–8.
- Shao Y, Ding Y, Zhao Y *et al.* Characteristic analysis of transformants in T-DNA mutation library of *Monascus ruber*. *World J Microbiol Biotechnol* 2009;**25**:989–95.
- Shefferson RP, Kull T, Tali K. Mycorrhizal interactions of orchids colonizing Estonian mine tailings hills. *Am J Bot* 2008;**95**:156–64.
- Shen M, Zhao D-K, Qiao Q *et al.* Identification of Glutathione S-Transferase (GST) genes from a dark septate endophytic fungus (*Exophiala pisciphila*) and their expression patterns under varied metals stress. *PLoS One* 2015;**10**:e0123418.
- Siegel SM, Galun M, Siegel BZ. Filamentous fungi as metal biosorbents: A review. *Water Air Soil Pollut* 1990;**53**:335–44.
- Sirrenberg A, Göbel C, Grond S *et al.* *Piriformospora indica* affects plant growth by auxin production. *Physiol Plant* 2007;**131**:581–9.
- Smith SE, Jakobsen I, Grønlund M *et al.* Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant Physiol* 2011;**156**:1050–7.
- Smith SE, Read DJ. *Mycorrhizal Symbiosis*. London: Academic Press, 2008.
- Sonjak S, Udovič M, Wraber T *et al.* Diversity of halophytes and identification of arbuscular mycorrhizal fungi colonising their roots in an abandoned and sustained part of Sečovlje salterns. *Soil Biol Biochem* 2009;**41**:1847–56.
- Soteras F, Renison D, Becerra AG. Growth response, phosphorus content and root colonization of *Polylepis australis* Bitt. seedlings inoculated with different soil types. *New For* 2013;**44**:577–89.
- Sterckeman T, Douay F, Proix N *et al.* Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. *Environ Pollut* 2000;**107**:377–89.

- Sterckeman T, Douay F, Proix N *et al.* Assessment of the contamination of cultivated soils by eighteen trace elements in the north of France. *Water Air Soil Pollut* 2002;**135**:173–94.
- Stoyke G, Currah RS. Endophytic fungi from the mycorrhizae of alpine ericoid plant. *Can J Bot* 1991;**69**:347–52.
- Strandberg GW, Shumate SE, Parrott JR. Microbial cells as biosorbents for heavy metals : accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 1981;**41**:237–45.
- Strobel GA, Dirkse E, Sears J *et al.* Volatile antimicrobials from *Muscodora albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* 2001;**147**:2943–50.
- Su Z-Z, Mao L-J, Li N *et al.* Evidence for biotrophic lifestyle and biocontrol potential of dark septate endophyte *Harpophora oryzae* to rice blast disease. *PLoS One* 2013;**8**:e61332.
- Sukumar P, Legué V, Vayssières A *et al.* Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant-microorganism interactions. *Plant Cell Environ* 2013;**36**:909–19.
- Szekely GJ, Rizzo ML. Hierarchical clustering via joint between- within distances: Extending Ward's minimum variance method. *J Classif* 2005;**22**:151–83.

## I

- Takacs T, Voros I. Effect of metal non-adapted arbuscular mycorrhizal fungi on Cd, Ni and Zn uptake by Ryegrass. *Acta agronomica hungarica* 2003;**51**:347–54.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D *et al.* MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;**30**:2725–9.
- Tellenbach C, Grünig CR, Sieber TN. Suitability of quantitative real-time PCR to estimate the biomass of fungal root endophytes. *Appl Environ Microbiol* 2010;**76**:5764–72.
- Tellenbach C, Sieber TN. Do colonization by dark septate endophytes and elevated temperature affect pathogenicity of oomycetes? *FEMS Microbiol Ecol* 2012;**82**:157–68.
- Tellenbach C, Sumarah MW, Grünig CR *et al.* Inhibition of Phytophthora species by secondary metabolites produced by the dark septate endophyte *Phialocephala europaea*. *Fungal Ecol* 2013;**6**:12–8.
- Terhonen E, Keriö S, Sun H *et al.* Endophytic fungi of Norway spruce roots in boreal pristine mire, drained peatland and mineral soil and their inhibitory effect on *Heterobasidion parviporum* in vitro. *Fungal Ecol* 2014;**9**:17–26.
- Terhonen E, Sipari N, Asiegbu FO. Inhibition of phytopathogens by fungal root endophytes of Norway spruce. *Biol Control* 2016;**99**:53–63.
- Thonar C, Erb a, Jansa J. Real-time PCR to quantify composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities--marker design, verification, calibration and field validation. *Mol Ecol Resour* 2012;**12**:219–32.

- Thorsen M, Jacobson T, Vooijs R *et al.* Glutathione serves an extracellular defence function to decrease arsenite accumulation and toxicity in yeast. *Mol Microbiol* 2012;**84**:1177–88.
- Torta L, Lo Piccolo S, Piazza G *et al.* Lulwoana sp., a dark septate endophyte in roots of *Posidonia oceanica* (L.) Delile seagrass. *Plant Biol* 2015;**17**:505–11.
- Tóth G, Hermann T, Da Silva MR *et al.* Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. *Environ Int* 2016;**88**:299–309.
- Tripathi P, Srivastava S. Development and characterization of nickel accumulating mutants of *Aspergillus nidulans*. *Indian J Microbiol* 2007a;**47**:241–50.
- Tripathi P, Srivastava S. Mechanism to combat cobalt toxicity in cobalt resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. *Indian J Microbiol* 2007b;**47**:336–44.
- Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherches et méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (eds.). *Mycorrhizes : Physiologie et Génétique*. Dijon: INRA, 1986, 217–20.
- Tsai H, Wheeler MH, Chang YUNC. A developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. 1999;**181**:6469–77.
- Tsuji G, Fujii S, Fujihara N *et al.* *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for random insertional mutagenesis in *Colletotrichum lagenarium*. *J Gen Plant Pathol* 2003;**69**:230–9.
- Turgeman T, Lubinsky O, Roth-Bejerano N *et al.* The role of pre-symbiotic auxin signaling in ectendomycorrhiza formation between the desert truffle *Terfezia boudieri* and *Helianthemum sessiliflorum*. *Mycorrhiza* 2016;**26**:287–97.
- Turnau K, Ryszka P, Gianinazzi-Pearson V *et al.* Identification of arbuscular mycorrhizal fungi in soils and roots of plants colonizing zinc wastes in southern Poland. *Mycorrhiza* 2001;**10**:169–74.
- Tzima AK, Paplomatas EJ, Schoina C *et al.* Successful *Agrobacterium* mediated transformation of *Thielaviopsis basicola* by optimizing multiple conditions. *Fungal Biol* 2014;**118**:675–82.

## U

- Upton R, Read DJ, Newsham KK. Nitrogen form influences the response of *Deschampsia antarctica* to dark septate root endophytes. *Mycorrhiza* 2009;**20**:1–11.
- Usuki F, Narisawa K. A mutualistic symbiosis between a dark septate endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*, and a nonmycorrhizal plant, Chinese cabbage. *Mycologia* 2007;**99**:175–84.
- Utmazian MNDS, Schweiger P, Sommer P *et al.* Influence of *Cadophora finlandica* and other

microbial treatments on cadmium and zinc uptake in willows grown on polluted soil. *Plant soil Environ* 2007;**53**:158–66.

## V

- Vági P, Knapp DG, Kósa A *et al.* Simultaneous specific in planta visualization of root-colonizing fungi using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Mycorrhiza* 2014;**24**:259–66.
- Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Curr Top Med Chem* 2005;**12**:1161–208.
- Vasanthakumar A, DeAraujo A, Mazurek J *et al.* Pyomelanin production in *Penicillium chrysogenum* is stimulated by L-tyrosine. *Microbiology* 2015;**161**:1211–8.
- Vaz ABM, Sampedro I, Siles JA *et al.* Arbuscular mycorrhizal colonization of *Sorghum vulgare* in presence of root endophytic fungi of *Myrtus communis*. *Appl Soil Ecol* 2012;**61**:288–94.
- Vellinga EC. Lepiotaceous fungi in California, U.S.A. -2 *Lepiota rhodophylla* sp. nov. *Mycotaxon* 2006;**98**:205–11.
- Vida TA, Emr SD. A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol* 1995;**128**:779–92.
- Vig K, Megharaj M, Sethunathan N *et al.* Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: A review. *Adv Environ Res* 2003;**8**:121–35.
- Vincent D, Kohler A, Claverol S *et al.* Secretome of the free-living mycelium from the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *J Proteome Res* 2012;**11**:157–71.
- Violante A, Cozzolino V, Perelomov L *et al.* Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments. *J soil Sci plant Nutr* 2010;**10**:268–92.
- Vogel-Mikuš K, Regvar. Arbuscular mycorrhiza as a tolerance strategy in metal contaminated soils: prospect in phytoremediations. In: Daniel Rhodes (ed.). *New Topics in Environmental Research*. Nova Science, 2013, 37–56.
- Vohník M, Albrechtová J, Vosátka M. The inoculation with *Oidodendron maius* and *Phialocephala fortinii* alters phosphorus and nitrogen uptake , foliar C : N ratio and root biomass distribution in *Rhododendron Azurro*. 2005;**40**:87–96.
- Vohník M, Borovec O, Kolařík M. Communities of cultivable root mycobionts of the seagrass *Posidonia oceanica* in the northwest mediterranean sea are dominated by a hitherto undescribed pleosporalean dark septate endophyte. *Microb Ecol* 2015;**71**:1–10.
- Vohník M, Pánek M, Fehrer J *et al.* Experimental evidence of ericoid mycorrhizal potential within Serendipitaceae (Sebacinales). *Mycorrhiza* 2016 ;**12**:1–16.
- Vrålstad T, Myrhe E, Schumasher T. Molecular diversity and phylogenetic affinities of symbiotic root-associated ascomycetes of the Helotiales in burnt and metal polluted habitats. *New Phytol* 2002;**155**:131–48.

W

- Waldron KJ, Rutherford JC, Ford D *et al.* Metalloproteins and metal sensing. *Nature* 2009;**460**:823–30.
- Wan X, Lei M, Chen T. Cost-benefit calculation of phytoremediation technology for heavy-metal-contaminated soil. *Sci Total Environ* 2016;**563–564**:796–802.
- Wang C, Guan X, Wang H *et al.* *Agrobacterium tumefaciens* -mediated transformation of *Valsa mali*: An efficient tool for random insertion mutagenesis. *Sci World J* 2013;**2013**:1–11.
- Wang CJK, Wilcox HE. New Species of Ectendomycorrhizal and Pseudomycorrhizal Fungi: *Phialophora finlandica*, *Chloridium paucisporum*, and *Phialocephala fortinii*. *Mycologia* 1985;**77**:951–8.
- Wang H, Qiao Y, Chai B *et al.* Identification and molecular characterization of the homogentisate pathway responsible for pyomelanin production, the major melanin constituents in *Aeromonas media* WS. *PLoS One* 2015;**10**:e0120923.
- Wang J, Li T, Liu G *et al.* Unraveling the role of dark septate endophyte (DSE) colonizing maize (*Zea mays*) under cadmium stress: physiological, cytological and genic aspects. *Nature Sci Reports* 2016;**6**:1–12.
- Wang Y, Shi J, Wang H *et al.* The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. *Ecotoxicol Environ Saf* 2007;**67**:75–81.
- Waqas M, Khan AL, Kamran M *et al.* Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. *Molecules* 2012;**17**:10754–73.
- Wei YF, Li T, Li LF *et al.* Functional and transcript analysis of a novel metal transporter gene EpNramp from a dark septate endophyte (*Exophiala pisciphila*). *Ecotoxicol Environ Saf* 2016;**124**:363–8.
- Weijn A, Bastiaan-net S, Wichers HJ *et al.* Melanin biosynthesis pathway in *Agaricus bisporus* mushrooms. *Fungal Genet Biol* 2013;**55**:42–53.
- West TP, Strohfus B. Effect of manganese on polysaccharide production and cellular pigmentation in the fungus *Aureobasidium pullulans*. *World J Microbiol Biotechnol* 1997;**13**:233–5.
- Wheeler BMH. Comparisons of fungal melanin biosynthesis in ascomycetous, imperfect and basidiomycetous fungi. *Trans Br Mycol Soc* 1983;**81**:29–36.
- Whipps JM. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot* 2001;**52**:487–511.
- White C, Sayer JA, Gadd GM. Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: Key biogeochemical processes for treatment of contamination. *FEMS Microbiol Rev*

1997;**20**:503–16.

White T, Bruns T, Lee S *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, SNinsky JJ WT (ed.). *PCR-Protocol and Applications - a Laboratory Manual*. New York: Academic Press, 1990, 315–22.

Wilson D. Endophyte : The evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* 1995;**73**:274–6.

Wright SF. A fluorescent antibody assay for hyphae and glomalin from arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 2000;**226**:171–7.

Wu L, Di DW, Zhang D *et al.* Frequent problems and their resolutions by using thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL-PCR) to clone genes in Arabidopsis T-DNA tagged mutants. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2015;**29**:260–7.

## X

Xu R, Li T, Cui H *et al.* Diversity and characterization of Cd-tolerant dark septate endophytes (DSEs) associated with the roots of Nepal alder (*Alnus nepalensis*) in a metal mine tailing of southwest China. *Appl Soil Ecol* 2015;**93**:11–8.

Xu X-H, Su Z-Z, Wang C *et al.* The rice endophyte *Harpophora oryzae* genome reveals evolution from a pathogen to a mutualistic endophyte. *Sci Rep* 2014;**4**:1–9.

Xue C, Wu D, Condon BJ *et al.* Efficient gene knockout in the maize pathogen *Setosphaeria turcica* using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Phytopathology* 2013;**103**:641–7.

## Y

Yan JF, Broughton SJ, Yang SL *et al.* Do endophytic fungi grow through their hosts systemically? *Fungal Ecol* 2015;**13**:53–9.

Youngchim S. Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol* 2004;**53**:175–81.

Yu T, Nassuth A, Peterson RL. Characterization of the interaction between the dark septate fungus *Phialocephala fortinii* and *Asparagus officinalis* roots. *Can J Microbiol* 2001;**47**:741–53.

## Z

Zadworny M, Werner A, Idzikowska K. Behaviour of the hyphae of *Laccaria laccata* in the presence of *Trichoderma harzianum* *in vitro*. *Mycorrhiza* 2004;**14**:401–5.

Zhan F, He Y, Li T *et al.* Tolerance and antioxidant response of a dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*, to cadmium stress. *Bull Environ Contam Toxicol* 2014;**94**:96–102.

Zhan F, He Y, Li Y *et al.* Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in a dark

- septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*. *Environ Sci Pollut Res* 2015;**22**:17897–905.
- Zhan F, He Y, Yang Y *et al*. Effects of tricyclazole on cadmium tolerance and accumulation characteristics of a dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*. *Bull Environ Contam Toxicol* 2016;**96**:235–41.
- Zhan F, He Y, Zu Y *et al*. Characterization of melanin isolated from a dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*. *World J Microbiol Biotechnol* 2011;**27**:2483–9.
- Zhang P, Liu TT, Zhou PP *et al*. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of a taxol-producing endophytic fungus, *Cladosporium cladosporioides* MD2. *Curr Microbiol* 2011;**62**:1315–20.
- Zhang Q, Zhang J, Yang L *et al*. Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in *Brassica napus*. *Biol Control* 2014;**72**:98–108.
- Zhang Y, Li T, Zhao Z-W. Colonization characteristics and composition of dark septate endophytes (DSE) in a lead and zinc slag heap in southwest China. *Soil Sediment Contam An Int J* 2013;**22**:532–45.
- Zhang Y, Zhang Y, Liu M *et al*. Dark septate endophyte (DSE) fungi isolated from metal polluted soils: their taxonomic position, tolerance, and accumulation of heavy metals *in vitro*. *J Microbiol* 2008;**46**:624–32.
- Zhao D, Li T, Wang J *et al*. Diverse strategies conferring extreme cadmium (Cd) tolerance in the dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*: Evidence from RNA-seq data. *Microbiol Res* 2015;**170**:27–35.
- Zou Y, Xie C, Fan G *et al*. Optimization of ultrasound-assisted extraction of melanin from *Auricularia auricula* fruit bodies. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2010;**11**:611–5.
- Zuccaro A, Lahrmann U, Güldener U *et al*. Endophytic life strategies decoded by genome and transcriptome analyses of the mutualistic root symbiont *Piriformospora indica*. *PLoS Pathog* 2011;**7**:e1002290.



## Liste des figures :

|                                                                                                                                                                                                                                                      |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>Figure I-1. Tableau périodique de Mendeleïev.....</i>                                                                                                                                                                                             | <i>19</i> |
| <i>Figure I-2 : Les différentes sources des ETM dans les sols (modifié d'après Baize, 1997).....</i>                                                                                                                                                 | <i>21</i> |
| <i>Figure I-3 : Proportions des différentes sources agricoles d'ETM dans les sols (source : ADEME, 2012).....</i>                                                                                                                                    | <i>22</i> |
| <i>Figure I-4 : Les formes des ETM (e.g. solubles, complexés) et leur localisation dans les sols (e.g. matière organique, minéraux, solution du sol) (d'après Baize et Tercé 2002).....</i>                                                          | <i>23</i> |
| <i>Figure I-5 : Effets essentiels et toxiques des ETM à l'échelle moléculaire et cellulaire (d'après Lemire et al. 2013).....</i>                                                                                                                    | <i>28</i> |
| <i>Figure I-6 : Courbe de réponse « dose-effet biologique » illustrant les effets des changements de concentrations phytodisponibles en éléments essentiels (gauche) et non essentiels (droite) chez une plante (d'après Lin et Aarts 2012).....</i> | <i>29</i> |
| <i>Figure I-7 : Stratégies des plantes vis à vis des métaux (modifié d'après Hunt et al. 2014).....</i>                                                                                                                                              | <i>30</i> |
| <i>Figure I-8 : Effet de la concentration en Cu dans le sol sur la fréquence d'isolement des champignons (modifié d'après Nordgren et Bååth 1983).....</i>                                                                                           | <i>32</i> |
| <i>Figure I-9 : Les différentes techniques de phytoremédiation des sols pollués par les ETM.....</i>                                                                                                                                                 | <i>34</i> |
| <i>Figure I-10 : Le principe du phytomanagement d'un sol pollué (modifié d'après Evangelou et Deram 2014).....</i>                                                                                                                                   | <i>36</i> |
| <i>Figure I-11 : Les différents mécanismes microbiens qui stimulent la croissance végétale.....</i>                                                                                                                                                  | <i>38</i> |
| <i>Figure I-12 : Les différents types de mycorhizes (modifié d'après Selosse et Le Tacon 1998).....</i>                                                                                                                                              | <i>40</i> |
| <i>Figure I-13 : Diversité des structures formées par les champignons endophytes.....</i>                                                                                                                                                            | <i>43</i> |
| <i>Figure I-14 : Caractéristiques morphologiques des DSE.....</i>                                                                                                                                                                                    | <i>45</i> |
| <i>Figure I-15 : Equilibre parasitisme - mutualisme s'établissant entre une plante et un endophyte (modifié d'après Schulz et Boyle 2005).....</i>                                                                                                   | <i>46</i> |
| <i>Figure I-16 : Effet plante-, espèce- et souche- dépendant chez les DSE (modifié d'après Mandyam et al. 2013; Mandyam et Jumpponen 2015).....</i>                                                                                                  | <i>47</i> |
| <i>Figure I-17 : Expression différentielle des gènes de plants d'A. thaliana Kin-1 inoculés par Microdochium bolleyi (modifié d'après Mandyam et Jumpponen 2014).....</i>                                                                            | <i>48</i> |
| <i>Figure I-18 : Exemple d'effet biocontrôle des souches DSE (d'après Terhonen et al. 2016).....</i>                                                                                                                                                 | <i>51</i> |
| <i>Figure I-19 : Mécanismes de tolérance aux ETM des champignons (d'après Bellion et al. 2006).....</i>                                                                                                                                              | <i>56</i> |
| <i>Figure I-20 : Les principaux groupements fonctionnels et molécules chélatantes permettant la biosorption des ETM chez les champignons (d'après Gadd et al. 2012).....</i>                                                                         | <i>57</i> |
| <i>Figure I-21 : Exemple de structures de molécules de mélanine.....</i>                                                                                                                                                                             | <i>58</i> |
| <i>Figure I-22 : Les transporteurs de métaux présents chez les eucaryotes (d'après Eide 2006; Blaby-Haas et Merchant 2012).....</i>                                                                                                                  | <i>61</i> |
| <i>Figure I-23 : La famille des transporteurs CorA chez la levure (d'après Knoop et al. 2005; Pisat et al. 2009).....</i>                                                                                                                            | <i>62</i> |
| <i>Figure I-24 : Réactions enzymatiques permettant la protection contre les agents oxydants.....</i>                                                                                                                                                 | <i>63</i> |
| <i>Figure I-25 : Déroulement de la thèse et problématiques abordées dans les chapitres.....</i>                                                                                                                                                      | <i>66</i> |
| <i>Figure II-1 : Carte du plasmide pGEM®-T.....</i>                                                                                                                                                                                                  | <i>79</i> |
| <i>Figure II-2 : Carte du plasmide pFAT-GFP (d'après Fitzgerald et al. 2003).....</i>                                                                                                                                                                | <i>79</i> |
| <i>Figure II-3 : Cartes des plasmides PYES 2 et PYES 2-GFP.....</i>                                                                                                                                                                                  | <i>80</i> |
| <i>Figure II-4 : Dispositifs utilisés lors de l'étude de l'effet des composés organiques volatiles sécrétés par les DSE sur la croissance du tabac.....</i>                                                                                          | <i>82</i> |
| <i>Figure II-5 : Paramètres étudiés lors des tests faisant intervenir des plantes.....</i>                                                                                                                                                           | <i>83</i> |
| <i>Figure II-6 : Protocole d'agrotransformation.....</i>                                                                                                                                                                                             | <i>86</i> |
| <i>Figure II-7: Schéma récapitulatif de l'extraction de mélanine à partir de mycélium.....</i>                                                                                                                                                       | <i>88</i> |
| <i>Figure II-8 : Sites d'hybridation des amorces ciblant l'opéron ribosomique des champignons.....</i>                                                                                                                                               | <i>93</i> |
| <i>Figure II-9: Principe de la TAIL-PCR.....</i>                                                                                                                                                                                                     | <i>94</i> |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figure II-10 : Ligation d'un fragment d'intérêt dans un vecteur.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 100 |
| <b>Figure II-11: Expression hétérologue d'un ADN d'intérêt dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (D'après Gietz et al. 1992).</b>                                                                                                                                                                                                                                                            | 102 |
| <b>Figure II-12 : Principe de la complémentation hétérologue dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 103 |
| <b>Figure II-13 : Démarches utilisées pour étudier les analyses univariées et multivariées.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 106 |
| <b>Figure III-1 : Résumé des capacités des DSE à synthétiser de l'auxine, des molécules organiques volatiles phytostimulantes et à stimuler la croissance végétale.</b>                                                                                                                                                                                                                     | 110 |
| <b>Figure III-2 : Résumé des capacités des DSE à s'associer avec des souches ectomycorhiziennes et à diminuer la croissance de souches phytopathogènes in vitro.</b>                                                                                                                                                                                                                        | 111 |
| <b>Figure III-3. Morphological characteristics of DSEs in roots or in pure cultures.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 119 |
| <b>Figure III-4 : Maximum Likelihood phylogram showing the placement of strains based on ITS1-5.8S-ITS2 sequences.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                      | 120 |
| <b>Figure III-5: Effect of fungal inoculation on plant growth.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 129 |
| <b>Figure III-6: Parameters to evaluate the interactions between the fungal strains.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 137 |
| <b>Figure III-7: PCA analysis of the distribution of the different studied parameters.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 138 |
| <b>Figure III-8: Heatmap showing the dual interactions between endophytic, ectomycorrhizal and phytopathogenic strains.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                 | 139 |
| <b>Figure III-9: Dual inoculations between endophytic, ectomycorrhizal, and phytopathogenic strains.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 140 |
| <b>Figure IV-1 : Schéma récapitulatif des effets de trois DSE sur la croissance du bouleau et du peuplier dans deux sols contaminés par des ETM.</b>                                                                                                                                                                                                                                        | 148 |
| <b>Figure IV-2 : Influence de l'inoculation de plantules de ray-grass soit par un champignon endomycorhizien (<i>F. mosseae</i> AMB06.11), un DSE (<i>Cadophora</i> sp. Fe06) ou un consortium des deux, sur la croissance et la concentration en éléments majeurs et en traces de la plante, la teneur en éléments biodisponibles et l'activité enzymatique dans le sol de Pierrelaye.</b> | 149 |
| <b>Figure IV-3: Effect of DSE inoculation on birch and poplar growth.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 157 |
| <b>Figure IV-4: Fungal colonization of ryegrass inoculated by <i>F. mosseae</i> (AM) or <i>Cadophora</i> sp. (DSE), or by a dual inoculation.</b>                                                                                                                                                                                                                                           | 172 |
| <b>Figure IV-5: Morphological characteristics of DSEs in ryegrass roots.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 174 |
| <b>Figure IV-6: Effect of <i>F. mosseae</i> (AM) and <i>Cadophora</i> sp. (DSE) inoculation on the growth of ryegrass.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                  | 174 |
| <b>Figure IV-7: Effects of <i>F. mosseae</i> and <i>Cadophora</i> sp. inoculation on soil enzymatic activities.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                         | 177 |
| <b>Figure V-1: Neighbor-Joining phylogram showing the phylogenetic relationships between the strains based on ITS1-5.8S-ITS2 sequences and colonies of the DSE strains used in the present study.</b>                                                                                                                                                                                       | 196 |
| <b>Figure V-2: Fluorescence microscopy analysis of selected DSE transformants.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 198 |
| <b>Figure V-3: Transformation efficiency of eight DSE strains.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 199 |
| <b>Figure V-4: Strain-dependent time course of the appearance of transformants on the selective medium.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 200 |
| <b>Figure V-5: Effects of copper and tricyclazole on the pigmentation of the DSE strains.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 202 |
| <b>Figure V-6: MNR2 gene and design of primers.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 209 |
| <b>Figure V-7: Presence of T-DNA in fungal DNA and TAIL-PCR analysis.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 214 |
| <b>Figure V-8: Growth and tolerance level of the Zn-sensitive mutants.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 215 |
| <b>Figure V-9: Elemental content of <i>Leptodontidium</i> sp. Zn-sensitive mutants.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 217 |
| <b>Figure V-10: Sequence comparison of functionally characterized MNR2 transporters from various fungal species.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                        | 219 |
| <b>Figure V-11: Alignment of MNR2 protein sequences from <i>Leptodontidium</i> sp. PMI_412, <i>Cadophora</i> sp. DSE 1049 (DSE) and <i>Leptodontidium</i> sp. Me07.</b>                                                                                                                                                                                                                     | 220 |
| <b>Figure V-12: Alignement of ITS region between <i>Leptodontidium</i> sp. Me07, <i>Leptodontidium</i> sp. PMI_412 and <i>Cadophora</i> sp. DSE 1049 (DSE).</b>                                                                                                                                                                                                                             | 220 |
| <b>Figure V-13: Phylogenetic tree of the CorA-like Mg transporters in the Eumycota.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 221 |

|                                                                                                                                                                           |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Figure V-14: Subcellular localization of the LpMNR2:GFP fusion protein in yeast by fluorescence microscopy.....</b>                                                    | <b>222</b> |
| <b>Figure V-15: Complementation of the <math>\Delta mnr2</math> yeast mutant on selective media.....</b>                                                                  | <b>224</b> |
| <b>Figure V-16: Melanin synthesis pathways occurring in DSE fungi.....</b>                                                                                                | <b>232</b> |
| <b>Figure V-17: Inhibition of melanin synthesis by tricyclazole and kojic acid.....</b>                                                                                   | <b>235</b> |
| <b>Figure V-18: Tolerance to TE of albino and melanin-inhibited strains. ....</b>                                                                                         | <b>238</b> |
| <b>Figure VI-1 : Diagramme de Venn résumant l'ensemble des capacités PGP relevées chez chacune des souches DSE étudiées.....</b>                                          | <b>253</b> |
| <b>Figure VI-2 : Schéma récapitulatif des mécanismes utilisés par les DSE pour promouvoir la croissance des plantes hôtes.....</b>                                        | <b>256</b> |
| <b>Figure VI-3 : Schéma bilan présentant les mécanismes de tolérance aux ETM et ceux permettant la résistance à l'agrotransformation obtenus dans le chapitre V. ....</b> | <b>261</b> |
| <b>Figure VI-4 : Résultats principaux obtenus lors de cette thèse.....</b>                                                                                                | <b>265</b> |

## Liste des tableaux :

---

|                                                                                                                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>Tableau I-1 : Évolution de la production mondiale en ETM (d'après Alloway 2012).</i>                                                                            | 22  |
| <i>Tableau I-2 : Valeurs seuils dans les eaux de consommation autorisées par l'OMS en 2006 (exprimées en mg/l).</i>                                                | 24  |
| <i>Tableau I-3 : Teneurs maximales (en mg/kg de matière sèche) en Pb et Cd autorisées dans les aliments (d'après EC n° 466/2001).</i>                              | 25  |
| <i>Tableau I-4 : Norme française relative aux boues d'épuration et teneurs maximales en ETM dans les sols (en mg/kg matière sèche) (Arrêté du 2 février 1998).</i> | 26  |
| <i>Tableau I-5 : Abondance microbienne d'un sol non pollué et d'un sol pollué par du Pb et du Cd (Nagpur, Inde) (d'après Juwarkar et al. 2007)</i>                 | 31  |
| <i>Tableau I-6 : Les différentes classes d'endophytes (d'après Rodriguez et al. 2009)</i>                                                                          | 43  |
| <i>Tableau I-7 : Études récentes sur l'effet des champignons DSE sur la croissance de souches fongiques phytopathogènes</i>                                        | 53  |
| <i>Tableau I-8. Etudes de l'effet d'une inoculation par des champignons DSE sur la tolérance des plantes aux ETM</i>                                               | 54  |
| <i>Tableau II-1 : Caractéristiques physico-chimiques des sols utilisés dans ce manuscrit</i>                                                                       | 74  |
| <i>Tableau II-2 : Souches fongiques et oomycètes utilisées au cours de cette thèse.</i>                                                                            | 76  |
| <i>Tableau II-3 : Composition des milieux utilisés pour la culture des champignons.</i>                                                                            | 77  |
| <i>Tableau II-4 : Composition des milieux LB et LBinduction</i>                                                                                                    | 77  |
| <i>Tableau II-5 : Composition des milieux YPD et SD-uracile</i>                                                                                                    | 78  |
| <i>Tableau II-6 : Composition du milieu Murashige et Skoog (d'après Murashige et Skoog 1962)</i>                                                                   | 82  |
| <i>Tableau II-7 : Conditions de PCR pour les amplifications utilisant la Phire II polymérase.</i>                                                                  | 92  |
| <i>Tableau II-8 : Condition PCR pour les amplifications réalisées avec la Taq polymerase.</i>                                                                      | 92  |
| <i>Tableau II-9 : Conditions de qRT-PCR pour l'amplification des régions ITS (DSE) et 28S (AM)</i>                                                                 | 95  |
| <i>Tableau II-10: Conditions de TAIL-PCR</i>                                                                                                                       | 96  |
| <i>Tableau II-11 : Conditions de digestion par les enzymes FastDigest BamHI et HindIII.</i>                                                                        | 97  |
| <i>Tableau II-12 : Amorces nucléotidiques utilisées lors de cette thèse.</i>                                                                                       | 99  |
| <i>Tableau II-13 : Composition du milieu SOC.</i>                                                                                                                  | 101 |

## Liste des tables:

|                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Table III-1 : Colonization of <i>B. pendula</i>, <i>E. globulus</i> and <i>L. perenne</i> roots by DSEs.</b>                                                                                                                            | 122 |
| <b>Table III-2: Utilization of different carbon substrates by the fungal strains.</b>                                                                                                                                                      | 124 |
| <b>Table III-3: Metal tolerance of the DSE strains.</b>                                                                                                                                                                                    | 125 |
| <b>Table III-4: Plant growth-promoting properties of the DSE strains.</b>                                                                                                                                                                  | 126 |
| <b>Table III-5: Identification of VOCs synthesized by strains Fe06 and Pr30 by SPME-GCMS.</b>                                                                                                                                              | 127 |
| <b>Table III-6: Two-way ANOVA results comparing the effects of plant, strain, plant x strain interactions on root colonization by DSEs (colonization frequency (F%), colonization intensity by hyphae (H%), and microsclerotia (MS%)).</b> | 127 |
| <b>Table III-7: Taxonomic affiliation of DSE, ECM and pathogenic strains.</b>                                                                                                                                                              | 137 |
| <b>Table IV-1: Physico-chemical characteristics of the soils.</b>                                                                                                                                                                          | 152 |
| <b>Table IV-2: Three-way ANOVA results comparing the effects of soil, inoculation, inoculation x soil interactions and interaction between these.</b>                                                                                      | 155 |
| <b>Table IV-3: Malonaldehyde, pigment contents and root colonization by DSEs.</b>                                                                                                                                                          | 158 |
| <b>Table IV-4: Effect of dark septate endophyte inoculation on elemental concentrations in shoots.</b>                                                                                                                                     | 160 |
| <b>Table IV-5: Soil physico-chemical characteristics.</b>                                                                                                                                                                                  | 168 |
| <b>Table IV-6: Effect of <i>Cadophora</i> sp. (DSE) and <i>F. mosseae</i> (AM) inoculation on the concentration of trace and major elements in shoots.</b>                                                                                 | 176 |
| <b>Table IV-7: Effect of <i>Cadophora</i> sp. (DSE) and <i>F. mosseae</i> (AM) on the available fraction of trace and major elements in soil.</b>                                                                                          | 176 |
| <b>Table V-1: Dark septate endophytic strains used in the present study.</b>                                                                                                                                                               | 197 |
| <b>Table V-2: Relationship between melanin contents and the transformation efficiency of four DSE strains.</b>                                                                                                                             | 202 |
| <b>Table V-3: Primers used in this study.</b>                                                                                                                                                                                              | 209 |
| <b>Table V-4: Minimal inhibitory concentrations for Co, Mn, Ni, and Zn for <i>Leptodontidium</i> sp. (WT) and transformant T1.</b>                                                                                                         | 223 |
| <b>Table V-5: Growth and elemental content in mycelia of T1 and WT exposed to Zn.</b>                                                                                                                                                      | 225 |
| <b>Table V-6: Identified proteins in <i>Leptodontidium</i> sp. and <i>Cadophora</i> sp. genomes putatively involved in melanin biosynthesis.</b>                                                                                           | 234 |
| <b>Table V-7: Effect of tricyclazole and kojic acid on melanin accumulation and fungal growth.</b>                                                                                                                                         | 236 |
| <b>Table V-8: Effect of trace elements on melanin content in DSE mycelia.</b>                                                                                                                                                              | 236 |
| <b>Table V-9: Effect of TE on mycelial growth of DSE in presence or not of tricyclazole.</b>                                                                                                                                               | 237 |
| <b>Table V-10: Impact of tricyclazole on As, Cd and Zn tolerance of six DSE strains.</b>                                                                                                                                                   | 239 |
| <b>Table V-11: TE tolerance and melanin content in mycelia of wild-type and isogenic low-pigmented strains.</b>                                                                                                                            | 240 |
| <b>Table V-12: Content of TE (mg/kg DW) in DSE mycelia treated or not by tricyclazole.</b>                                                                                                                                                 | 240 |



## VII. Annexes

**Annexe 1. New mutualistic fungal endophytes isolated from poplar roots display high metal tolerance**

**Annexe 2 : Species used in the phylogenetic analysis (ITS1-5.8S-ITS2) with corresponding GenBank accession numbers.**

**Annexe 3: Species used in the compressed clades of the phylogenetic analysis, and corresponding GenBank accession numbers.**

**Annexe 4 : Statistical analyses of elemental concentration of Zn-sensitive transformants.**

**Annexe 5: Blast results identifying *Cadophora* and *Leptodontidium* proteins compare with model sequences.**

**Annexe 2 : Species used in the phylogenetic analysis (ITS1-5.8S-ITS2) with corresponding GenBank accession numbers.**

| Accession numbers | Species                           | Accession numbers | Species                             |
|-------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------------------------|
| AF214576          | <i>Leptodontidium orchidicola</i> | AF187912          | <i>Microdochium nivale</i>          |
| GQ302678          | <i>Leptodontidium orchidicola</i> | HM596871          | <i>Cladosporium</i> sp.             |
| FN393420          | <i>Leptodontidium</i> sp.         | HM148218          | <i>Cladosporium tenuissimum</i>     |
| KF850364          | <i>Phialophora mustea</i>         | FJ210539          | <i>Cladosporium</i> sp.             |
| JN123359          | <i>Phialophora mustea</i>         | HM852082          | <i>Cladosporium cladosporioides</i> |
| JN859252          | <i>Cadophora</i> sp.              | FJ904921          | <i>Cladosporium cladosporioides</i> |
| FJ666350          | <i>Cadophora</i> sp.              | FJ372389          | <i>Lophiostoma</i> sp.              |
| GU212389          | <i>Cadophora</i> sp.              | AJ972793          | <i>Lophiostoma</i> sp.              |
| AY249069          | <i>Cadophora luteo-olivacea</i>   | AB433275          | <i>Lophiostoma macrostomum</i>      |
| DQ404348          | <i>Cadophora luteo-olivacea</i>   | AB369268          | <i>Lophiostoma sagittiforme</i>     |
| AB190402          | <i>Cadophora malorum</i>          | KP183999          | <i>Periconia macrospinoso</i>       |
| DQ317328          | <i>Cadophora malorum</i>          | KP128003          | <i>Periconia</i> sp.                |
| JX406525          | <i>Phialophora mustea</i>         | GQ370379          | <i>Saccharicola bicolor</i>         |
| DQ068992          | <i>Cadophora finlandica</i>       | AF439462          | <i>Saccharicola taiwanensis</i>     |
| AY249074          | <i>Cadophora finlandica</i>       | HM535410          | <i>Phialophora</i> sp.              |
| AY249075          | <i>Phialocephala dimorphosa</i>   | EF540756          | <i>Phialophora europea</i>          |
| AF486212          | <i>Phialocephala dimorphosa</i>   | AB190379          | <i>Phialophora olivacea</i>         |
| AY249076          | <i>Phialocephala fortinii</i>     | AF147492          | <i>Exophiala dermatidis</i>         |
| AY078144          | <i>Phialocephala fortinii</i>     | DQ826738          | <i>Exophiala dermatidis</i>         |
| AM502264          | <i>Microdochium bolleyi</i>       | DQ826739          | <i>Exophiala pisciphila</i>         |
| AJ279454          | <i>Microdochium bolleyi</i>       | AM176667          | <i>Exophiala salmonis</i>           |
| FJ439588          | <i>Microdochium</i> sp.           | AY213652          | <i>Exophiala salmonis</i>           |

|          |                            |          |                              |
|----------|----------------------------|----------|------------------------------|
| AB272124 | <i>Microdochium nivale</i> | KF061284 | <i>Piriformospora indica</i> |
|----------|----------------------------|----------|------------------------------|

**Annexe 3: Species used in the compressed clades of the phylogenetic analysis, and corresponding GenBank accession numbers.**

| Accession numbers | Clades                      | Species                            |
|-------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| KP183999          | <i>Periconia</i>            | <i>Periconia macrospinoso</i>      |
| KP128003          | <i>Periconia</i>            | <i>Periconia</i> sp.               |
| DQ068992          | <i>Cadophora finlandica</i> | <i>Cadophora finlandica</i>        |
| AY249074          | <i>Cadophora finlandica</i> | <i>Cadophora finlandica</i>        |
| AB190379          | <i>Phialophora</i>          | <i>Phialophora olivacea</i>        |
| HM535410          | <i>Phialophora</i>          | <i>Phialophora</i> sp.             |
| EF540756          | <i>Phialophora</i>          | <i>Phialophora europaea</i>        |
| AF147492          | <i>Exophiala</i>            | <i>Exophiala dermatidis</i>        |
| DQ826738          | <i>Exophiala</i>            | <i>Exophiala dermatidis</i>        |
| DQ826739          | <i>Exophiala</i>            | <i>Exophiala pisciphila</i>        |
| AM176667          | <i>Exophiala</i>            | <i>Exophiala salmonis</i>          |
| AY213652          | <i>Exophiala</i>            | <i>Exophiala salmonis</i>          |
| AY249076          | <i>Phialocephala</i>        | <i>Phialocephala fortinii</i>      |
| AY078144          | <i>Phialocephala</i>        | <i>Phialocephala fortinii</i>      |
| AY249075          | <i>Phialocephala</i>        | <i>Phialocephala dimorphospora</i> |
| AY486121          | <i>Phialocephala</i>        | <i>Phialocephala dimorphospora</i> |

# Annexe 4 : Statistical analyses of elemental concentration of Zn-sensitive transformants.

|   |             |     |       |       |       |       |       |       |       |       |      |
|---|-------------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| A | Control     |     | Ca    | Cu    | Fe    | K     | Mg    | Mn    | P     | S     | Zn   |
|   |             | T1  | 0.31  | 0.07  | 0.13  | 0.19  | *     | *     | *     | 0.54  | ***  |
|   |             | T5  | 0.09  | *     | **    | 0.07  | 0.68  | 0.72  | 0.06  | 0.07  | 0.16 |
|   |             | T6  | 0.06  | ***   | ***   | 0.19  | ***   | 0.25  | **    | **    | 0.14 |
|   |             | T7  | *     | ***   | **    | *     | ***   | *     | ***   | **    | **   |
|   |             | T12 | 0.10  | ***   | ***   | ***   | ***   | ***   | ***   | ***   | *    |
|   |             | T8  | *     | *     | ***   | ***   | ***   | ***   | ***   | **    | **   |
|   |             | T9  | *     | ***   | 0.12  | 0.08  | *     | 0.28  | 0.43  | 0.89  | 0.69 |
|   |             | T11 | 0.92  | 0.10  | ***   | ***   | ***   | **    | ***   | 0.12  | **   |
|   |             | T10 | 0.08  | 0.14  | *     | ***   | **    | 0.17  | **    | 0.21  | **   |
|   |             | T2  | 0.21  | ***   | **    | ***   | **    | ***   | ***   | *     | *    |
|   |             | T4  | 0.58  | 0.06  | ***   | ***   | ***   | *     | ***   | *     | *    |
|   |             | T3  | 0.11  | ***   | **    | 0.95  | 0.28  | ***   | *     | *     | 0.49 |
|   |             | T13 | 0.99  | 0.03  | 0.09  | ***   | 0.18  | ***   | *     | **    | 0.48 |
|   |             | T14 | 0.08  | ***   | 0.94  | 0.14  | ***   | 0.18  | **    | *     | 0.32 |
| B | 1 mM Zn     |     | Ca    | Cu    | Fe    | K     | Mg    | Mn    | P     | S     | Zn   |
|   |             | T13 | 0.33  | **    | 0.08  | **    | 0.87  | ***   | 0.45  | 0.22  | *    |
|   |             | T5  | 0.25  | **    | ***   | *     | **    | 0.71  | 0.68  | 0.47  | **   |
|   |             | T7  | 0.35  | ***   | ***   | **    | ***   | 0.06  | *     | **    | ***  |
|   |             | T6  | **    | **    | ***   | **    | **    | 0.23  | *     | 0.13  | **   |
|   |             | T12 | **    | ***   | ***   | ***   | ***   | **    | **    | **    | ***  |
|   |             | T9  | *     | *     | 0.22  | ***   | **    | 0.10  | 0.08  | 0.42  | **   |
|   |             | T1  | 0.44  | 0.73  | *     | *     | ***   | **    | 0.20  | 0.12  | ***  |
|   |             | T14 | 0.38  | ***   | *     | ***   | ***   | **    | **    | *     | ***  |
|   |             | T10 | *     | **    | 0.07  | ***   | ***   | 0.29  | **    | 0.31  | ***  |
|   |             | T3  | 0.07  | *     | 0.64  | 0.26  | *     | ***   | 0.07  | *     | 0.1  |
|   |             | T2  | 0.18  | *     | **    | ***   | ***   | *     | **    | 0.07  | *    |
|   |             | T4  | *     | *     | **    | ***   | ***   | **    | **    | 0.76  | ***  |
|   |             | T8  | 0.15  | ***   | ***   | ***   | **    | 0.31  | **    | 0.17  | ***  |
|   |             | T11 | 0.38  | **    | *     | ***   | **    | 0.6   | 0.40  | **    | **   |
| C | Fold change |     | Ca    | Cu    | Fe    | K     | Mg    | Mn    | P     | S     | Zn   |
|   |             | T5  | *     | 0.115 | ***   | 0.651 | **    | *     | *     | 0.329 | ***  |
|   |             | T1  | 0.242 | 0.06  | 0.08  | *     | *     | 0.13  | **    | *     | ***  |
|   |             | T6  | ***   | 0.479 | ***   | **    | 0.48  | *     | 0.389 | 0.268 | ***  |
|   |             | T7  | 0.409 | 0.198 | ***   | *     | **    | **    | ***   | **    | ***  |
|   |             | T8  | 0.06  | **    | ***   | **    | 0.06  | ***   | **    | 0.901 | ***  |
|   |             | T9  | *     | 0.564 | 0.213 | **    | **    | **    | 0.62  | 0.06  | ***  |
|   |             | T10 | **    | 0.506 | 0.142 | *     | **    | **    | 0.38  | 0.924 | ***  |
|   |             | T11 | **    | *     | *     | 0.07  | ***   | 0.396 | ***   | **    | ***  |
|   |             | T12 | *     | 0.09  | 0.827 | ***   | 0.08  | 0.205 | ***   | 0.158 | ***  |
|   |             | T13 | 0.14  | 0.36  | 0.07  | **    | 0.466 | **    | *     | *     | ***  |
|   |             | T14 | 0.179 | **    | *     | **    | 0.202 | **    | 0.08  | **    | ***  |
|   |             | T2  | 0.07  | 0.08  | ***   | **    | **    | ***   | **    | 0.272 | ***  |
|   |             | T3  | **    | 0.258 | 0.781 | 0.561 | **    | ***   | 0.05  | 0.07  | ***  |
|   |             | T4  | ***   | 0.683 | ***   | ***   | 0.119 | ***   | *     | 0.335 | ***  |
|   |             | WT  | 0.72  | 0.158 | 0.07  | **    | 0.164 | **    | 0.146 | *     | ***  |

Asterisks represent significant differences between a given transformant and wild-type (A and B) or between treatments (no Zn, 1 mM Zn)(C). \* : P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001

**Annexe 5: Blast results identifying *Cadophora* and *Leptodontidium* proteins compare with model sequences.**

| Origine of sequence            | Protein ID (query) | Protein ID Lepto (E-value, % identity)                                                                     | Protein ID Cado (e-value, % identity)                                                                                                        |
|--------------------------------|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Agaricus bisporus</i>       | 191532             | -                                                                                                          | 518430 (e <sup>-60</sup> , 39%); 448694 (e <sup>-53</sup> , 43.9%)                                                                           |
|                                | 193694             | 422416 (e <sup>-53</sup> , 52.3%)                                                                          | 147006 (e <sup>-52</sup> , 52.3%)                                                                                                            |
|                                | 226049             | 388317 (e <sup>-149</sup> , 62.5%)                                                                         | 514557 (e <sup>-148</sup> , 62.5%)                                                                                                           |
|                                | 191838             | 435401 (e <sup>-63</sup> , 49.4%); 525973 (e <sup>-63</sup> , 40.9%)                                       | 517077 (e <sup>-64</sup> , 48.8%); 402501 (e <sup>-52</sup> , 39.3%); 477092 (e <sup>-64</sup> , 40.2%)                                      |
|                                | 194055             | 374110 (e <sup>-65</sup> , 39.3%); 525002 (e <sup>-52</sup> , 43.8%)                                       | -                                                                                                                                            |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> | XP_002557734       | 348899 (e <sup>-162</sup> , 70.9%); 334798 (e <sup>-149</sup> , 67.5%)                                     | 455878 (e <sup>-149</sup> , 68.6%)                                                                                                           |
| <i>Aspergillus fumigatus</i>   | CAA46695           | 526612 (e <sup>-0</sup> , 49.3%); 474795 (e <sup>-0</sup> , 49.1%); 473902 (e <sup>-0</sup> , 42.7%)       | 606172 (e <sup>-0</sup> , 48.8%); 477463 (e <sup>-87</sup> , 23.7%); 482874 (e <sup>-76</sup> , 38.1%)                                       |
|                                | CAA46695           |                                                                                                            | 558525 (e <sup>-78</sup> , 40.6%); 658146 (e <sup>-66</sup> , 36.8%); 476551 (e <sup>-76</sup> , 41.4%)                                      |
|                                | CAA46695           |                                                                                                            | 639029 (e <sup>-65</sup> , 36.6%)                                                                                                            |
|                                | AAF03314           | 350316 (e <sup>-74</sup> , 57.2%); 345904 (e <sup>-63</sup> , 44.7%)                                       | 445556 (e <sup>-72</sup> , 56.4%)                                                                                                            |
|                                | BAA13009           | 380224 (e <sup>-89</sup> , 70.8%); 516759 (e <sup>-60</sup> , 53.6%); 430560 (e <sup>-66</sup> , 59.6%)    | 557078 (e <sup>-90</sup> , 71.3%); 648036 (e <sup>-54</sup> , 50%)                                                                           |
|                                | AAF03353           | 528691 (e <sup>-129</sup> , 49.6%); 107642 (e <sup>-119</sup> , 48.6%); 350614 (e <sup>-127</sup> , 43.3%) | 413886 (e <sup>-122</sup> , 49.1%); 474444 (e <sup>-125</sup> , 49.2%); 445897 (e <sup>-132</sup> , 43%)                                     |
|                                |                    | 370797, e <sup>-114</sup> , 47.5%; 308936, e <sup>-117</sup> , 46.0%; 509146, e <sup>-91</sup> , 44.6%     | 594672 (e <sup>-119</sup> , 47.7%); 471895 (e <sup>-108</sup> , 45.8%); 56531 (e <sup>-83</sup> , 46.7%)                                     |
| <i>Aeromonas media</i>         | 615554453          | 382671 (e <sup>-74</sup> , 44.9%); 422393 (e <sup>-68</sup> , 38.6%); 404642 (e <sup>-60</sup> , 37.8%)    | 486122 (e <sup>-73</sup> , 43.9%); 415422 (e <sup>-67</sup> , 38.9%); 457200 (e <sup>-59</sup> , 39.3%)<br>662248 (e <sup>-51</sup> , 38.6%) |



**Résumé :**

Le phytomanagement est une méthode de gestion de sites pollués basée sur la capacité des plantes à séquestrer les polluants. L'utilisation de symbiotes fongiques, tels que les champignons mycorhiziens, peut représenter un atout dans le but d'augmenter la production de biomasse, de surcroît éventuellement moins contaminée. Cependant, d'autres endophytes racinaires sont également présents dans les sols pollués mais ces champignons ont été peu étudiés dans un tel contexte de phytomanagement. C'est notamment le cas des endophytes bruns septés (DSE) qui, d'après la littérature, pourraient stimuler la croissance végétale et augmenter la protection des plantes contre les effets toxiques générés par les éléments traces métalliques (ETM). Cette thèse se déroule dans le cadre du projet LORVER (Valorisation des délaissés par la production de biomasse non alimentaire) et vise à comprendre l'interaction « plantes -DSE- sols pollués » et sa valorisation potentielle en phytomanagement. A ces fins, des champignons DSE isolés de racines de peupliers issues de sols pollués par des ETM ont été caractérisés. Ils appartiennent aux genres *Leptodontidium*, *Phialophora*, *Cadophora* et *Phialocephala*. Leur capacité à coloniser des plantes herbacées et ligneuses et à stimuler la croissance végétale (e.g. auxine, molécules volatiles) a été évaluée. Trois de ces souches ont ensuite été inoculées à des plantes en présence d'ETM. Dans certains cas, la croissance végétale a été stimulée et une augmentation de la teneur en chlorophylles, en P et en K, ou une réduction de la teneur en Cd dans les parties aériennes ont été mises en évidence. Puis, la souche la plus efficace sur la croissance végétale, *Cadophora* sp. Fe06, a été utilisée dans un double inoculum avec *Funneliformis mosseae*, une souche endomycorhizienne, chez du ray-grass en présence d'ETM. Cette association a permis une diminution de la teneur en Cd dans les feuilles. Enfin, les mécanismes impliqués dans la tolérance aux ETM chez les DSE ont ensuite été examinés via le criblage d'une banque de mutants d'insertions aléatoires, puis via l'étude du rôle de la mélanine sur la tolérance et l'accumulation des ETM par les DSE. Les résultats mettent en évidence l'importance d'un transporteur MNR2 dans la tolérance aux ETM et l'absence de relation entre la teneur en mélanine et la tolérance aux ETM chez les DSE. Cependant, cette molécule joue un rôle clef dans l'accumulation de l'As et du Cd par les mycelia. Au final, ce travail met en évidence la complexité des interactions s'établissant entre les plantes et les DSE sous stress métallique. Ces interactions sont influencées par de nombreux paramètres (e.g. propriétés édaphiques, souches, plantes hôtes). Néanmoins, l'utilisation de DSE, de part leur capacité à coloniser de nombreuses plantes dans différents sols et à stimuler leur croissance, pourrait représenter un atout considérable pour des opérations de phytomanagement assistées par des inocula fongiques.

**Mots clés :** endophytes bruns septés, éléments traces métalliques, tolérance, pollution, *Leptodontidium* sp., champignons, plante, phytomanagement, zinc, mélanine.

**Abstract:**

Phytomanagement is a handling method of contaminated sites based on the ability of plants to sequester pollutants. Fungi such as mycorrhizal fungi could favor plant growth in contaminated sites; however other root endophytic fungi are also present in polluted soils but were far less studied in the context of phytomanagement. Dark septate endophytes (DSE) were reported to improve plant tolerance against metallic trace elements (TE). The present work is part of the LORVER project (valorization of derelict soils by non-food biomass production) and aims to understand the "plant-DSE-TE" interactions and their potential use in phytomanagement. DSE were isolated from poplar roots growing on TE-contaminated soils and characterized. They belong to *Leptodontidium*, *Phialophora*, *Cadophora* and *Phialocephala* genera. Their abilities to colonize woody and herbaceous plants, and to improve plant growth (e.g. auxin, volatile compounds) were assessed. *Leptodontidium* sp., *Phialophora mustea* and *Cadophora* sp. were inoculated to birch and poplar in TE-contaminated soils. *Leptodontidium* sp. improved plant growth with an increase in chlorophyll content, and P and K concentrations, whereas *Cadophora* sp. decreased Cd concentration in shoots of birch. Then, the most efficient strain, *Cadophora* sp. Fe06, was used with *Funneliformis mosseae*, an endomycorrhizal fungus, to co-inoculate ryegrass in a TE-polluted soil. The co-inoculation leads to the decrease of Cd concentration in shoots. Finally, the mechanisms involved in TE-tolerance by DSE were studied through the screening of a collection of *Leptodontidium* sp. insertional random-mutants and an evaluation of the role of melanin against TE stress. Results showed (i) the importance of the MNR2 transporter in Zn tolerance and (ii) that there was no relationship between melanin content and TE tolerance. However, this pigment played a key role in As and Cd accumulation. To conclude, the present work highlights the complexity of the interactions between DSE and plants under metallic stress. These interactions were influenced by different parameters including plant species, DSE

strains, and soil properties. Nevertheless, the ability of DSE to colonize a broad spectrum of plants in different soils and to promote plant growth, suggest that DSE could represent a substantial benefit for the fungus-assisted phytomanagement of contaminated soils.

**Key-words:** dark septate endophytes, trace elements, tolerance, pollution, *Leptodontidium* sp., fungi, plant, phytomanagment, zinc, melanin.