HAL
open science

Participation au projet LORVER et caractérisation de souches fongiques endophytes issues de sols pollués aux métaux

Charlotte Berthelot

To cite this version:

Charlotte Berthelot. Participation au projet LORVER et caractérisation de souches fongiques endophytes issues de sols pollués aux métaux. Sciences de l'environnement. 2013. hal-01779199

HAL Id: hal-01779199

https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01779199

Submitted on 24 Oct 2019

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

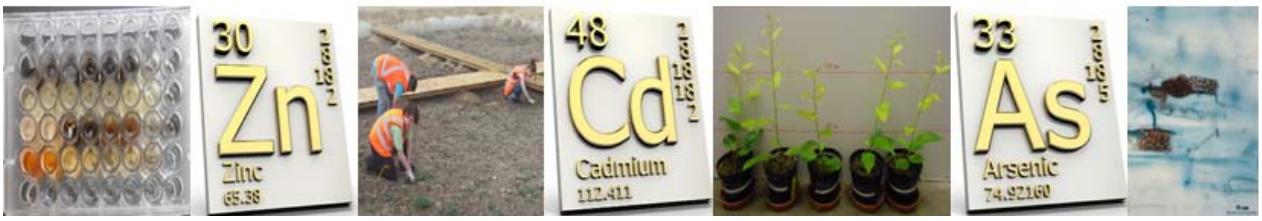
2012-2013

MASTER FAGE

Biologie et Ecologie pour la Forêt, l'Agronomie et l'Environnement

Spécialité
BIPE

Participation au projet LORVER et caractérisation de souches fongiques endophytes issues de sols pollués aux métaux



BERTHELOT Charlotte

Mémoire de stage, soutenu à Nancy le 3 septembre 2013

Encadrement : Damien Blaudez (Maître de conférences)

Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux
UMR 7360 CNRS-université de Lorraine
Campus Aiguillettes –Vandoeuvre lès Nancy

Remerciements

Par ces quelques lignes, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement de ce stage en espérant n'avoir oublié personne…

Je tiens tout d'abord à remercier Damien Blaudez de m'avoir conseillé et orienté pour que je mène à bien mon stage tout en me laissant une grande part de liberté et de responsabilité.

Mais aussi Corinne Leyval qui m'a accepté en stage au LIEC pendant ces six derniers mois.

Un clin d'œil également à tous les autres doctorants, post-docs, chercheurs et enseignant-chercheurs, ingénieurs, permanents du laboratoire, pour leur conseils, astuces et coup de mains.
Je n'oublie pas non plus les personnels administratifs et techniques, Jojo, Christine, Hervé, Cécile et tous les autres…. Un grand merci pour votre aide.

À vous tous, vous avez fait du labo un lieu très convivial et accueillant.

Ces six mois au LIEC furent un vrai plaisir.

Je tiens également à remercier, les membres extérieurs du LIEC qui ont participé au projet LORVER : Catherine Sirguey, Laurent Didier, Valéry Collin, Sophie Guimont et toute l'équipe du STEVAL. Tous les moments passés sur le terrain, sous le soleil ou la pluie, ont été très agréables.

Un grand merci à Clémence qui a eu le courage de venir m'épauler pendant un mois. Les champignons n'auront bientôt plus de secrets pour toi !

Pour finir, merci aux enseignants et intervenants qui se sont succédé auprès des masters BIPE durant ces deux années.

2.6.2. Quantification de la colonisation 10

2.7. Agrotransformation des souches fongiques 10

2.7.1. Induction des bactéries et agrotransformation des mycélia 10

2.7.2. Sélection des transformants 10

2.8. Souches fongiques et ETM 11

2.8.1. Tests de résistance des souches fongiques aux ETM 11

2.8.2. Mobilisation des métaux-sécrétion de sidérophores 11

2.9. Les analyses statistiques 11

3. Résultats 12

3.1. Effet de délaissés industriels sur la croissance, l'accumulation des ETM et la colonisation fongique du chanvre, du peuplier et de l'ortie 12

3.1.1. Croissance des plantes 12

3.1.2. Accumulation des ETM dans les plantes 13

3.1.3. Dénombrement et observation de l'inoculum endogène 14

3.2. Identification et caractérisation de souches fongiques endophytes isolées de sols pollués aux métaux lourds 15

3.2.1. Identification moléculaire des souches isolées 15

3.2.2. Optimisation des modes de culture des souches 15

3.2.3. Détermination des différentes sources carbonées dégradés par les souches fongiques 16

3.2.4. Evaluation de l'effet des souches fongiques sur le développement des plantes hôtes 17

3.2.5. Apport des biotechnologies : agro transformation GFP des souches fongiques. 19

3.2.6. Souches fongiques et ETM 19

3.2.6.1. Évaluation de la tolérance métallique des souches fongiques 19

3.2.6.2. Mesure de la capacité des exsudats fongiques à mobiliser les ETM du sol 20

4. Discussion 21

4.1. Réponse du chanvre, du peuplier et de l'ortie aux délaissés utilisés 21

4.2. Caractérisation de souches fongiques endophytes isolées de sols pollués aux métaux lourds 22

5. Conclusions et perspectives 25

6. Références bibliographiques 26

7. Annexes i

Annexe 1 i

Annexe 2 ii

Annexe 4 : iii

Annexe 6 : v

Annexe 7 vi

Annexe 8 vii

Annexe 9 viii

Annexe 10 ix

Annexe 11 x

Résumé

Abstract

Abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique
AIA : Acide indole acétique
BET : Bromure d'éthidium
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
CAS : Chrome azurol-S
Cd : Cadmium
CMC : Carboxy-méthyl cellulose
dNTP : 2'-déoxynucléoside 5'-trisphosphate
DSE : Dark septate endophyte
EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétraacétique
ETM : Elément Trace Métallique
GSH: Glutathion
ICP-AES : Inductively-Coupled-Plasma / Atomic-Emission-Spectrometry
ITS : Internal Transcribed Spacer (espaceur interne transcript)
LB : (milieu) Luria-Bertani
MES : Acide 2-morpholino éthanesulfonique monohydraté
MMN: milieu Modifié de Melin Norkrans
MS : Murashige et Skoog
MTH : métallothionéines
n : nombre d'échantillons
Pb : plomb
PCR : Polymerase Chain Reaction
PIPES : 1, 4-Piperazinediethanesulfonic acid sodium salt,
rpm : rotation par minute
TAE : Tris-acétate-EDTA
ZIP : Zrt-, Irt- like Protein
Zn : Zinc

1. Introduction

1.1. Les métaux

1.1.1. Définitions et généralités

Les métaux sont des éléments chimiques possédant des propriétés de conduction de chaleur et d'électricité. Ils participent aux réactions sous forme de cations. Leurs différents effets sur les organismes permettent de les subdiviser en deux classes : les métaux essentiels et les métaux toxiques. Les métaux essentiels sont indispensables pour de nombreux processus cellulaires et se trouvent en proportion très faible dans les tissus biologiques. Tous les métaux (essentiels ou non) exercent une toxicité, quand ils sont présents sous des formes biodisponibles (Gadd, 2007), au-dessus d'un certain seuil. Cette valeur est dépendante de l'organisme, du tissu et de la nature de l'élément.
Les métaux toxiques et/ou métaux lourds, sont des éléments métalliques naturels caractérisés par une masse volumique supérieure à 5 g/cm^3 et une masse atomique supérieure à 100. Quarante et un éléments correspondent à cette définition générale auxquels il faut ajouter cinq métalloïdes (éléments qui combinent certaines caractéristiques du métal et d'autres caractéristiques opposées) (Fig. 1).
La classification en métaux lourds est souvent discutée car certains métaux toxiques ne sont pas particulièrement « lourds » (le zinc par exemple), tandis que certains éléments toxiques ne sont pas tous des métaux (l'arsenic notamment). Pour ces différentes raisons, la plupart des scientifiques préfèrent à l'appellation « métaux lourds », l'appellation « éléments traces métalliques » ou ETM. L'adjectif « trace » traduisant le fait que les métaux lourds sont présents dans tous les compartiments de l'environnement mais dans des quantités très faibles.

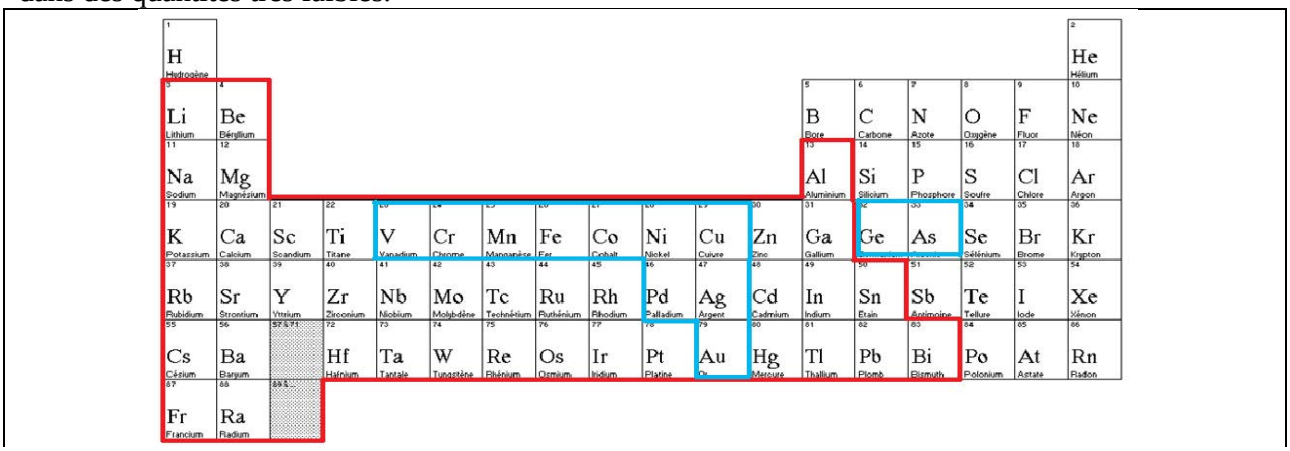


Figure 1 : Tableau périodique des éléments. L'encadré rouge délimite les éléments appartenant au groupe des métaux alors que l'encadré bleu délimite les principaux ETM contaminant l'environnement

1.1.2 La pollution métallique

Lors des deux dernières décennies du XX ème siècle, 22 000 tonnes de cadmium, 939 000 tonnes de cuivre, 783 000 tonnes de plomb et 1 350 000 tonnes de zinc (Singh *et al.*, 2003) ont été relarguées dans l'environnement. Ces métaux peuvent avoir deux origines différentes : la lithosphère ou une origine anthropogénique. L'origine lithosphérique est due à l'érosion des matières premières mais ne représente qu'une très faible fraction de l'apport total en métaux (Adriano *et al.*, 2004). En revanche, la majeure partie des métaux est issue de l'activité humaine dont :
- L'exploitation minière et les industries
- L'agriculture avec l'utilisation de certains engrais contenant notamment du cadmium, du cuivre…
- Les déchets domestiques avec pour aboutissement les boues d'épuration par exemple (Adriano *et al.*, 2004).

Les métaux modifient les propriétés chimiques, biologiques et physiques du sol limitant ainsi l'établissement de la végétation et donc les activités agricoles (Bolan *et al.*, 2003). Ils engendrent également de graves risques pour la santé humaine, lors de leur entrée directe (ingestion de particules, poussières, eaux contaminées) ou indirecte (chaine trophique, productions agricoles).

Face à ces dangers mais également face à l'explosion de la demande en surface habitable, il est devenu indispensable de contenir, voire dépolluer les anciennes zones contaminées.

1.2-Les voies de dépollution /réhabilitation

1.2.1. Les techniques physico-chimiques

Les méthodes de dépollution dépendent du type de contaminant, de la nature des sols et de son usage futur (zone habitable, industrie...). Les méthodes physico-chimiques sont actuellement les plus utilisées, mais elles sont souvent très onéreuses, peu respectueuses de l'environnement et de la biodiversité. Face à toutes ces contraintes, des techniques biologiques sont en plein essor.

1.2.2. Les techniques biologiques

1.2.2.1. La phytoremédiation

Les métaux ne peuvent pas être détruits par des procédés biologiques ou physiques mais peuvent cependant être immobilisés ou séquestrés par les plantes. La phytoremédiation s'impose alors comme une technique naturelle faisant intervenir les plantes pour immobiliser les métaux ou diminuer la teneur de ceux-ci dans les sols.
La phytoremédiation se décline en quatre grandes techniques (Fig. 2) :
- *La Phytostabilisation* entraine une baisse de la mobilité et de la biodisponibilité des métaux dans le sol, grâce à différents mécanismes dont la sorption, la précipitation, la complexation ou le changement de l'état de valence du métal. L'ensemble de ces mécanismes se déroule au niveau de la rhizosphère. Par cette méthode, l'érosion du sol et le lessivage des métaux jusqu'à la nappe phréatique sont ainsi diminués.
- *La Phytoextraction* : la plante absorbe, transfère, et concentre les métaux toxiques et les radionucléides depuis le sol jusqu'aux parties aériennes. Ces parties aériennes pourront alors être récoltées et incinérées dans des chaudières dotées de filtres spéciaux, afin de limiter le retour des polluants dans l'atmosphère**.** Une étude récente a en effet démontré l'absence de relargague de contaminants métalliques dans l'atmosphère après combustion de bois contaminé dans des chaudières, à condition qu'un filtre dédié à la récupération des poussières et particules fines soit placé en aval du système de combustion (Chalot *et al.*, 2012).
- *La Phytovolatilisation* : Ce procédé très minoritaire consiste en une méthylation des métaux au niveau des feuilles afin de les rendre volatils. Seuls l'arsenic, le mercure et le sélénium peuvent être volatilisés.
- *La Phytofiltration* utilise les racines des plantes (= Rhizofiltration) ou les graines (= blastofiltration) afin d'absorber ou d'adsorber les métaux dans des zones aquatiques ou humides.

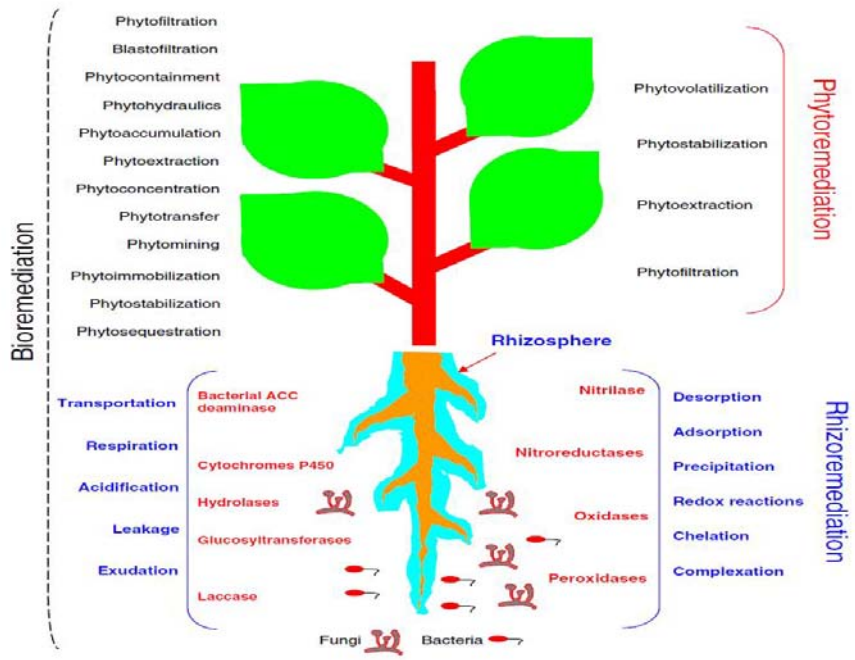


Figure 2: Les différentes techniques de bioremédiation (Ma *et al.*, 2011)

Toutes ces techniques forment une alternative aux méthodes physico-chimiques. En effet, elles présentent l'avantage d'être peu onéreuses, modulables en fonction des contaminants, respectueuses de l'environnement en permettant une végétalisation permanente des sites traités.
La remédiation par les plantes peut être améliorée en faisant intervenir des microorganismes rhizosphériques : bactéries et champignons. On parle alors de bioremédiation ou de rhizoremédiation (Fig. 2).

1.2.2.2. La bioremédiation

Les microorganismes du sol interviennent dans de nombreux processus biochimiques dont la formation du sol, les transferts d'énergie et les cycles des nutriments. Ces procédés facilitent et contrôlent la revégétalisation des sites pollués. Dans le cadre du sujet de stage de master, le cas des microorganismes fongiques à été particulièrement développé. De plus, les bactéries sont essentiellement utilisées dans des études de remédiation des sols pollués par les composés organiques et relativement peu dans le cas de pollutions métalliques. En conséquence de ces deux points, le rôle de la composante bactérienne ne sera ainsi pas développé ci-après.
Sur les sites contaminés, les microorganismes sont affectés par l'exposition continue aux métaux ce qui peut induire une réduction de la biomasse ou, à l'inverse, induire une tolérance et promouvoir le développement de populations microbiennes spécifiques.

1.3. Les symbiotes fongiques

1.3.1. Les mycorhizes

La mycorhize est une symbiose, c'est-à-dire une association vitale procurant des bénéfices aux deux partenaires.
Il existe deux grands types de mycorhizes (Fig. 3) :

-L'endomychorhize où le mycélium pénètre dans les cellules corticales de l'hôte via la formation d'un appressorium. Elle est présente chez 80% des plantes herbacées et quelques ligneux.

-L'ectomychorhize où le mycélium du champignon forme une gaine autour des pointes racinaires de la plante. Les hyphes ne rentrent pas dans les cellules corticales. Cette relation est essentiellement retrouvée chez les ligneux.

Dans les deux cas, le végétal apporte les réserves carbonées nécessaires au développement des champignons, pendant que ceux-ci permettent une meilleure absorption d'eau et des éléments azote et phosphore pour le végétal.

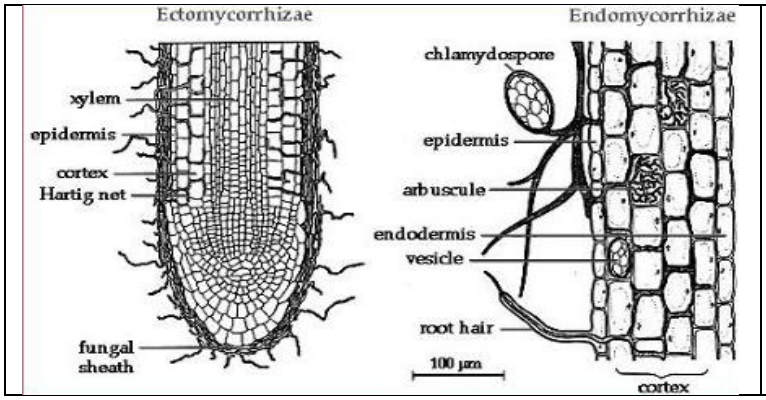


Figure 3: Les deux grands types de mycorhizes
À gauche l'ectomycorhize caractérisée par la formation d'un manteau fongique ou « réseau de Hartig » qui entoure les racines. À droite l'endomycorhize où les structures fongiques pénétrent dans les cellules corticales racinaires en formant soit des vésicules, des arbuscules ou des pelotes.

1.3.1.1 Mycorhizes et phytoremédiation

Les mycorhizes jouent un rôle important dans la phytoremédiation des sites pollués aux métaux en permettant à la plante d'acquérir une plus grande tolérance vis-à-vis des métaux. Il existe une variation interspécifique dans la capacité des champignons à réduire la sensibilité de la plante aux métaux lourds (Jourand *et al.*, 2010).
Les ectomycorhizes sont capables d'améliorer la survie de l'hôte végétal en présence d'ETM par l'augmentation des capacités d'absorption des éléments nutritifs dont principalement les composés azotés et phosphatés, (Hartley *et al.*, 2000), de l'eau, ou en limitant le transfert des métaux vers les organes aériens.

Par exemple, le champignon ectomycorhizien *Pisolithus albus* permet une stimulation *de Eucalyptus globulus* en présence de nickel et permet également de limiter le transfert de ce dernier vers les parties aériennes (Jourand *et al.*, 2010). Ce premier effet est un avantage majeur pour la phytostabilisation.
Les champignons endomycorhiziens permettent également de stimuler la production de biomasse, certains sont également capables de stocker une grande quantité de métaux dans leur hyphes permettant ainsi d'augmenter la tolérance des plantes (Gohre et Paszkowski, 2006). A l'inverse, certains d'entre eux sont connus pour stimuler le transfert des ETM depuis le sol jusqu'aux parties aériennes (Toler *et al.*, 2005 ; Marques *et al.*, 2007). Ce second effet peut être très favorable à la phytoextraction.

1.3.1.2. Les champignons endophytes

Les endophytes sont des organismes pouvant coloniser les tissus internes des végétaux à un certain moment de leur vie sans causer de dommage apparent à l'hôte " (Petrini, 1981). Ils peuvent apporter des avantages pour la plante hôte comme une protection face à certaines pathologies et certains stress ou faciliter la nutrition minérale. Cependant cette première définition a évolué puisque des auteurs ont mis en évidence que ces endophytes peuvent devenir des hôtes pathogènes suite à un changement de leur environnement (Jumponnen, 2005).
Contrairement aux mycorhizes qui colonisent les racines des plantes et poussent dans la rhizosphère, les endophytes résident intégralement dans les tissus végétaux, et peuvent se développer dans les racines, tiges ou feuilles pour émerger lors de la sporulation ou quand les tissus entrent en sénescence (Carroll, 1986). On distingue deux grands types de champignons endophytes. Le premier type concerne les champignons appartenant à la famille des *clavicipitaceaes* et sont des symbiotes obligatoires (Yuan *et al.*, 2010).
Le second type regroupe l'ensemble des endophytes non *clavicipitaceaes* et sont des symbiotes inductibles.
Ces deux types sont subdivisés en quatre classes, érigées en fonction du spectre d'hôte, du mode de transmission entre les plantes, de l'aspect du champignon, du mode et de l'endroit de la colonisation. Toutes ces caractéristiques sont résumées dans le tableau I (Yuan *et al.*, 2010).

Tableau I : Les différentes classes d'endophytes

NHA : Nonhabitat-adapted , les bénéfices tel que la tolérance à la sécheresse, la stimulation de croissance ne résultent pas d'une adaptation. Ils sont communs à l'ensemble de la population.
NA : Habitat adapted : A l'inverse de NHA, les bénéfices sont issus d'une pression de sélection de l'environnement comme par exemple les pressions engendrées par les paramètres salinité, pH , température

Critères	Clavicipitaceous	Non Clavicipitaceous		
	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Spectre d'hôtes	Étroit	Large	Large	Large
Tissues colonisés	Racine et rhizome	Partie aérienne, racine et rhizome	Partie aérienne	Racine
In Planta colonisation	Extensive	Extensive	Limitée	Extensive
In Planta biodiversité	Faible	Faible	Élevé	Non déterminé
Mode de transmission	Vertical et horizontal	Vertical et horizontal	Horizontal	Horizontal
Bénéfices / Fitness*	NHA	NHA & NA	NHA	NHA

Au sein de la quatrième classe, un type particulier d'endophytes a été étudié dans le cadre de ce stage : les DSE (pour *Dark Septate Endophytes*).

1.4. Les *Dark Septate Endophytes*

1.4.1. Présentation

Les DSE sont des Ascomycètes stériles ou conidiens qui possèdent des hyphes septés recouverts de mélanine (d'où leur nom). Ils colonisent les racines des plantes vivantes (Jumpponen et Trappe, 1998). Ces champignons se retrouvent dans plus de 600 plantes différentes, 320 genres et 114 familles (Jumpponen et Trappe, 1998). Leurs fonctions écologiques sont encore mal connues. Actuellement, les DSE semblent occuper différentes positions allant du mutualisme, commensalisme au parasitisme (Jumpponen et Trappe, 1998). Sauf exceptions, la plupart des DSE appartiennent à l'ordre des Hélotiales (Vralstad et *al.*, 2002).

1.4.2. Effet des *Dark Septate Endophytes* sur les plantes

1.4.2.1. Rôle sur la croissance et le statut nutritionnel

Il existe une spécificité d'hôte entre la plante et le champignon endophyte. Un DSE donné, par exemple *Phialocepheala fortinii*, pourra avoir un effet pathogène sur le pin *Pinus rubens* (Singh *et al.*, 2003) alors qu'il aura des effets bénéfiques lors d'une interaction avec une monocotylédone.
Les effets bénéfiques relevés chez les plantes sont :

- Des augmentations de biomasse aérienne et racinaire (Newsham, 2011), *P. fortini* peut engendrer une augmentation de 23 à 161 % de la biomasse totale par rapport à un plant non inoculé, l'inoculation n'entraine pas de variation du ratio « root : shoot »
- Une stimulation de la ramification racinaire (Hou et Guo, 2009)
- Une hausse du contenu en phosphore (Newsham, 2011)
- Une augmentation du contenu en azote (Usuki et Narisawa, 2007). En effet la plante est capable d'utiliser les formes d'azote inorganique, cependant l'interaction avec le champignon va lui permettre d'utiliser l'azote organique (Upson *et al.*, 2009).

De nombreuses hypothèses ont étés émises pour expliquer les effets positifs de la colonisation par ces endophytes. Les deux prédominantes sont : la modulation de la croissance de la plante via des apports facilités en nutriments (Jumpponen, 2001 ; Mandyam et Jumpponen, 2005) et la production de phytohormones stimulatrices (Bolan *et al.*, 2003), par exemple l'AIA (acide indole acétique).

1.4.2.2. Protection contre certains pathogènes de plantes

Les mécanismes utilisés par les *dark septate endophytes* pour neutraliser l'effet des pathogènes ne sont pas encore totalement élucidés, cependant quelques possibilités peuvent être suggérées :

- La sécrétion d'antibiotiques et d'autres métabolites secondaires. Ce phénomène est observable avec le champignon endophyte *Phialocephala europea* qui, en présence du pathogène *Phytophtora*, a la capacité de sécréter des métabolites inhibiteurs dont la sclérine et la sclérotinine (Tellenbach *et al.*, 2013).
- La compétition pour les nutriments,
- La compétition pour les lieux d'infection et de colonisation sur les racines,
- Les réactions de défense induites par le champignon « *plant-induced resistance* »,
- L'inactivation des protéines sécrétées par les pathogènes par des protéines du DSE telles que les chitinases ou les β-1.3 glucanases.

1.4.2 3. Les DSE et la pollution métallique

Likar et Regvar (2009) ont montré une corrélation entre le taux de colonisation par des champignons endophytes de *Salix caprea* et la quantité de Pb et de Cd dans le sol. Cette dernière semble protéger la plante contre l'augmentation des polluants. En présence de sols pollués, Cevnik *et al.*, (2000) ont démontré la constance des colonisations par les DSE, quelque soit le niveau de pollution alors que les colonisations par des mycorhiziens tendent à diminuer.
Les DSE semblent donc plus résistants aux métaux lourds que les endomycorhizes (Likar et Regvar, 2009). Cette résistance serait due à la présence de mélanine dans les parois des hyphes, qui est capable de se lier aux métaux les rendant ainsi indisponibles et donc moins toxiques. (Kytoviita et Ruotsalainen, 2007).

1.5. Le stage

1.5.1. Présentation du laboratoire d'accueil.

Le LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux) est une unité mixte de recherche qui dépend à la fois du CNRS et de l'Université de Lorraine. Cinq thématiques structurent l'activité scientifique du LIEC **:**
Eco-dynamique et éco-toxicité des contaminants **(EDEC)**, Fonctionnement des écosystèmes perturbés **(FEP)**, Diversités et interactions biotiques et abiotiques **(DIBA)**, Théorie et modélisation intégrée des systèmes **(TEMIS)**, Caractérisation et remédiation des milieux anthropisés **(CARMA)**. Le LIEC est basé sur quatre sites : les campus des Aiguillettes et Charmois à Vandoeuvre lès Nancy, le campus Bridoux à Metz et le campus de Thionville.

Le stage s'est déroulé sur le site des Aiguillettes et s'insère dans les thématiques EDEC et CARMA avec comme objectif général la compréhension des mécanismes de tolérance aux métaux des symbiotes fongiques et l'utilisation de ces organismes dans des programmes de phytoremédiation.

1.5.2. Le projet LORVER et les objectifs du stage

Le projet Lorver regroupe un consortium de laboratoires et d'entreprises lorraines dans le but de valoriser des sites jusqu'alors délaissés en raison de leur contamination
En parallèle, la mise en place d'une filière de production de biomasse pourrait permettre de tirer un bénéfice économique à cette requalification.
Ainsi différentes techniques seront mises en place, dont la construction de sol à partir de différents matériaux délaissés dans le but de restaurer la fertilité des sols dégradés (terres de biopile, boues de papeteries, d'incinération…).
Sur ces sol seront plantés des essences non alimentaires permettant de produire une biomasse valorisable économiquement:
- le chanvre et l'ortie dont les fibres pourront être utilisées dans le domaine de l'habitat,
- le peuplier dont la pyrolyse amènera à une synthèse d'énergie et de biochar (sorte de charbon),
- *Thlaspi caerulescens*, une plante hyper-accumulatrice qui sera utilisée à des fins de phytomining. (récupération de métaux par phytoextraction).

Ce projet de 4,9 millions d'euros cofinancé par la Région Lorraine et le FEDER, revêt également un intérêt scientifique, en permettant d'approfondir nos connaissances tant sur le développement de ces essences en milieux pollués, que sur la qualité des sous produits issus de ces cultures.

Objectifs du stage :

Le premier objectif principal de ce stage s'inscrit dans le cadre du projet Lorver et consiste à étudier le développement de ces trois plantes sur des sols pollués aux métaux en observant notamment les sites d'accumulation des métaux. Afin de répondre aux questions suivantes :

- Le chanvre, le peuplier et l'ortie sont ils adaptés au projet LORVER ie peuvent-ils se développer et produire de la biomasse sur un sol enrichi en délaissés pollués ?
- Où sont localisés les métaux dans ces trois espèces ?
- Les trois plantes sont-elles capables d'interagir avec des champignons endophytiques ou mycorhiziens ?

Le second objectif majeur du stage concerne la caractérisation de champignons endophytes isolés de sols pollués aux métaux lourds.
Le but de ces travaux est de vérifier parmi ces souches lesquelles pourraient être utilisées comme inoculum afin d'assister les plantes lors de projets de phytoremédiation. Pour cela le mode de vie des souches fongiques a été étudié ainsi que leur niveau de résistance aux ETM et leurs capacités d'interaction avec différentes plantes hôtes.des essais d'agrotransformation des souches ont également été réalisés afin d'obtenir des souches exprimant le marqueur GFP.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Espèces végétales et conditions de culture

Trois espèces végétales ont été utilisées dans le cadre du projet LORVER : le chanvre (*Cannabis sativa*), l'ortie (*Urtica dioica*) et le peuplier (*Populus trichocarpa x P. maximowiczii*, cv. Skado). Les plantes ont été cultivées deux mois en pots de deux litres dans un phytotron avec les conditions suivantes : 70% d'hygrométrie, températures jour/nuit de 22/18 °C respectivement, photopériode de 16 h. Trois matériaux différents (terre végétale, terre de biopile, boues métalliques), fournis par la société SITA FD située à Jeandelaincourt (54) ont été utilisés pour constituer les substrats de culture. La terre de biopile est issue d'une terre polluée aux composés organiques qui a été traitée par le procédé de biopile. Ce procédé est un traitement biologique qui favorise la dégradation des polluants en stimulant la flore bactérienne du sol (ajout de sources nutritives, aération). Les boues métalliques sont issues du traitement par combustion de déchets industriels. Ces différents matériaux ont été broyés et tamisés à 2 mm sur le site du STEVAL (UMR CNRS-UL G2R, Vandoeuvre-les-Nancy) puis assemblés en mélanges distincts à l'aide d'une bétonnière afin d'assurer une homogénéisation correcte (Annexe 1). Au total six modalités différentes ont ainsi été testées :

- 100 % de terre végétale (TV) ou de terre de biopile (TB)
- 95 % de terre végétale / de biopile + 5 % de boues (TV-B5 / TB-B5)
- 90 % de terre végétale / de biopile + 10 % de boues (TV-B10 / TB-B10)

Afin de tester les capacités de tolérance des 3 plantes vis-à-vis des ETM, chacune des plantes est mise à pousser en cinq répétitions sur les 7 modalités. Après six semaines de croissance, les feuilles, les tiges et les racines sont récoltées et nettoyées avant d'être séchées et pesées.

En ce qui concerne les expériences liées à l'étude des champignons DSE, deux autres plantes ont été utilisées. Il s'agit de la luzerne (*Medicago sativa*) et du ray-grass (*Lolium multiflorum*). Ces plantes ont été cultivées soit en boite de Pétri dans une étuve de germination à une température de 22°C, soit avec un substrat composé de 50% tourbe et 50% vermiculite en phytotron, dans les mêmes conditions que ci-dessus.

2.1.2. Les microorganismes utilisés

2.1.2.1. Les isolats fongiques

Les souches fongiques ont été isolées de différents sites pollués aux métaux lourds (Lacercat-Didier, 2013):
- Au niveau de la fonderie Métaleurop située sur les communes de Courcelles-lès-Lens et Noyelles-Godault (Pas-de-Calais). Ces souches isolées sont nommées de M01 à M04 et de MSK2.1 à MSK2.10. Sur ces parcelles, le sol est majoritairement contaminé par le zinc, le cadmium et le plomb. En effet, pendant près d'un siècle, des dépôts atmosphériques issus des cheminées de cet ancien site de production de plomb et de zinc se sont déposés sur plusieurs dizaines de km^2.
- Le second site est situé dans la plaine de Pierrelaye (Val d'Oise), dont les souches nommées P01 à P06 ont été isolées. La plaine de Pierrelaye est une ancienne zone maraîchère où la contamination se caractérise par une haute teneur en métaux lourds (cadmium, plomb, zinc et cuivre)
- Enfin les souches Eu1-11, CY1-2, Pi6, Ce4 et *Piriformospora indica* ont été fournies par d'autres laboratoires.

Trois souches de champignons phytopathogènes *Fusarium solani*, *Ilyonectria macrodidyma* et *Neonectria* sp. ont également été utilisées. Ces souches ont été obtenues lors d' essais d'isolement de souches fongiques à partir de racines de peupliers du site de Pierrelaye.
Le mycélium de l'ensemble de ces souches est maintenu en culture pure à l'obscurité et à 23°C par repiquages successifs à partir de la souche mère, sur milieu gélosé (Annexe 4).

2.1.2.2. Optimisation du milieu de culture des différentes souches fongiques

Dans le but de multiplier, caractériser et comparer les différentes souches, il est au préalable nécessaire de tester le milieu de culture favorisant une croissance optimale de chaque souche isolée. Les capacités de croissance sur quatre milieux gélosés ont ainsi été analysées. Les quatre milieux testés sont : Malt, MMN,

Pachlewski et N2P2 (Annexe 3). Suite à cette première étude, l'expérience est réitérée en remplaçant le milieu gélosé par un milieu liquide en culture agitée à 150 rpm. Ce dernier test est réalisé afin de s'assurer que nos souches pourront produire à plus long terme une grande quantité d'inoculum dans des fermenteurs.

2.1.2.3. *Agrobacterium tumefaciens*

La souche EHA101 d'*Agrobacterium tumefaciens* est utilisée. Son plasmide pEHA101 (Annexe 5) possède un T-DNA comprenant : un gène GFP ainsi qu'un gène de résistance à l'hygromycine qui permet la sélection des tous les clones ayant insérés le T-DNA, des origines de réplication. La souche est entretenue par cultures successives sur milieu LB (Annexe 5).

2.2. Dosage de métaux

2.2.1. Préparation des échantillons

Pour déterminer où les métaux sont accumulés dans chaque espèce, une analyse par ICP-AES à été conduite sur une partie des feuilles et des tiges de chaque plante Après deux mois de culture, les tiges et feuilles du chanvre, peuplier et de l'ortie sont récoltées puis elles sont ensuite lavées, séchées à 50°C dans une étuve ventilée pendant vingt quatre heures. Un broyage à l'aide d'azote liquide est réalisé afin de réduire l'échantillon à l'état de poudre. Chaque espèce et chaque modalité est représentée par trois échantillons.

2.2.2. Minéralisation des échantillons.

Une minéralisation à l'acide est nécessaire avant tout dosage ICP. Pour on pèse 200mg de chaque échantillon sont pesés et deux millilitres d'eau oxygénée et quatre millilitres d'acide nitrique pur sont ajoutés. L'ensemble est chauffé jusqu'à atteindre une température de 72°C et une pression de 20,3 bars. Après refroidissement le liquide obtenu est filtré à 0;2 µm. Un blanc est réalisé en ne mélangeant que l'acide nitrique à l'eau oxygénée. L'ensemble des échantillons est ainsi prêt pour la mesure ICP-AES.

2.3. Identification moléculaire des souches

2.3.1. Amplification d'ADN et analyse des séquences

Le mycélium de chaque souche a été récupéré après culture sur milieu MALT (Annexe 3) pendant une semaine à 23°C. L'ADN génomique est mis en solution à partir du kit « *Extract-N-Amp*™ *Plant* PCR-» selon le protocole du fournisseur (Sigma Aldrich) (Fig. 4). Brièvement, le mycélium est incubé 10 min à 95°C avec 100 µl de tampon de lyse. Puis 100 µl de tampon de dilution sont ajoutés avant de réaliser l'amplification de l'ADN.
L'ADN de la région « ITS 1 - 5.8S - ITS2 » est ensuite amplifié par PCR en utilisant les amorces ITS1 et ITS4 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' / 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Les amorces ITS1 et ITS4 s'hybrident respectivement sur les extrémités 3' du gène de l'ARNr 18 S et 5' du gène de l'ARNr 28S. Ces régions, ainsi que celle de l'ADNr 5.8 S sont très conservées mais les régions ITS sont plus variables d'une espèce à l'autre au sein d'un même genre. Ainsi par amplification et séquençage de l'ADN de cette zone, le genre et même parfois l'espèce de l'organisme étudié peuvent être déterminés.
Le milieu réactionnel permettant l'amplification est composé de : 5,2µl d'eau stérile, 10 µl du mélange commercial (contenant du tampon $MgCl_2$, des sels, une enzyme polymérase (Taq polymérase), les nucléotides (dNTP)), 0,4 µl de chaque amorce et 4 µl d'extrait d'ADN. Les conditions de PCR sont récapitulées en Annexe 4.

Quatre microlitres du milieu PCR sont déposés dans les puits d'un gel d'agarose à 1%, six microlitres de tampon de migration, contenant un marqueur de taille « 1kb » sont également déposés dans un puits afin de permettre un dosage des bandes d'ADN. Une électrophorèse à 100 volts pendant une vingtaine de minutes permet la migration des ADN. Le gel est révélé après être déposé pendant quinze minutes dans un bain de BET (Annexe 4). A l'aide d'un appareil Geldoc et du logiciel Quantity One ® une quantification de l'ADN amplifié est alors réalisée.
Un échantillon de 30 µl à une concentration de 30 ng/µl d'ADN de produits PCR est envoyé à la société Beckman Coulter Genomics SA afin d'être séquencé.

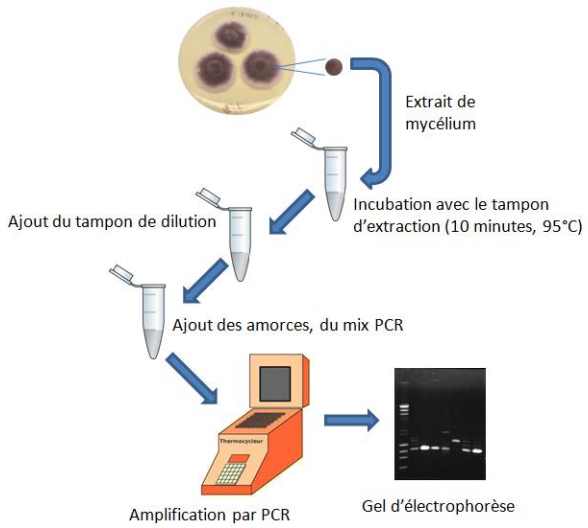


Figure 4 : Principales étapes de l'extraction et de l'amplification des ADN fongiques.

2.3.2. Etudes bioinformatiques et phylogénétiques

Les analyses bioinformatiques des séquences nucléotidiques des souches ont étés réalisés suite à l'utilisation de différents programmes :
L'identification des séquences via l'algorithme BLAST nucléotidique hébergé sur le site http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Après avoir été idenitifiées les séquences sont ensuite alignées les unes aux autres en utilisant la méthode *ClustalW*. Les analyses phylogénétiques et les arbres qui en découlent ont étés construits sur le logiciel MEGA® 5.2, en utilisant la méthode *Neighbor-joining* et en incluant les options Kimura 2 et *pairwise deletion*. Les valeurs de *bootstrap* sont obtenues pour 1000 répétitions

2.4. Mesure des capacités à utiliser différentes sources carbonées

Dans le but de déterminer le mode de vie des souches fongiques et notamment leur capacité saprophytique, une étude à été menée sur les capacités de dégradation de différentes sources de carbone par ces souches. Douze composés ont été testés : amidon, cellulose (Avicel), cellobiose, carboxy-méthyl cellulose (CMC), fructose, glucose, lignine, maltose, mannitol, saccharose, xylane et xylose. Les 17 souches sont cultivées en milieu Pachlewski modifié i.e. dans lequel toutes les sources de carbone (tartrate d'ammonium, maltose et glucose) originellement présentes dans ce milieu sont remplacées par du chlorure d'ammonium et 8 g de carbone par litre d'un des composés cités ci-dessus. Après deux semaines de croissance sous agitation (150 rpm), la culture est filtrée à 0.2µm à l'aide de filtres en microcomposite de verre et la biomasse sèche est mesurée après incubation des échantillons pendant 2 jours à 60°C.

Parallèlement, un test colorimétrique de dégradation de la cellulose a été réalisé. Le même milieu de base que celui décrit ci-dessus (additionné de 15 g/l d'agar) est utilisé, et 5 g de cellulose par litre y sont ajoutés. La source de cellulose testée est la CMC. Chaque boite de Pétri est inoculée avec un implant fongique de 5 mm de diamètre puis stockée à l'obscurité et à 24°C pendant 3 semaines. Le témoin est une boite non inoculée. Après croissance, la colonie fongique est retirée et 3 ml de Rouge Congo (0.1% m/v) sont alors ajoutés sur le milieu gélosé. Après une incubation de 5 min, le liquide est retiré et trois lavages sont réalisés (Annexe 5). Finalement le diamètre du halo de dégradation et celui de la souche sont mesurés.

Pour les deux tests décrits ci-dessus, trois réplicas par souche sont réalisés.

2.5. Évaluation des interactions plantes – champignons

Dans l'objectif de clarifier le type d'interaction (parasite, symbiotique) s'exerçant entre les plantes et les souches fongiques étudiées, deux expériences ont été mises en place. Elles font intervenir le ray-grass et la luzerne comme plantes hôtes et les souches fongiques suivantes : 2.1, 2.2, 2.7, 2.10, Ce4, CY1-2, Eu1.11, Pi6 et *Piriformospora indica*.

2.5.1. En conditions axéniques

Dans une boite de Pétri carré de 14 cm de côté, dont seulement une moitié est remplie avec le milieu malt gélosé, cinq implants fongiques sont déposés. Trois répétitions par souches sont réalisées. Sur les boites témoins aucun implant fongique n'est déposé. Après 5 jours de développement de la colonie, 10 graines de ray-grass (préalablement désinfectées) sont déposées au niveau de l'interface milieu- vide (Annexe 12). L'ensemble est placé deux semaines dans une étuve lumineuse à 22°C.

La désinfection des graines se fait par un lavage à l'éthanol 70% pendant cinq minutes. Il s'en suit trois rinçages à l'eau stérile puis un second lavage à l'eau javel 5%. Avant d'être déposées sur un milieu MS gélosé, les graines subissent trois derniers lavages à l'eau stérile.

2.5.2. En conditions non axéniques

Dans 300 ml de substrat mi tourbe-mi vermiculite, on inocule 750mg de masse fraiche de champignon. Après 2 jours d'incubation, permettant au champignon de se développer, 30 graines de ray-grass ou de luzerne sont déposées à la surface du substrat et les cultures sont placées dans une chambre de culture avec les conditions détaillées au paragraphe 2.1.1. Un mélange sans champignon est réalisé en ce qui concerne le traitement témoin. Après un mois de croissance, les biomasses racinaire et foliaire sont mesurées. La colonisation racinaire est analysée selon le protocole présenté dans le paragraphe 2.6.

2.6. Evaluation de la colonisation fongique

2.6.1. Coloration au bleu trypan

Dans un premier temps les racines sont lavées à l'eau afin d'éliminer les résidus de sols, puis elles sont incubées pendant une nuit dans de l'éthanol à 70%, après ce premier lavage les racines sont transférés dans du KOH 5 % pendant 20 minutes, au bain marie à 90°C. Cette étape va permettre de débuter la décoloration naturelle de la racine. Une deuxième étape de décoloration avec du HCL à 1% est ensuite mise en place pendant une nuit. Afin de pouvoir observer les structures fongiques au microscope, les racines sont colorées au bleu trypan pendant une demi-journée. Le bleu trypan a pour capacité de se fixer à la chitine permettant ainsi de révéler en bleu la présence des structures fongiques. Après trois lavages à l'eau, les racines sont découpées en fragments de un centimètre qui sont ensuite montés, dans une goutte de glycérol, entre lame et lamelles

2.6.2. Quantification de la colonisation

La quantification du taux de colonisation fongique se fait au microscope en utilisant la méthode de Trouvelot (Trouvelot *et al.*, 1985)
Cette méthode repose sur une double évaluation. Dans un premier temps un score entre 0 et 5 à la évalue la colonisation fongique, puis un score entre A0 et A3 permet d'évaluer la teneur en arbuscules (Annexe 6). A partir de ces deux scores, le logiciel Mycocalc® calcule la teneur en arbuscule mais aussi le taux et la fréquence de colonisation.

2.7. Agrotransformation des souches fongiques

2.7.1. Induction des bactéries et agrotransformation des mycélia

Les bactéries sont cultivées à 30 °C sous agitation (100 rpm) dans un milieu LB jusqu'à l'obtention d'une absorbance à 600 nm de 0,5. Après centrifugation, le culot est resuspendu (A_{600} = 0.1) dans un milieu LB d'induction (Annexe 5). Ensuite, une fois une DO de 0,5 atteinte, la culture bactérienne est déposée au contact des mycélia à transformer. Les mycélia sont obtenus auparavant à partir de cultures d'implants de 1mm prélevés et déposés sur un milieu N2P2. Ces implants sont cultivés à 24 °C jusqu'à atteindre 4 à 5 mm de diamètre avant d'être transférés sur le même milieu contenant 200 µM d'acétosyringone (milieu d'induction). La coculture bactéries-mycélia dure 4 jours à 24 °C (Fig. 5).

2.7.2. Sélection des transformants

Après la phase de co-culture, les colonies fongiques sont transférées sur milieu N2P2 de sélection (Annexe 5). Ce milieu contient notamment de l'hygromycine qui va permettre de sélectionner uniquement les clones transformés. Un panel d'autres antibiotiques est également utilisé afin d'arrêter la prolifération

des agrobactéries. La bordure de chaque colonie est notée afin de suivre l'évolution de sa croissance puis les boites sont placées une nuit en chambre froide à 4 °C avant d'être incubées à 24°C. Une observation régulière des cultures permet de voir si la transformation est concluante ou non. Les clones transformés sont alors repiqués et propagés sur leur milieu de prédilection.

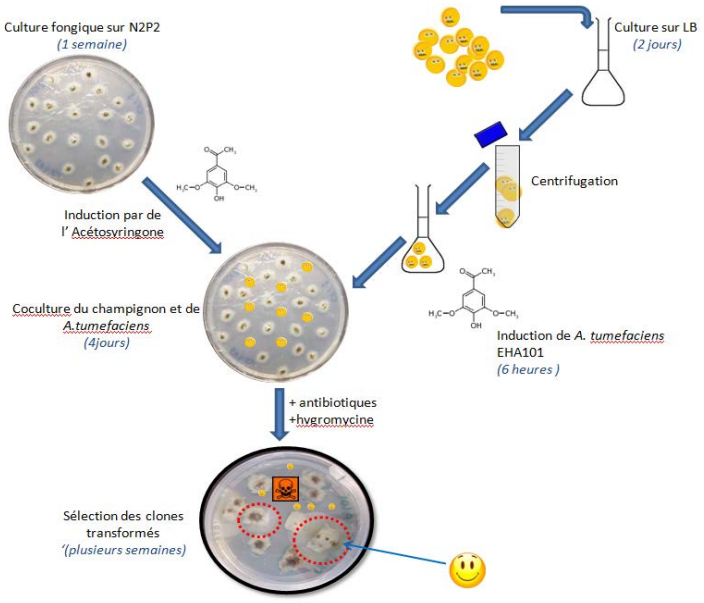


Figure 5: Schéma récapitulant les grandes étapes de l'agro transformation.

2.8. Souches fongiques et ETM

2.8.1. Tests de résistance des souches fongiques aux ETM

La sensibilité des souches aux ETM est estimée en mesurant l'indice MIC (concentration minimale entrainant une inhibition totale de croissance). Dans cette expérience, le milieu malt est utilisé comme milieu de base, à pH 5.5, afin d'avoir une biodisponibilité maximale des métaux et d'éviter leur précipitation sous forme de complexes. Cinq implants de 1mm de diamètre sont placés dans 750 µl de milieu amendé avec différentes concentrations d'ETM : 0 à 900 µM pour le cadmium, 0 à 500 µM pour le cobalt, 0 à 8 mM pour le zinc et 0 à 24 mM pour l'arsenic et le manganèse. La croissance est notée après deux semaines sous agitation (150 rpm).

2.8.2. Mobilisation des métaux-sécrétion de sidérophores

Certains champignons sont capables de sécréter des substances qui vont pouvoir mobiliser ou immobiliser les métaux présents dans le sol. Pour évaluer cette capacité, une culture liquide de chaque souche est tout d'abord réalisée pendant deux semaines. Le milieu est ensuite filtré afin d'éliminer toute particule fongique. Cinq ml de ce milieu sont prélevés et mélangés à 1 g de sol pollué au zinc, au cadmium et au plomb (issu du site de Metaleurop). La suspension est agitée pendant 2 h à 25 rpm. Afin d'éliminer les particules du sol, une centrifugation de ce mélange est réalisée pendant 5 min à 4700 rpm, le filtrat et ensuite récupéré et acidifié avec 200 µL d'acide nitrique pure. Après avoir compléter la solution à 10 ml avec de l'eau ultrapure, l'échantillon est analysé par ICP AES. Pour chaque souche, trois répétitions biologiques sont réalisées.

2.9. Les analyses statistiques

Les données ont étés analysées grâce au logiciel XLstat® et sont présentées sous forme de données moyennées ± erreur standard (SE). Pour chaque expérience un test Anova et un test de Fischer ont étés réalisés afin de vérifier la significativité des différences entre les traitements. Les résultats sont significatifs quand $P < 0,05$.

3. Résultats

3.1. Effet de délaissés industriels sur la croissance, l'accumulation des ETM et la colonisation fongique du chanvre, du peuplier et de l'ortie

3.1.1. Croissance des plantes

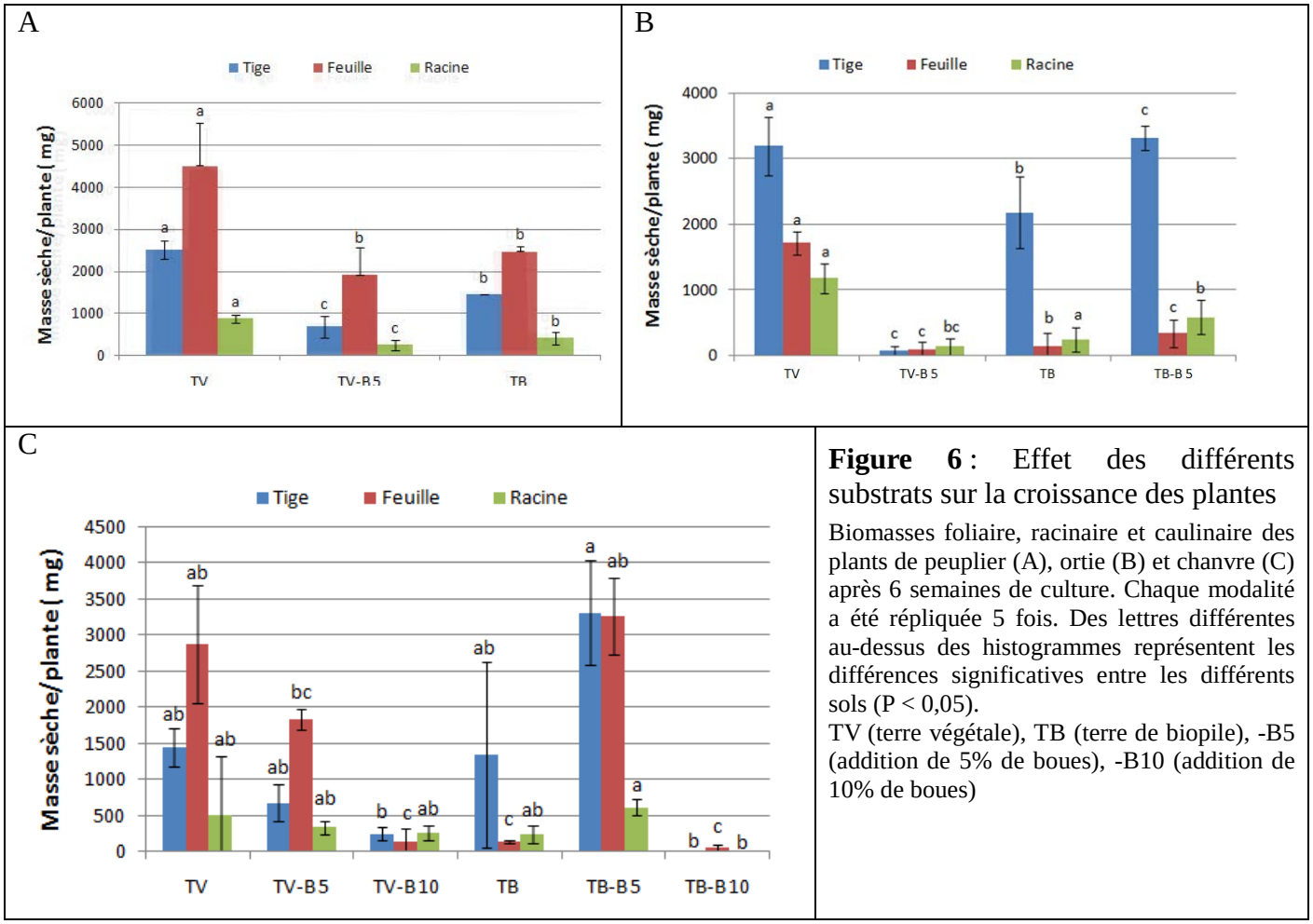


Figure 6 : Effet des différents substrats sur la croissance des plantes

Biomasses foliaire, racinaire et caulinaire des plants de peuplier (A), ortie (B) et chanvre (C) après 6 semaines de culture. Chaque modalité a été répliquée 5 fois. Des lettres différentes au-dessus des histogrammes représentent les différences significatives entre les différents sols ($P < 0,05$).
TV (terre végétale), TB (terre de biopile), -B5 (addition de 5% de boues), -B10 (addition de 10% de boues)

Un des objectifs majeurs du projet Lorver est d'utiliser des délaissés industriels comme supports de culture de plantes d'intérêt économique. Ainsi afin de vérifier que le chanvre, les peupliers et l'ortie peuvent se développer sur de tels substrats pollués, des tests en chambre de culture ont été réalisés. Six modalités sont étudiées : une terre végétale qui servira de référence, une terre issue d'un traitement biopile, et ces deux terres amendées avec 5 ou 10% d'une boue industrielle métallique très riche en ETM.

Après 6 semaines de croissance, toutes les plantes peuvent se développer sur la terre de biopile bien que la croissance soit égale ou inférieure à celle observée sur la terre végétale (Fig. 6).
Avec la terre végétale, l'ajout de la boue entraine une diminution significative de la croissance foliaire, racinaire et caulinaire du peuplier (Fig. 6A) et de l'ortie (Fig. 6B). La diminution la plus importante est observée chez l'ortie où la croissance caulinaire est réduite de 43 fois avec l'addition de 5% de boues. A l'inverse la baisse la plus légère (bien que non significative) est observée pour la croissance foliaire du chanvre (diminution de 1,5 fois avec l'addition de 5% de boues, Fig. 6C).
A contrario, avec la terre de biopile l'ajout de 5% de boues génère une augmentation de la croissance caulinaire de l'ortie (Fig. 6B) et des biomasses racinaire, caulinaire et foliaire du chanvre (Fig. 6C). Aucun plant de peuplier n'a pu se développer sur la terre de biopile lorsque celle-ci est amendée avec

5% de boues. Avec une dose double de boues (10%), seuls les plants de chanvre ont survécu mais présentent une croissance très faible (Fig. 6C).
En parallèle de cette expérience, une mesure du pH des différents sols a été menée avant et après culture des trois espèces (Annexe 7). Les pH mesurés sont compris entre 7,3 (terre végétale) et 9,5 (terres amendées avec 10% de boues). Aucune variation notable n'est observée entre la mesure pré- et post-culture. De même, il n'y a pas d'effet espèce végétale : en effet pour une modalité de sol donnée, le pH du sol est le même quelque soit la plante considérée.

3.1.2. Accumulation des ETM dans les plantes

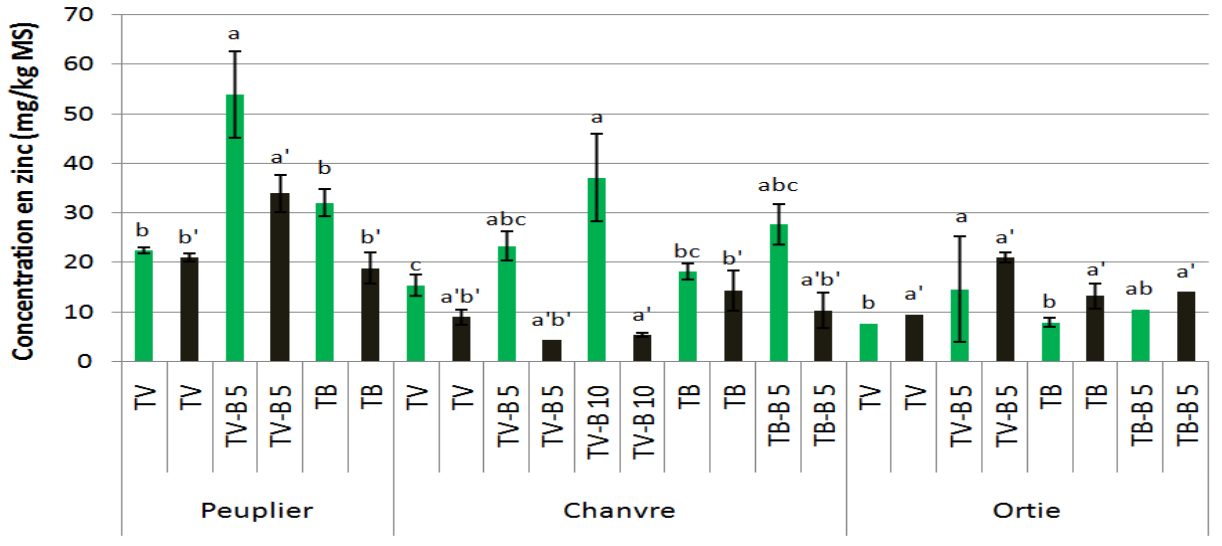


Figure 7 : Effet des différents substrats sur l'accumulation du zinc par le peuplier, le chanvre et l'ortie.

Après deux mois de culture, les tiges (en noir) et les feuilles (en vert) sont récoltées, broyées à l'azote liquide, minéralisées à l'acide nitrique et analysées par ICP-AES. Chaque modalité a été répétée cinq fois. Des lettres différentes au-dessus des histogrammes représentent les différences significatives entre les différentes modalités ($P < 0,05$). TV (terre végétale), TB (terre de biopile), -B5 (addition de 5% de boues), -B10 (addition de 10% de boues)

Afin de connaitre l'effet des boues métalliques sur la capacité d'accumulation en ETM du peuplier, du chanvre et de l'ortie, les teneurs en ETM dans les feuilles et les tiges de ces trois plantes ont été mesurés par ICP-AES (Fig. 7). Parmi les trois espèces, seul le peuplier est capable d'accumuler le cadmium. Des concentrations de 4,2 et de 4,5 mg de Cd / kg MS ont en effet été mises en évidence dans les feuilles et les tiges, respectivement. En ce qui concerne les modalités sans boues, l'analyse montre que les teneurs en Cd sont en-dessous du seuil de détection (5 ppb). Il en est de même pour les autres polluants majeurs contenus dans les boues (Pb, Cu, Ni, Cr, As) : ils ne sont pas accumulés dans les organes des trois plantes.

Chez le peuplier et le chanvre, le zinc est préférentiellement accumulé dans les feuilles, à l'inverse de l'ortie où le zinc est majoritairement retrouvé dans les tiges. La concentration en zinc augmente nettement dans les plantes se développant sur les terres amendées en boues. La plus forte concentration en zinc est observée dans les feuilles du peuplier.

3.1.3. Dénombrement et observation de l'inoculum endogène

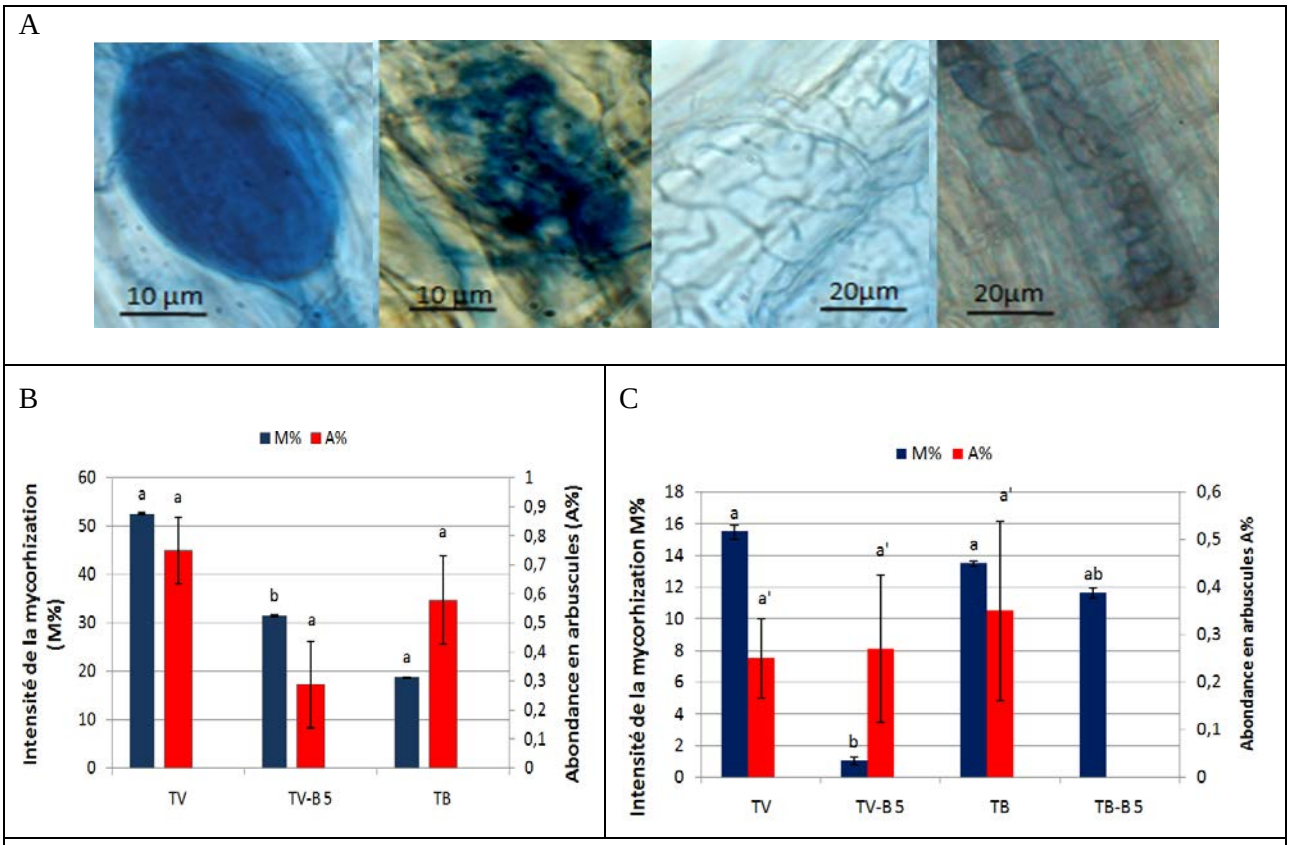


Figure 8 : Colonisation fongique des racines

A : Mise en évidence de structures fongiques. De gauche à droite : vésicule, arbuscule endomycorhiziennes, racine colonisée par des hyphes d'un champignon endophyte et microsclérotes d'un champignon de type « Dark septate endophyte ». Photographies issues d'observations (X 100) de cellules corticales de peuplier.
B et C : Abondance moyenne en arbuscules (A%) (+/- SE ; n = 5) et intensité moyenne de la mycorhization (M%) (+/- SE ; n = 5) du peuplier (C) et du chanvre (D) après 6 semaines de culture. Des lettres différentes au-dessus des histogrammes représentent les différences significatives entre les différentes modalités (P < 0,05).

La colonisation fongique des racines du peuplier, du chanvre et de l'ortie a été quantifiée grâce à la méthode de Trouvelot (Annexe 6). Au sein des racines, les structures fongiques ont été mises en évidence (coloration bleutée) via une incubation dans du bleu de méthyle. Par cette stratégie, les différentes structures caractéristiques d'une colonisation des racines par des champignons endomycorhiziens (vésicule, arbuscule, Fig. 8A) et par des champignons endophytes (hyphes, microsclérotes, Fig. 8A) ont ainsi été mises en évidences.

Le taux de colonisation par les champignons endomycorhiziens a également été déterminé. Le taux de colonisation des racines de peuplier est très élevé (52%) sur la terre végétale, et n'est que de 19% sur la terre de biopile (Fig. 8C). Pour le chanvre, les taux observés entre les modalités terre végétale et terre de biopile sont quasi-identiques (14 à 16%) (Fig. 8D). Pour le peuplier et le chanvre, une diminution du taux de mycorhization est observée suite à l'ajout de boues. On observe en parallèle une augmentation de la colonisation des racines par des champignons de type endophytique (résultats non montrés). Le taux d'arbuscules ne varie pas significativement quelque soit la modalité et la plante considérée (Fig. 8C et 8D). Une absence d'arbuscules a cependant été notée pour le chanvre sur la modalité terre de biopile amendée de 5% de boues (Fig. 8D). Quelque soit la modalité considérée, aucune colonisation fongique n'a été observée chez les racines de l'ortie (résultats non montrés).

3.2. Identification et caractérisation de souches fongiques endophytes isolées de sols pollués aux métaux lourds

3.2.1. Identification moléculaire des souches isolées

Afin de déterminer le genre, voire l'espèce des souches fongiques isolées, une amplification de l'ADN des régions ITS a été menée, suivi du séquençage des produits PCR obtenus. Des comparaisons des séquences obtenues aux séquences déposées dans les bases de données du NCBI ont été effectuées (Tableau II).

Tableau II : Affiliation taxonomique des souches fongiques isolées de sols pollués aux métaux lourds

Souches	Affiliation taxonomique	Score maximum	Score total	Signification statistique de l'homologie	Identité (%)	Numéro d'accession
MSK2,1	Uncultured Hyaloscyphaceae	915	915	0.0	99	EU754980.1
MSK2,2	Cadophora sp.	963	963	0.0	99	JN995642.1
MSK2,7	Leptodontium	1048	1048	0.0	100	JX244008.1
MSK2,8	Entrophospora	1116	1116	0.0	99	AY035666.1
MSK2,9	Leptodontium	990	990	0.0	99	JX244008.1
MSK2,10	Cadophora finlandica	889	889	0.0	99	DQ485203.1
M01	Ascomycota sp.	676	676	0.0	92	FJ896405.1
M02	Trichopezizella nidulus	752	752	0.0	94	U57813.1
M03	Helotiales sp.	926	926	0.0	99	JN859276.1
M04	Ascomycota sp.	701	701	0.0	92	FJ896405.1
P01	Helotiales sp.	913	913	0.0	99	JN859281.1
P02	Helotiales sp.	870	870	0.0	99	JN859276.1
P04	Uncultured Sebacina	702	702	0.0	93	EU910924.1
P06	Helotiales sp.	924	924	0.0	99	JN859276.1
Pi6	Phialophora mustea	974	1088	0.0	99	AB190404.1
Ce4	Phialocephala fortinii	933	933	0.0	99	GQ302683.1
Eu1,11	Cadophora sp.	1009	1009	0.0	100	KC007187.1
CY1-2	Leptodontidium orchidicola	1066	1066	0.0	100	GQ302678.1
V16	Helotiales sp.	933	933	0.0	99	JN859270.1

Les résultats de ces analyses, via l'outil BLAST, montrent des scores et des probabilités très fiables, avec un pourcentage d'identité de 99 ou 100%. Ainsi la détermination du genre a pu être effectuée dans la plupart des cas. Seules les souches M03, P01, P04, P06 et V16 n'ont pu être identifiées qu'au niveau de l'ordre (voire au niveau du phylum pour M01 et M04). Pour les souches M03, P01, P04 et P06 des informations concernant leur appartenance à l'ordre des Hélotiales ainsi qu'une probable association de type éricoïde ou ectomycorhizienne avec l'hôte végétal ont pu être obtenues via le site du NCBI.
Après alignement des séquences obtenues avec celles d'autres champignons clairement identifiés, un arbre phylogénique a alors été généré (Annexe 8). En comparant les séquences obtenues après séquençage aux séquences de la base de données NCBI et au vu des proximités phylogéniques, il ressort que les souches 2.1, 2.2 , 2.7, 2.9, 2.10, Pi6, Ce4, Eu1-11 et CY1-2 appartiennent aux genres *Cadophora*, *Leptodontidium*, *Phialophora* et *Phialocephala*, ce qui suggère leur appartenance à la classe des dark septate endophytes (DSE). Lors des expériences de caractérisation des souches, un intérêt particulier sera, par la suite, porté sur ces 9 souches. Il apparaît que les séquences obtenues pour les souches M01 et M04 ; 2.7 et 2.9 ; et P01 et P06 sont identiques. Ce résultat suggère qu'à chaque fois les deux souches pourraient être les mêmes. Il a alors été décidé de ne conserver qu'une seule de ces deux copies dans certaines des expériences décrites ci-après.

3.2.2. Optimisation des modes de culture des souches

Au préalable à un test d'inoculation au champ et afin de faciliter les différentes autres expériences envisagées, il est nécessaire de produire rapidement une quantité suffisante de l'inoculum fongique considéré. A cette fin, il est indispensable de déterminer le milieu sur lequel les souches se développent

efficacement. Quatre milieux de culture ont ainsi été testés : Malt, Pachlewski, MMN et N2P2. Le tableau III représente les diamètres de chaque souche après 3 semaines de culture.(Annexe 9)

Tableau III : Détermination du milieu optimal de culture des souches fongiques

Les valeurs ci-dessous sont les diamètres moyens (+/- SE) obtenus après 3 semaines de culture sur milieu gélosé à pH 5.5. Les lettres en minuscules représentent les différences significatives (P<0.05) (ANOVA, test de Fisher.) Chacun des échantillons est répété trois fois.

Milieu	Souches											
	P04	P06	V16	M03	M04	M02	2.1	2.2	P02	2.7	2.8	2.10
MALT	6,67 a	3,03 a	4,37 a	3,07 a	3,9 a	2,87 a	2,97 ab	5,17 a	3,23 a	4,8 a	5,03 a	2,53 a
N2P2	2,23 b	1,7 b	1,67 b	1,43 b	1,97 b	1,2 b	2,73 ab	3,23 b	1,83 b	4,3 a	2,07 b	2,27 a
MMN	1,73 b	2,03 b	1,9 b	1,73 b	2,63 b	1,03 c	2,27 a	2,9 b	1,93 b	3,93 a	1,57 b	2,57 a
Pachlewski	4,23 c	2,6 a	2,23 b	2,4 c	2,63 c	1,53 d	3,53 b	5,23 a	3,47 a	5,23 a	5,37 a	2,5 a

Certaines souches, telles que 2.7 ou 2.10, sont capables de se développer correctement sur l'ensemble des milieux. A l'inverse, la plupart des autres souches présentent un bon développement sur un à deux milieux uniquement. On pourra citer, par exemple, la souche M02 dont seul le milieu malt permet une croissance optimale, ou encore la souche P04 où seuls les milieux Pachlewski et malt permettent d'acquérir une croissance optimale. Au final, et dans l'objectif de comparer/uniformiser les résultats entre les différentes souches, le milieu malt sera utilisé pour les repiquages d'entretien des souches car il permet une production importante de biomasse pour toutes les souches. D'autre part, étant donné que certains tests nécessitent un changement de la composition initiale en certains éléments (fer, azote, carbone), c'est le milieu Pachlewski dont la composition est parfaitement connue qui sera utilisé pour les différents tests.

3.2.3. Détermination des différentes sources carbonées dégradés par les souches fongiques

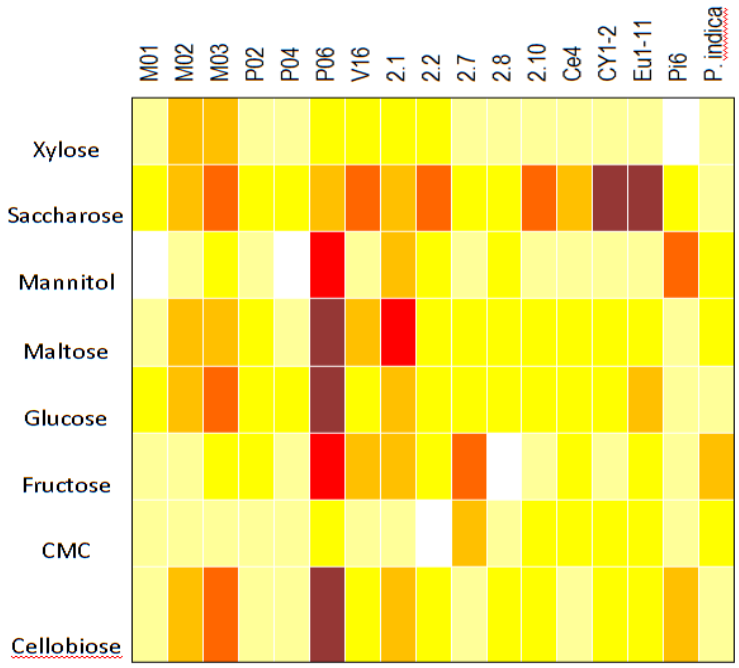


Figure 9 : Capacité de dégradation des sucres par les souches fongiques.

Carte des couleurs représentant la masse sèche moyenne (n = 3) des 17 souches fongiques, après deux semaines de culture liquide en milieu Pachlewski enrichi par 8 g/L de carbone. CMC = carboxy-méthyl cellulose.

La cellulose (Avicel), la lignine, l'amidon et le xylane sont insolubles et adhèrent aux hyphes, engendrant ainsi un biais dans la mesure de la biomasse fongique produite. De ce fait, la croissance fongique sur ces cinq substrats n'est pas comparée à celles des autres sucres. Cependant une observation visuelle permet d'observer si il y a eu ou non croissance. Toutes les souches sont capables de croitre sur milieu amidon, cellulose et xylane, excepté M02 sur xylane et P04 sur cellulose. Seule P02 est capable d'amorcer une croissance en présence de lignine (résultats non montrés).

Au regard de la carte des couleurs (Fig. 9) et des études statistiques associées (Annexe 10), tous les champignons sont capables de se développer, avec des différences de rendement, sur l'ensemble des autres sucres à l'exception des souches 2.2 en présence de carboxy-méthyl cellulose (CMC), V16 avec le fructose, Ce4 avec le mannitol et M02 avec le xylose.
Les sucres simples (maltose, fructose et glucose) permettent à toutes les souches, sauf M02, de produire une biomasse. Cependant la quantité produite est variable. Les souches P02, P06, V16, Ce4, Pi6 et *Piriformospora indica* présentent une croissance faible en présence de fructose. *Piriformospora indica* et Ce4 se développent mal sur un milieu enrichi en maltose. Le mannitol permet la production optimale de biomasse uniquement pour les souches Eu1-11, 2.10, 2.7, 2.2, V16, M02 et M01. En ce qui concerne les composés issus du catabolisme des polymères des parois des cellules végétales, seules les souches Pi6, Eu1-11, 2.10, 2.8, 2.7 et 2.2 sont capables de dégrader le xylose. La cellobiose est dégradée par la majorité des souches mais avec des intensités très différentes ; à l'image de 2.10 qui développe une biomasse de 206,4 mg au bout de deux semaines, et des souches 2.1 et M01 qui ne développent que très peu de biomasse sur ce milieu. Enfin, et pour la majorité des souches, à l'exception des souches 2.10, 2.7, 2.1, M02 et M01, la croissance fongique est significativement plus importante en présence de saccharose.

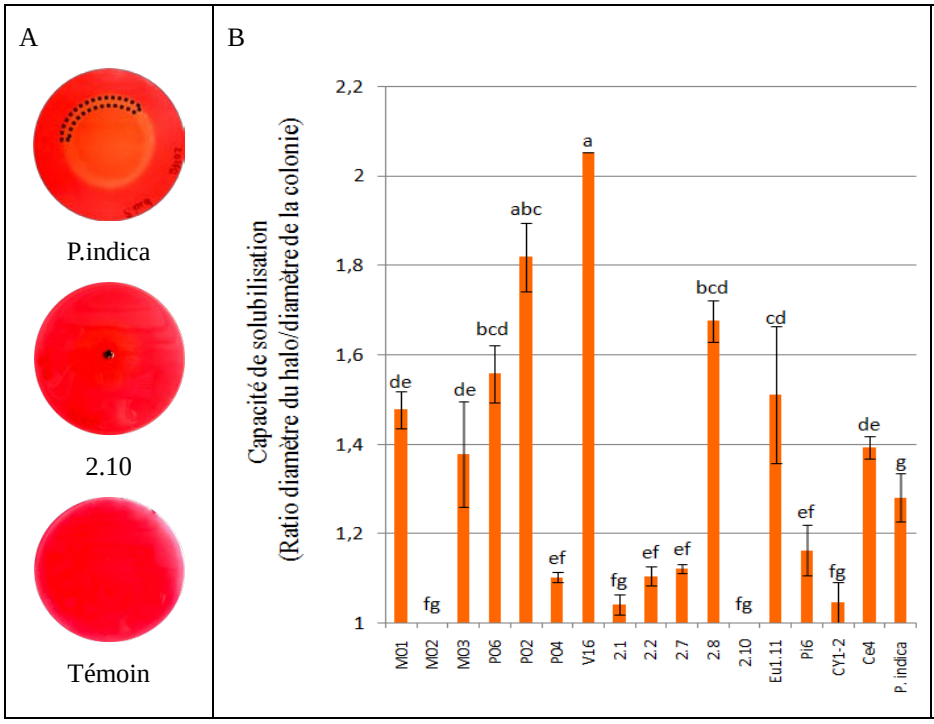


Figure 10: Capacités de solubilisation de la carboxy-méthyl cellulose (CMC) par les souches fongiques

(A) Boites de milieu gélosé illustrant les halos (orangés) après coloration au rouge Congo issus de la solubilisation de la CMC. Les traits en pointillés dénotent la zone du halo orangé qui est externe à la colonie.

(B) Ratio moyen (+/- SE ; n = 3) pour les 17 souches après trois semaines de culture sur milieu Pachlewski gélosé enrichi en CMC. Les lettres différentes au-dessus des histogrammes dénotent des différences significatives ($P < 0,05$).

Afin de quantifier la capacité de solubilisation de la cellulose par les différentes souches fongiques un test colorimétrique au rouge Congo a été réalisé. La cellulose intacte incubée avec du rouge Congo donne une coloration rouge intense au milieu gélosé. Un halo orangé obtenu après coloration reflète quant à lui une dégradation de la cellulose (Fig. 10A). Afin de comparer les résultats entre eux, le ratio « diamètre du halo orangé / diamètre de la colonie fongique » est alors calculé pour chaque souche (Fig. 10B). Certaines souches semblent peu ou pas dégrader la CMC. C'est le cas des souches M02 et 2.10 (aucun halo orangé visible à l'extérieur des colonies) mais aussi (dans une moindre mesure) des souches P04, M01, M03, 2.1, 2.2, 2.7, Pi6, Ce4 et *Piriformospora indica* dont les ratios oscillent entre 1,04 et 1,44. A l'inverse, les souches P06, P02, V16, 2.8 et Eu1-11 semblent posséder une forte activité cellulosique (ratios variant entre 1,5 et 2,1).

3.2.4. Evaluation de l'effet des souches fongiques sur le développement des plantes hôtes

Un test en condition axénique et un en conditions non stériles ont été réalisés afin d'étudier quel est l'effet d'une inoculation par des souches DSE sur la croissance de deux plantes hôtes, le ray-grass et la luzerne. Les résultats sont présentés dans les figures 11 et 12.

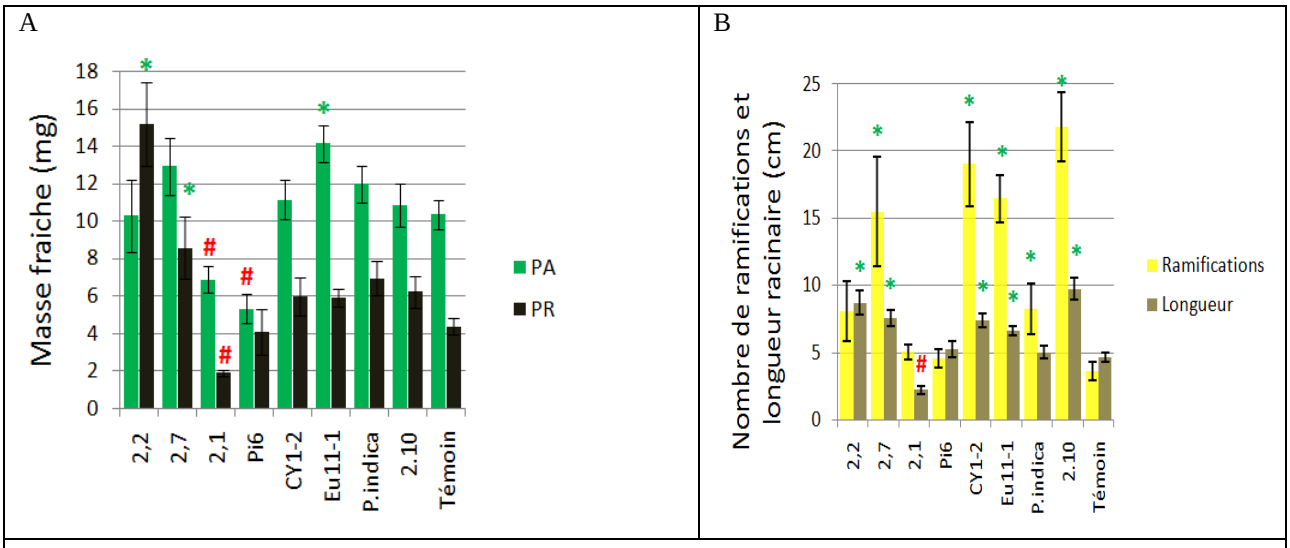


Figure 11 : Effet de l'inoculation par des DSE sur le développement du ray-grass en conditions axéniques.

(A) Les masses fraiches des parties aériennes (PA), racinaires (PR), et (B) la longueur des racines et le nombre de ramifications sont mesurées après deux semaines en dispositif bi-compartimenté, dans une étuve de germination à 22°C. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard à la moyenne (n = 10). Les souches présentant une étoile verte ont une croissance significativement supérieure au témoin (non inoculé), alors que celles présentant un Diez rouge ont une croissance significativement inférieure (P < 0,05).

En conditions axéniques, une inoculation par les souches 2.2 et 2.7 stimule la croissance racinaire du ray-grass, alors que l'inoculation par la souche Eu1-11 induit une augmentation de la biomasse aérienne (Fig. 11). A l'exception de 2.1 et Pi6 toutes les souches semblent stimuler la formation de racines secondaires et l'élongation racinaire. L'inoculation par les souches Pi6 et 2.1 engendrent à l'inverse une inhibition du développement aérien du ray-grass, et une inhibition du développement racinaire est également suite à une inoculation avec la souche 2.1.

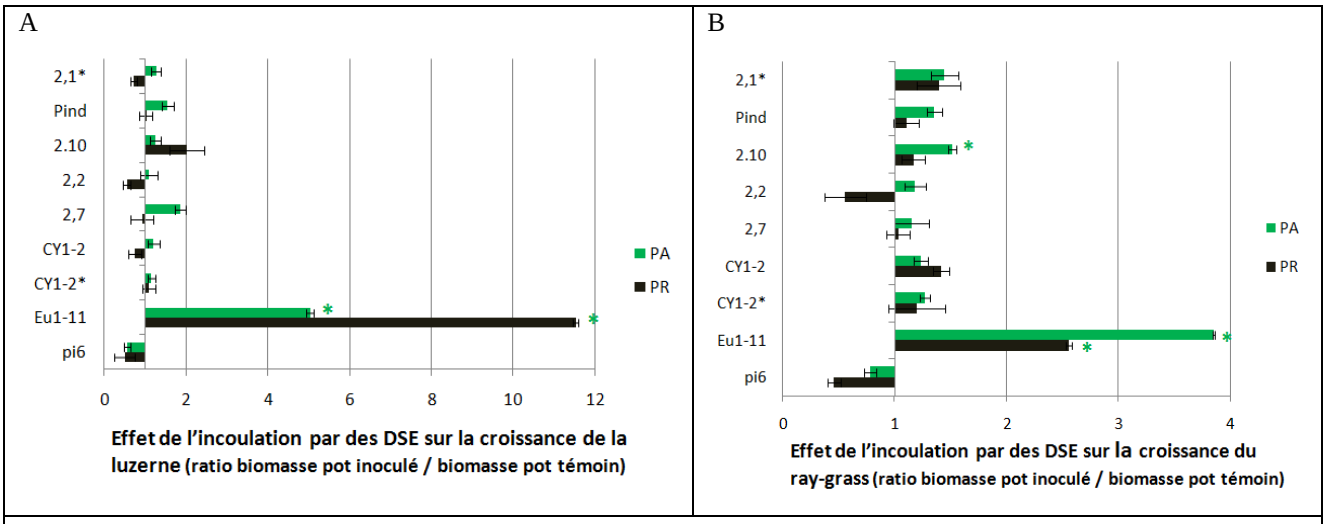


Figure 12 : Etude de l'effet de l'inoculation par des DSE sur la croissance de la luzerne (A) et du ray-grass (B) en condition non stériles

Les masses sèches des parties aériennes (PA) et racinaires (PR) sont pesée après un mois de culture en chambre phytotronique. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard à la moyenne. Les souches présentant une étoile verte ont une croissance significativement supérieure à celle du témoin.

En conditions non stériles, même si des tendances se dessinent (augmentation ou diminution de la croissance suite à l'inoculation), on observe beaucoup moins de différences significatives entre plants inoculés et plants témoins. Dans le cas de la luzerne, seule une inoculation par la souche Eu1-11 semble stimuler les développements racinaire et aérien. En ce qui concerne le ray-grass, en plus de Eu1-11, la souche 2.10 stimule également sa croissance aérienne.

3.2.5. Apport des biotechnologies : agro transformation GFP des souches fongiques.

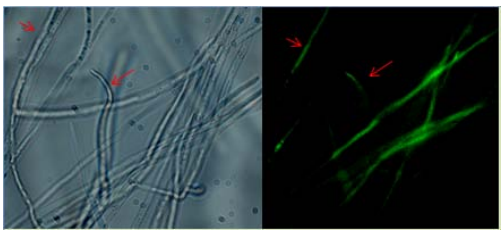


Figure 13 : Mycélium de la souche CY1-2 transformée par *Agrobacterium tumefaciens* et exprimant la GFP.
Les photographies ont été prises au grossissement x100. A gauche : en lumière blanche, et à droite en lumière polarisée.

Afin de pouvoir (i) caractériser le type d'interaction entre la plante hôte et les souches fongiques étudiées, et (ii) suivre la colonisation par une souche donnée dans un sol où seront présents de nombreux champignons, une expérience d'agrotransformation de quelques souches a été réalisée afin de leur intégrer un marqueur (GFP). Cette transformation a été réalisée avec la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* contenant le plasmide EHA101 qui possède une cassette permettant d'intégrer et d'exprimer la GFP dans un hôte fongique. Quatre souches fongiques ont ainsi pu être transformées par cette méthodologie: les souches 2.1, 2.2, CY1-2 et Eu1-11 avec respectivement 47, 24, 23 et 17% de réussite au niveau du taux de transformation des colonies. Les transformants sont apparus après une semaine d'incubation pour les souches à croissance rapide (Eu1.11 et CY1-2) alors que pour la souche 2.1, trois semaines ont été nécessaires à l'apparition de ces derniers. L'ensemble des transformants a été observé au microscope à épifluorescence et une différence d'intensité dans le niveau d'expression de la GFP a été observé. Pour les expériences de co-culture (paragraphe 3.2.5), seuls les transformant exprimant la GFP avec une forte intensité ont été utilisés.
La GFP est présente dans le cytoplasme des hyphes. L'expression est constitutive et est stable lors des repiquages successifs des colonies.
Pour la souche EU1.11, trois des transformants présentent un phénotype différent de la souche non transformée. Une coloration très claire du mycélium est visible chez ces derniers alors que la souche sauvage est grise-noire (Annexe 13). Pour tous les autres transformants, le phénotype est identique au phénotype sauvage (résultats non montrés).

3.2.6. Souches fongiques et ETM

3.2.6.1. Évaluation de la tolérance métallique des souches fongiques

Dans le but d'utiliser certaines des souches dans des programmes de phytoremédiation assistée, il est, au préalable, nécessaire de déterminer leur niveau de tolérance aux métaux. Ainsi, la croissance des 17 souches sur milieu malt contenant soit du zinc, du cadmium, de l'arsenic, du cobalt ou du manganèse a été observée après deux semaines de culture (Annexe 11). La figure 14 résume l'ensemble des résultats obtenus pour chaque souche. La valeur retenue ici correspond à la détermination de la concentration minimale inhibitrice (MIC) (aucune croissance).
Les souches Pi6, CY1-2, Eu1-11 et Ce4 présentent des valeurs élevées de MIC (500µM) pour le cobalt, il en est de même pour *Piriformospora indica* (Pind), 2.1 et P06 (500µM). Les résistances fortes à l'arsenic et au manganèse semblent restreintes à trois souches : M01 (24 mM), 2.8 (24 mM) et 2.1 (14 mM) pour le manganèse et *P. indica* (24 mM), P04 (24 mM) et V16 (20 mM) pour l'arsenic.
Concernant le cadmium, les souches 2.2, V16 et Eu1-11 présentent les valeurs de MICs les plus importantes avec respectivement 900 µM et 600 µM alors que l'ensemble des autres souches présentent des tolérances moindres (de 25 µm pour la souche 2.8 à 300 µM pour CY1-2).
Pour l'élément zinc, deux groupes distincts peuvent être observés : les souches sensibles avec des valeurs de MICs variant de 1 à 2 mM (P02, P04, P06, M03, V16, 2.8, P. ind et CY1.2) et, à contrario des souches résistantes (M01, M02, 2.1, 2.2, 2.7, 2.10, Eu 1.11, Ce4 et Pi6) dont les MICs varient de 4 à 7 mM.

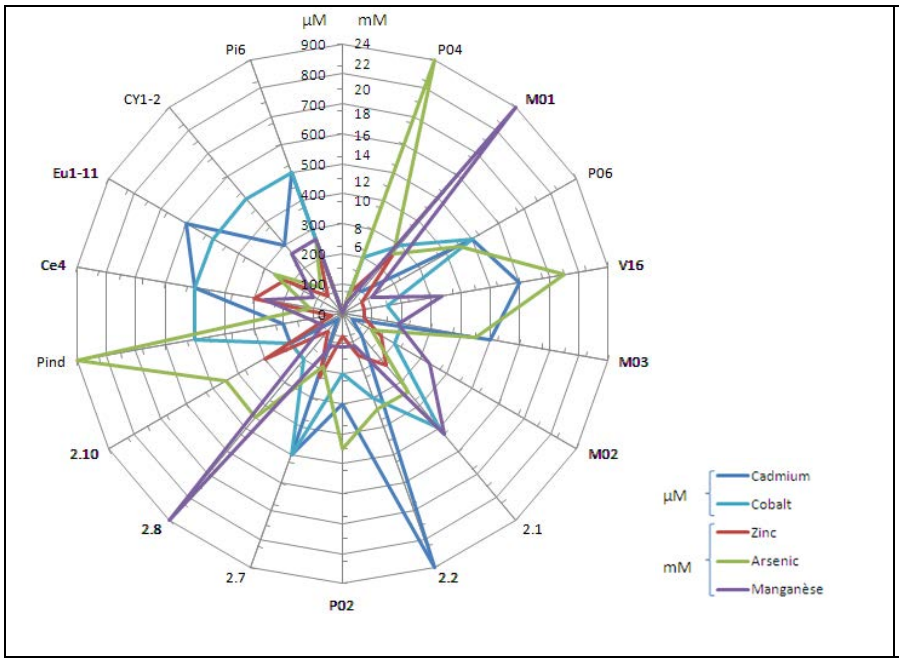


Figure 14: Tolérance métallique des souches fongiques

Graphique radar représentant les MIC (concentration minimale inhibitrice) de chaque souche fongique pour le cadmium, le cobalt, le zinc, le manganèse et l'arsenic. Les valeurs des MIC sont déterminées visuellement et sont exprimées soit en µM soit en mM selon les éléments métalliques considérés. Cinq implants de 1 mm de diamètre ont été inoculés dans 750 µl de milieu malt contaminé en métaux à différentes concentrations, sous agitation à 150 rpm pendant deux semaines, à l'obscurité et à 24°C.

Il est également à noter qu'il existe une grande variabilité interspécifique, puisque les souches 2.2, 2.10 et Eu1-11, appartenant au genre *Cadophora*, et 2.7, 2.9 et CY1-2 qui appartiennent au genre *Leptodontidium* ne présentent pas les même profils de résistance.

3.2.6.2. Mesure de la capacité des exsudats fongiques à mobiliser les ETM du sol

Certains champignons sont capables de sécréter des sidérophores ou des acides organiques afin de mobiliser certains éléments du sol. Afin d'évaluer cette mobilisation potentielle, une analyse du contenu en ETM par ICP-AES (Fig. 15) a été menée sur un mélange milieu de culture – sol pollué.

Dans le cas du cuivre et de l'arsenic, il n'existe pas de différences significatives entre le témoin et les souches isolées (résultats non montrés). Pour le manganèse, une incubation du sol avec les milieux issus des cultures des souches P06, M03, Eu1-11 et 2.7 induit une augmentation de la concentration en Mn en solution (résultats non montrés). Pour ces mêmes souches, ainsi que pour Pi6, M03, CY1-2 et 2.8, un résultat similaire est évident avec le Cd (augmentation de la concentration en Cd en solution). (Fig. 15)

La souche M03 engendre une mobilisation six fois supérieure du zinc par rapport au témoin et la souche Pi6 une mobilisation du Pb quatre fois plus importante. Les souches P02, P04, M01, M02, V16, 2.1, 2.2, 2.9, 2.10 et Ce4 ne présentent significativement pas de mobilisation accrue du Pb (résultats non montrés).

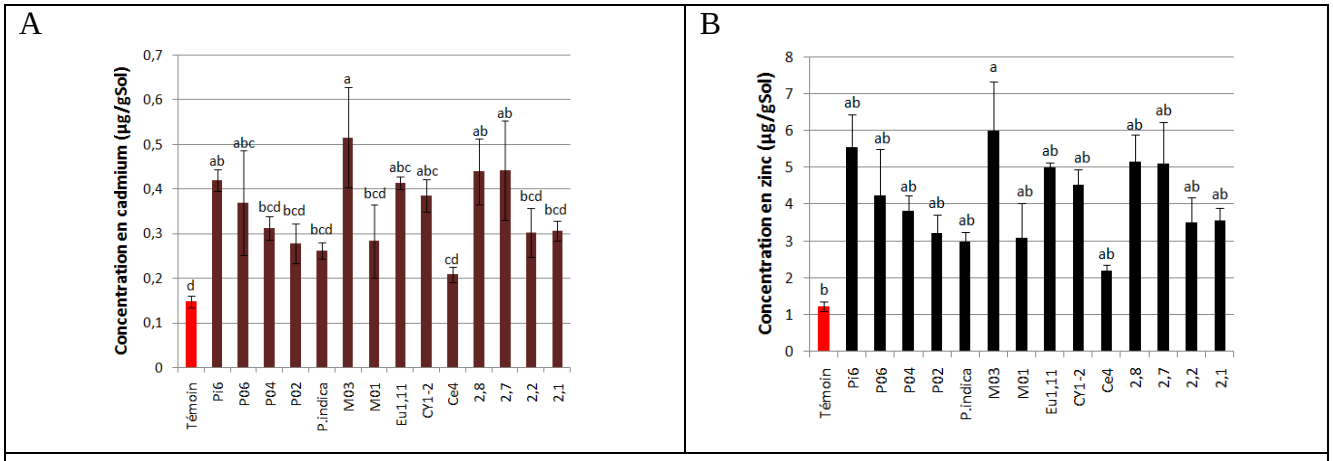


Figure 15 : Capacité de mobilisation du cadmium et du zinc par les exsudats fongiques

Les barres d'erreurs représentent les erreurs standard à la moyenne (n = 3). Les échantillons présentant des valeurs significativement différentes sont représentés avec des lettres différentes (P < 0,05).

4. Discussion

4.1. Réponse du chanvre, du peuplier et de l'ortie aux délaissés utilisés

Un des objectifs du projet LORVER est de produire de la biomasse à usage non alimentaire sur des friches industrielles en utilisant des délaissés éventuellement pollués. Plus précisément, il s'agissait ici d'évaluer le risque de transfert de polluants métalliques à la biomasse produite sur de tels délaissés. Dans le cadre du début du projet LORVER, il n'a pas été possible de transporter et d'utiliser un sol pollué « historiquement » pour des raisons juridiques. Ainsi, afin de pallier à ce désagrément, un sol pollué à été généré en utilisant une boue métallique mélangée, en différentes proportions à une terre végétale et/ou une terre issue de biopile. Un des objectifs de ce stage consistait ainsi à évaluer la capacité de trois espèces sélectionnées (peuplier, chanvre, ortie) à se développer en présence de telles contaminations métalliques.
Le peuplier est une plante accumulatrice et généralement résistante aux métaux lourds, il est déjà utilisé dans des projets de phytoremédiation (Wang et Jia, 2010 ; Ruttens *et al.*, 2011, Chalot *et al.*, 2012). Cependant lors de nos tests menés au laboratoire, il s'est avéré que le peuplier ne se développait que sur les modalités « terre végétale », « terre de biopile » et « terre végétale amendée avec 5 % de boues ». L'absence de croissance observée sur les autres modalités pourrait s'expliquer par des propriétés physico-chimiques particulières du sol. L'annexe 5 présente les pH des différents sols avant plantation et après culture. Tous les sols ont des valeurs de pH proches de huit, donc ces sols sont très basiques et ne conviendraient pas à la culture du cultivar Skado dont l'optimum de croissance est situé entre pH 5 et 7 (FCBA, non publié).
L'ortie est une plante souvent identifiée sur des friches industrielles et des sites contaminés aux métaux lourds (Bert *et al.*, 2012). Cependant lors du test, seules les plantes des modalités « terre végétale » et « terre de biopile » se sont développées de manière satisfaisante (survie et croissance faible en présence de 5 % de boues). Le pH optimal à la culture de l'ortie dioïque est entre 6 et 7 (Dufresne et Ouellet, 2009). Le faible taux de survie et la faible production de biomasse pourraientt donc aussi être liés au pH inapproprié du sol.
Le chanvre est une plante dont les propriétés ont déjà suscité de l'intérêt dans le cadre de la re-végétalisation de sites pollués. (Linger *et al.*, 2002 ; Kos *et al.*, 2003). Il est résistant aux métaux lourds et s'adapte à de nombreux sols et climats (Citterio *et al.*, 2003). Cette résistance a été confirmée lors de notre test où le chanvre fut la seule espèce à se développer sur les six modalités (mais faiblement sur les sols enrichis avec 10 % par les boues métalliques). Cette résistance aux métaux pourrait en partie s'expliquer par la présence dans ses tissus de très grandes quantités de molécules thiolées, de phytochélatines et de glutathion (Citterio *et al.*, 2003).

Le pH du sol à également une incidence prononcée sur la biodisponibilité des ETM dans le sol (Violante *et al.*, 2010). A faible pH, on retrouve essentiellement les formes les plus biodisponibles des ETM, alors qu'en milieu basique les métaux sont essentiellement sous des formes non biodisponibles. Il est alors très probable que ce paramètre explique les très faibles teneurs en métaux répertoriées dans les organes des trois plantes.
Dans le cas du chanvre, les mesures par ICP-AES ont donné des valeurs pour le plomb et pour le zinc très faibles par rapport à ce que relatent certains articles de recherche. Des valeurs de capacité d'extraction variant de 0,02 g $Cd.ha^{-1}$/période de végétation (Kos *et al.*, 2003) à 126 g $Cd \cdot ha^{-1}$/période de végétation (Linger *et al.*, 2002), 5,5 kg/ha pour le plomb et 2,6 kg/ha pour le zinc (Kos *et al.*, 2003). Tout comme dans notre étude, le cadmium et le plomb sont accumulés en majorité dans les racines, puis dans les feuilles et dans une moindre mesure dans les tiges (Linger *et al.*, 2002).
La même observation est transposable au peuplier, pour lequel des concentrations maximales de 53 mg/kgMS pour le zinc, de 1,3 mg/kgMS pour le plomb et 4,6 mg/kgMS pour le cadmium ont été mesurées lors de l'expérimentation en phytotron. Ces valeurs sont très faibles comparées aux 200 à 1000 mg/kg MS de zinc, 5,9 à 44 mg/kg MS pour le cadmium et 20,6 à 1000 mg/kg MS pour le plomb trouvés sur des sols aux propriétés très proches mais de pH faibles (Chalot *et al.*, 2012 ; Migeon *et al.*, 2009).
Enfin, la même conclusion est également applicable à l'ortie où des auteurs (Malizia *et al.*, 2012 ; Grubor, 2008 ; Gjorgieva *et al.*, 2011) ont pu mesurer des capacités d'accumulation à la fois pour le zinc, le plomb et le cadmium, dans les feuilles, les tiges et les racines entre 2 et 200 fois supérieures à celles observées lors de l'expérimentation LORVER.

Une troisième partie de ce travail consistait en l'étude de la colonisation fongique endogène au niveau des racines des trois espèces végétales sélectionnées.
Dans le cas de l'ortie aucune structure fongique n'a été observée. Les rares données de la littérature confirment ce fait. L'absence de mycorhization chez l'ortie pourrait être la conséquence de deux facteurs : soit l'ortie est incapable de sécréter les molécules « signal » nécessaires à l'instauration du dialogue entre les deux partenaires de la symbiose, soit l'ortie sécrète des UDA lectines, des molécules antifongiques et antibactériennes, par les racines (Vierheilig *et al.*, 1996) qui seraient responsables d'une inhibition de la germination des spores et de la croissance des hyphes.
Les racines de chanvre sont colonisées sur les six modalités testées. Certaines publications ont inventorié les hôtes fongiques du chanvre sur sol pollué ou non pollué. Des souches appartenant aux genres *Glomus, Rhizoctonia, Penicillium, Pestaliopsis, Curvularia* et également quelques champignons appartenant au groupe des *dark septate endophytes* (DSE) ont été identifiés (Kusari et al., 2013). Sur sol non pollué, la teneur en arbuscules est de 0,25 % sur terre végétale et de 0,35 % sur terre de biopile, ce qui parait faible comparé au 1,2 % cité dans la littérature (Zubek et Buchwald, 2012). Cette différence peut être due à la trop courte durée de l'expérimentation ou à l'absence totale du facteur climatique lors de la réalisation de tests en chambre de culture. Il faut également prendre en compte les différents composant présents dans le sol, que ce soit la concentration en ETM qui peut engendrer une diminution des populations fongiques peu résistantes, ou la composition en nutriments dont particulièrement le phosphore et l'azote. En effet un excès d'un de ces deux éléments est très défavorable à la mycorhization. (Christie *et al.*, 2004)
Peu de données sont disponibles concernant la diversité des communautés fongiques associées aux racines du peuplier, on peut néanmoins citer des travaux récents qui ont inventorié les souches fongiques colonisant l'appareil racinaire du peuplier sur des sites pollués ou non aux métaux lourds (Lacercat-Didier, 2013). Dans cette étude, les genres suivants ont été répertoriés : *Hebeloma, Glomus, Sebacina, Tricholoma, Peziza* ainsi que des champignons appartenant au groupe des DSE.
L'observation des racines a permis d'observer que l'augmentation de la teneur en polluants (boues métalliques) engendre un changement du taux de colonisation. Une diminution des symbioses à arbuscules et une augmentation des champignons de type DSE ont en effet été observés dans notre étude. Ce phénomène a été relaté dans différents articles (Citterio *et al.*, 2005 ; Likar et Regvar, 2009 ; Regvar *et al.*, 2010). La mélanine présente en grande quantité dans les parois des champignons endophytes permettrait la chélation des métaux lourds et apporterait ainsi une protection accrue, absente chez les symbioses endomycorhiziens.
L'association de certains champignons avec les racines peut induire une protection de la plante contre les ETM. L'utilisation conjointe de plantes et de leurs microorganismes associés sur des sols pollués fait partie du concept de phytoremédiation assistée. C'est dans ce contexte que dix-sept souches fongiques, récemment isolées, ont été caractérisées. L'objectif étant de déterminer si certaines d'entre elles pourraient être utilisées à plus long terme dans des expériences de phytoremédation assistée.

4.2. Caractérisation de souches fongiques endophytes isolées de sols pollués aux métaux lourds

La première étape a été de nommer ces souches fongiques après analyse des résultats de séquençage de la région ITS de l'ADNr. Les souches *Piriformospora indica* et P04 appartiennent toutes deux à l'embranchement des Basidiomycètes et à l'ordre des *Sebacinales*. L'ensemble des autres souches sont des Ascomycètes dont la plupart appartiennent à l'ordre des Hélotiales. Les souches M02 et 2.1 appartiennent à la famille des *Hyaloscyphaceae*, les souches CY1-2, 2.7 et 2.9 appartiennent au genre L*eptodontidium*, les souches 2.2, 2.10 et Eu1-11 appartiennent au genre *Cadophora*. Les souches Ce4 et Pi6 appartiennent respectivement aux genres *Phialocephala* et *Phialophora.* Ces 10 souches appartiendraient ainsi au groupe des DSE (Dark Septate Endophytes). La coloration grise-noire (due à la présence de mélanine) des mycélia vient renforcer les données moléculaires obtenues. Une caractérisation plus approfondie de ces souches a alors été menée via un panel d'expériences.

Les champignons DSE colonisent les tissus végétaux et doivent avoir accès à des sources carbonées. Peu de données existent dans la littérature concernant la nutrition carbonée des genres fongiques cités ci-dessus. Un large panel de sources carbonées a alors été testé au niveau de la croissance des différentes souches.
L'interaction des champignons avec les plantes nécessite un panel d'enzymes extracellulaires permettant de dégrader les composants cellulaires complexes tels que la cellulose, la lignine, l'amidon et le xylane

(Caldwell *et al.*, 2000). L'ensemble des souches sont capables de se développer partiellement en présence d'amidon. Ce résultat suggère qu'elles possèdent des amylases leur permettant de dégrader l'amidon en sucres simples. De même toutes les souches, à l'exception de M02, possèderaient des activités 1-4 β xylanases et des β-D-xylosidases leur permettant de dégrader les xylanes en xylose puis en glucose. Cependant,cette dernière étape semble pouvoir être réalisée de manière plus efficace par les souches 2.2, 2.7, 2.8, 2.10, Eu1-11 et Pi6 qui se développent très rapidement en présence de xylose comme seule source carbonée.

L'hydrolyse complète de la cellulose par les champignons nécessite l'action synergique des enzymes β-1.4 glucanohydrolase, cellobiohydrolase et β-glucosidase afin de transformer la cellulose en cellobiose, puis la cellobiose en glucose (Midgley *et al.*, 2004). L'ensemble des souches étudiées semblent posséder ces trois enzymes puisque toutes sont capables de dégrader ces trois substrats. Cependant, de grandes différences d'activités sont à noter entre les différentes souches.

L'hydrolyse de l'ensemble de ces polymères par les souches fongiques laisse supposer que toutes ces souches pourraient dégrader les parois des cellules végétales et ainsi pénétrer dans les cellules, étape primordiale dans l'instauration d'une symbiose. La dégradation du saccharose et de l'amidon, composé de réserve carbonée des plantes, peut également laisser supposer un dialogue entre la plante et le champignon (Caldwell *et al.*, 2000 ; Usuki et Narisawa, 2007). Les capacités de dégradation des sucres tels que le glucose, le fructose, le saccharose et le maltose permettraient à l'inverse la survie des souches lors des étapes de vie saprophytiques ou en l'absence de plante hôte (Midgley *et al.*, 2004).

Quoiqu'il en soit, toutes ces données seront à confirmer par la réalisation d'autres expériences portant notamment sur la mesure d'activités enzymatiques de dégradation de ces composés.

Afin de vérifier si les souches étudiées appartenaient réellement au groupe des DES, une observation microscopique des mycélia en culture pure, ainsi que de racines de raygrass inoculées avec les souches 2.1, 2.2, 2.7, 2.8, 2.9, 2.10, Pi6, Ce4, Eu11-11, CY1-2, et *Piriformospora* a été réalisée. A l'exception de 2.1 et P*iriformospora indica*, l'ensemble des souches citées ci-dessus présentent un mycelium marron-noir sur boites de Pétri, caractéristique d'un dépôt de mélanine dans la paroi des hyphes. Les souches 2.2, 2.7 pénètrent dans les cellules racinaires du ray-grass en formant des microsclérotes, structures typiques des DSE (Ban *et al.*, 2012) (illustrations données en Annexe 14 et 15). L'interaction entre *Piriformospora* et le ray-grass, amène à la mise en place de chlamydiospores à l'intérieur des cellules végétales. Dans le futur, l'utilisation des souches exprimant la GFP laisse espérer une observation plus nette des structures d'échange et de pénétration, comme on peut l'observer dans la publication de Gorfer *et al.*, (2007). Les souches citées ci-dessus (à l'exception de 2.1) appartiendraient ainsi donc au groupe des DSE.

La phytoremédiation assistée requiert des souches fongiques qui apportent des bénéfices à la plante colonisée. La luzerne et le ray-grass ont été utilisés comme plantes modèles. Ces plantes ont été inoculées avec les souches 2.1, 2.2, 2.7, Eu1-11, CY1-2, Pi6 et *P indica*. La souche Eu1.11 s'est révélée très intéressante. Sa présence génère à la fois une augmentation de la biomasse aérienne, racinaire, stimule la synthèse de racines secondaires et l'élongation des racines principales, à la fois chez la luzerne et le ray-grass.

En conditions axéniques, les souches 2.2, 2.7, 2.10, CY1-2 et *P.indica* présentent également un effet positif sur la croissance du ray-grass. De tels résultats sont relatés dans la littérature, cependant à l'heure actuelle peu de connaissances existent sur les mécanismes responsables de cette stimulation.

Certaines recherches suggèrent que les champignons endophytes sécrètent des enzymes protéolytiques (Caldwell *et al.*, 2000) dégradant l'azote organique du sol. Cette transformation rend ce dernier accessible aux plantes (Newsham, 2011 ; Mandyam et Jumpponen, 2005). En plus de faciliter l'accès aux ressources azotées et phosphatées, l'inoculation peut stimuler la translocation de ces éléments dans la plante (Upson *et al.*, 2009 ; Addy *et al.*, 2005). Jumpponen *et al.*, (1998) ont démontré que la colonisation de *Pinus contorta* par *Phialocephala fortinii* entraine une augmentation de la biomasse totale et une stimulation de l'import en phosphore et en azote dans les parties aériennes. De même, Wu et Guo (2008) ont observés des effets semblables avec l'inoculation de *Leptodontidium orchicolada* sur S*aussurea involucrate*. Afin de tester si les souches étudiées lors de ce stage sont capables d'utiliser les formes azotées du sol, un test comparable à celui réalisé dans le paragraphe 2.4, avec différentes sources d'azote serait nécessaire.

La sécrétion de sidérophores par certains DSE permet une meilleure acquisition de certains métaux essentiels par les plantes. Ce phénomène est appliqué par *P. fortini* qui sécrète de l'hydroxamate pour

acquérir le fer (Bartholdy *et al.*, 2001). Une mesure ICP-AES des éléments fer, zinc, magnésium dans les parties aériennes et racinaires du ray-grass et de la luzerne permettrait de vérifier si les souches étudiées sont capables d'agir de la sorte.
La sécrétion d'hormones telles que la gibbérelline ou l'auxine (AIA) par les champignons endophytes génère également des effets positifs au niveau de la croissance des plantes (Addy et *al.*, 2005 ; Mandyam et Jumpponen, 2005). Sirrenberg *et al.* (2007) suggèrent que l'effet positif de *P. indica* sur la croissance du maïs et du tabac est du à une sécrétion d'AIA. Cette dernière permet la stimulation de la ramification et de l'élongation racinaire. Khan *et al.* (2012) ont mis en évidence que le champignon DSE *Chaetomium globosum* induit une augmentation significative de la biomasse, de la teneur en caroténoïdes et en chlorophylles chez *Caspicum annum g*râce à une sécrétion de gibbérelline. Des métabolites fongiques comme le chitosane présentent des avantages semblables (Khin *et al.*, 2006.) L'inoculation pourrait aussi stimuler la croissance en favorisant l'absorption de l'eau et la résistance à la sécheresse (Auge, 2001).
Cependant, il est nécessaire de préciser que dans ce stage les expériences ont été mises en place sur deux plantes d'intérêt agronomique : la luzerne et le ray-grass. Ces plantes, bien que souvent non privilégiées dans des programmes de phytoremédition, ont été choisies comme plantes modèles dans le cadre du stage dû à leur croissance rapide. Avant toute conclusion définitive, il serait nécessaire de refaire ces tests sur des hôtes tels que le bouleau ou le peuplier, à partir desquels les souches ont été isolées. Quoiqu'il en soit, ces nouvelles expériences seraient primordiales car une importante spécificité d'hôte règnerait au sein des DSE. Certains de ces champignons peuvent en effet s'associer aussi bien avec des herbacées ou des ligneux. De plus, des effets positifs sur certaines plantes mais des effets neutres ou pathogènes sur d'autres peuvent être notés (Jumponnen, 2005).

L'inoculation de plantes, dans des sites contaminés, avec des symbiotes tolérants aux métaux lourds augmente leur survie et leur longévité (Cairney et Meharg 2003). Dans une optique d'utiliser certaines souches dans des programmes de phytoremédiation assistée, les capacités de tolérance à certains ETM ont ainsi été mesurées pour l'ensemble des 17 souches.
D'après les résultats obtenus, on peut conclure que les doses élevées en métaux lourds affectent la croissance des champignons et diminue la biomasse de la plante hôte, résultats similaires à de précédentes études avec d'autres champignons (Ban *et al.*, 2012 ; Zhang *et al.*, 2008). Dans ces études, une diminution de la colonisation fongique des racines a été mise en évidence. En plus de diminuer la surface de mycélium dans le sol, les éléments traces métalliques diminuent le taux d'arbuscules lors de la mycorhization ainsi que le nombre de points d'entrée dans la racine. Chez les DSE, l'augmentation de polluants métalliques entraine une augmentation de la pigmentation et du taux de mélanine (Ban *et al.*, 2012).
De plus, Likar *et al*, (2009) ont pu observer que sur des sols contaminés les souches DSE présentent de plus fortes résistances métalliques que les souches mycorhiziennes. Dans le cas de notre étude, de telles différences n'ont pas été observées au niveau des tests de tolérance métallique en culture pure. Cependant, du fait que le développement des souches nécessite un certain laps de temps, l'expérience de mycorhization en présence de métaux comme réalisée dans la publication de Shahabivand *et al.*, (2012) n'a pas été effectuée, mais serait nécessaire afin de compléter la présente étude.
On peut ajouter également que la sensibilité des souches aux excès des métaux dépend de la nature de l'élément et de la population fongique (Leyval *et al.*, 1997). Enfin, dans un but de phytoremédiation, la solution optimale semble être l'élaboration d'un inoculum fait à partir d'un consortium de souches présentant des résistances pour des métaux différents afin de pouvoir répondre à un maximum de stress possibles. Cependant, il ne faut pas négliger le fait que l'utilisation de plusieurs souches amène un risque potentiel de compétition entre elles, cet élément est donc à tester avant tout essai *in situ*. Néanmoins, la microflore indigène étant déjà présente sur site, une inoculation avec des souches résistantes demeure la meilleure stratégie.

Afin de simuler quels effets auraient les souches étudiées, et plus particulièrement l'effet de leurs exsudats, sur la mobilité des ETM du sol, une modélisation a été réalisée en mélangeant un extrait de sol pollué à un milieu de culture fongique (voir paragraphe 2.9.2.). Les souches P06, M03, Eu1.11, 2.7, Pi6, CY1-2 et 2.8 sont capables de mobiliser les ETM du sol : cuivre et/ou arsenic et/ou cadmium et/ou zinc et/ou manganèse et/ou plomb. A l'inverse les exsudats des souches P02, P04, M01, M02, V16, 2.1, 2.2, 2.9, 2.10 et Ce4, ne sont pas capables de mobiliser ces ETM. Aucune souche n'a présenté d'exsudats avec des propriétés d'immobilisation.

Gadd (2007) explique que les exsudats responsables de l'activité de mobilisation des ETM peuvent être des sidérophores (hydroxamate, catecholates ou carboxylates par exemple), des acides organiques (oxalate, citrate) ou d'autres métabolites. A l'inverse, l'immobilisation est permise par des molécules possédant de nombreux groupements thiols, carboxyl ou encore méthoxyl (Gadd, 2007). Afin d'identifier la nature des exsudats secrétés, une mesure par HPLC ou un test au chrome azurol comme présenté dans la publication de Milagres et *al.* (1999) seraient nécessaires.
Tant la mobilisation de métaux que l'immobilisation peuvent apporter à la fois des avantages et des inconvénients à la phytoremédiation.
La mobilisation va permettre à partir de complexes tel que les complexes argilo-humiques de libérer des métaux sous la forme d'oxydes, phosphates ou sulfides. Ces formes vont alors pouvoir être assimilables par les plantes. Il y a dans ce premier cas une stimulation de la phytoextraction des ETM (Baum *et al.*, 2006). Cependant, la mobilisation peut également engendrer des formes qui vont provoquer une toxicité pour la plante et/ou qui vont être plus facilement lessivables (Bespalova *et al.*, 2006). Ce deuxième aspect présente donc un fort désavantage en phytoremédiation. A l'inverse, une immobilisation des ETM peut permettre d'améliorer la phytostabilisation, quand par exemple le cadmium va être immobilisé dans le sol. A contrario, l'excès de l'immobilisation du fer peut générer des carences chez les végétaux (Gadd, 2007).
Certaines des souches étudiées permettant une augmentation de la mobilisation des métaux dans le sol, pourraient ainsi être de bonnes candidates en phytoextraction. Quoiqu'il en soit, avant toute conclusion définitive, il serait primordial de réaliser d'autres expériences faisant intervenir à la fois des plantes utilisées en phytoremédiation, l'inoculum fongique et le sol pollué.

5. Conclusions et perspectives

L'ensemble des travaux réalisés pendant ce stage s'inscrivaient dans le cadre du projet LORVER dont les principaux objectifs se résument à la revégétalisation de friches industrielles par des cultures de chanvre, de peuplier et d'ortie dont la biomasse est valorisable économiquement. Des pré-tests en laboratoire ont été menés afin d'évaluer la capacité des plantes à croitre sur un sol pollué. Un sol pollué aux métaux a été modélisé à partir de mélanges de sols issus du retraitement de différents matériaux : un substrat issu d'un traitement par biopile et des boues métalliques. Les résultats indiquent que les plantes peuvent se développer sur un substrat de biopile et dans une moindre mesure sur des sols pollués avec 5 % de boues. Les métaux sont stockés, en faible proportion, dans les tiges et les feuilles, ce qui pourrait poser un problème pour la commercialisation des sous produits.

L'étude de la colonisation fongique des racines a révélée la présence de mycorhizes à arbuscules, de champignons endophytes et de *dark septate endophytes*.
A partir de toutes ces données, quatre parcelles expérimentales à Jeandelaincourt (54) ont été mise en place, les sols retenus sont les sols de biopile enrichis ou non avec 5% de boues métalliques, inoculés ou non avec un inoculum commercial. La boue utilisée lors du test en laboratoire est très basique ce qui n'était pas propice au développement des plantes, pour pallier à ce désagrément, un mélange de boues, basique et acide, a été utilisé dans les parcelles.
Les perspectives pour les saisons à venir seront d'observer le développement des espèces et celui des symbiotes introduits et indigènes afin de vérifier l'éventuelle compétition entre l'inoculum indigène et l'inoculum introduit.

Une seconde partie du stage a été consacrée à la réalisation d'un « criblage » de caractérisation de différentes souches fongiques endophytes. L'objectif était de sélectionner des souches fongiques pouvant être utilisées en phytoremédiation assistée. Les critères observés ont été : la taxonomie des souches, leur mode de vie, l'effet sur la croissance des plantes et leur capacité de résistance aux métaux lourds. Un intérêt particulier à été porté sur les champignons de type *dark septate endophyte*. Cinq souches ont présenté des qualités pouvant être utiles en phytoremédiation. Les souches *Piriformospora indica*, Eu1-11, CY1-2 et 2.7 seraient de bons candidats pour une utilisation en phytoextraction et 2.2 et Ce4 pourraient être utilisés en phytostabilisation. Ces premiers résultats seront à confirmer. Les perspectives futures seront par exemple d'étudier les capacités réelles de dépollution en réalisant un nouveau test de co-culture *in vitro* faisant intervenir à la fois des hôtes utilisés en phytoremédiation, l'inoculum et le critère à observer (souche pathogène, sols pollués, …). Enfin, à plus long terme, des essais d'introduction de ces souches sur des sites pollués seront à mettre en place, et un suivi régulier dans le temps des parcelles inoculées sera à réaliser afin de s'assurer que l'inoculum persiste au cours du temps.

6. Références bibliographiques

- Addy, H. D., M. M. Piercey, et R. S. Currah. **2005**. « Microfungal endophytes in roots ». *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique,* vol. 83, p. 1‑13.
- Adriano, D.C., W Wenzel, J Vangronsveld, *et al.*, **2004**. « Role of assisted natural remediation in environmental cleanup ». *Geoderma,* vol. 122, p. 121–142.
- Alberton, O, T W. Kuyper, et R C. Summerbell. **2010**. « Dark septate root endophytic fungi increase growth of scots pine seedlings under elevated CO2 through enhanced nitrogen use efficiency ». *Plant and Soil*, vol. 328, p. 459‑470.
- Auge, R. M. **2001**. « Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis ». *Mycorrhiza*, vol. 11, p. 3‑42.
- Ban, Y, M Tang, H Chen *et al.*, **2012**. « The response of dark septate endophytes (DSE) to heavy metals in pure culture ». *Plos One*, vol.7, .p. 1-11.
- Bartholdy, B. A., M. Berreck, et K. Haselwandter. **2001**. « Hydroxamate siderophore synthesis by *Phialocephala Fortinii*, a typical dark septate fungal root endophyte ». *Biometals*, vol. 14, p. 33‑42.
- Baum, C, K Hrynkiewicz, P Leinweber, *et al.*, **2006**. « Heavy-metal mobilization and uptake by mycorrhizal and nonmycorrhizal willows (*Salix x Dasyclados*) ». *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, vol. 169, p. 516‑522.
- Bellion, M, M Courbot, C Jacob *et al.*, **2006**. « Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi ». *FEMS Microbiol Lett*, vol. 254, p. 173‑181.
- Bert, V, C Lors, J-F Ponge *et al.*, **2012**. « Metal immobilization and soil amendment efficiency at a contaminated sediment landfill site: A field study focusing on plants, springtails, and bacteria ». *Environmental Pollution*, vol. 169, p. 1‑11.
- Bespalova, A. Yu., O. E. Marfenina *et al.*, **2006**. « Communities of microscopic fungi in contaminated and reference Al–Fe-humus podzols and their influence on copper mobility ». *Eurasian Soil Science*, vol. 39, p. 203–210.
- Bolan, N, D.C. Adriano, P Duraisamy *et al.*, **2003**. « Immobilization and phytoavailability of cadmium in variable charge soil. Effect of phosphate addition ». *Plant Soil*, vol. 250, p. 83–94.
- Caldwell, B. A., A. dmpponen, et J. M. Trappe. **2000**. « Utilization of major detrital substrates by dark-septate, root endophytes ». *Mycologia*, vol. 92, p. 230‑232.
- Carroll, G.C.. **1986** « The biology of endophytism in plant with particular reference to woody perennial ». In *Microbiology of phyllosphere*, Cambridge university press, p. 205‑222. Cambridge: N.J Fokkema.
- Cairney, J. W. G., et A. A. Meharg. **2003**. « Ericoid mycorrhiza: a partnership that exploits harsh edaphic conditions ». *European Journal of Soil Science*, vol. 54, p. 735740.
- Cevnik, M, M Jurc, et D. Vodnik. **2000**. « Filamentous fungi associated with the fine roots of *Erica herbacea.L* from the area influenced by the Zerjav lead smelter ». *Phyton-annales rei botanicae*., vol. 40 p. 61‑64
- Chalot, M, D Blaudez, Y Rogaume *et al.*, **2012**.« Fate of trace elements during the combustion of phytoremediation wood ». *Environmental Science & Technology*,vol. 46, p. 13361−13369.
- Christie, P., X. L. Li, et B. D. Chen. **2004**. « Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc ». *Plant and Soil*, vol. 261, p. 209‑217.
- Citterio, S, N Prato, P Fumagalli *et al.*, **2005**. « The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* induces growth and metal accumulation changes in *Cannabis sativa L.* » *Chemosphere*, vol. 59, p. 21–29.
- Citterio, S, A Santagostino, P Fumagalli *et al.*, **2003**. « Heavy metal tolerance and accumulation of Cd, Cr and Ni by *Cannabis sativa L.* » *Plant and Soil*, vol. 256, p. 243–252.
- Díaz, G., A. I. Córcoles, A. D. Asencio *et al.*, **2013**. « In vitro antagonism of *Trichoderma* and naturally occurring fungi from elms against *Ophiostoma novo-ulmi* ». *Forest. Pathology*, vol. 43, p. 51‑58.
- Dufresne, C, et C Ouellet. **2009**. « Guide de l'ortie , guide de production sous régie biologique ».
- Gadd, G. **2007**. « Geomycology: Biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation ». *Mycological Research*, vol. 111, p. 3‑49.
- Gjorgieva, D, T Kadifkova-Panovska, K Baceva, *et al.*, **2011**. « Assessment of heavy metal pollution in Republic of Macedonia using a plant assay ». *Arch Environ Contam Toxicol*, vol. 60, p. 233–240.
- Gohre, V, et U Paszkowski. **2006**. « Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation ». *Planta*, vol. 223, p. 1115–1122.
- Gorfer, M, S Klaubauf, D Bandian *et al.*, **2007**. « *Cadophora finlandia* and *Phialocephala fortinii*: *Agrobacterium*-mediated transformation and functional GFP expression ». *Mycological Research*, vol.111, p.850‑855.
- Grubor, M. **2008**. « Lead uptake, tolerance, and accumulation exhibited by the Plants *Urtica dioica* and *Sedum spectabile* in contaminated soil without additives ». *Archives of Biological Sciences*, vol. 60, p. 239‑244.
- Jourand, P, M Ducousso, R Reid *et al.*, **2010**. « Nickel-tolerant ectomycorrhizal *Pisolithus albus* ultramafic ecotype isolated from nickel mines in New Caledonia strongly enhance growth of the host plant *Eucalyptus globulus* at toxic nickel concentrations ». *Tree Physiology*, vol. 30, p. 1311–1319.
- Jumpponen, A. **2001**. « Dark Septate Endophytes - Are They Mycorrhizal? » *Mycorrhiza*, vol. 11, p. 207‑211.
- Jumpponen, A, et J M. Trappe. **1998**. « Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi ». *New Phytologist*, vol. 140, p. 295‑310.
- Khan, A L, Z K Shinwari, Y-H Kim *et al.*, **2012**. « Role of endophyte *Chaetomium globosum* Lk4 in growth of *Capsicum annuum* ». *Pakistan Journal of Botany*, vol.44, p. 1601‑1607.
- Kos, B, H Grčman, et D Leštan. **2003**. « Phytoextraction of lead, zinc and cadmium from soil by selected plants ». *Plant soil environment*, vol.49, p. 548‑553.
- Kytoviita, M. M., et AA Ruotsalainen. **2007**. « Mycorrhizal benefit in two low artic herbs increase with increasing temperature ». *American Journal of Botany*, vol.94, p.1309‑1315.

- Lacercat-Didier, L. **2013**. « Filtration biologique pour la réduction des éléments traces métalliques dans la biomasse du peuplier ». Thèse. Université de Lorraine, p. 81-82
- Leyval, C., K. Turnau, et K. Haselwandter. **1997**. « Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects ». *Mycorrhiza*, vol.7, p. 139‑153.
- Likar, M., et M. Regvar. **2009**. « Application of temporal temperature gradient gel electrophoresis for characterisation of fungal endophyte communities of *Salix Caprea L.* in a heavy metal polluted soil ». *Science of the Total Environment*, vol. 407, p. 6179‑6187.
- Linger, P, J Mussig, H Fischer *et al.*, **2002**. « Industrial hemp (*Cannabis sativa L.*) growing on heavy metal contaminated soil: fibre quality and phytoremediation potential ». *Industrial Crops and Products*, vol. 16, p. 33–42.
- Ma, Y, M.N.V. Prasad, M. Rajkumar *et al.*, **2011**. « Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils ». *Biotechnology Advances*, vol. 29, p. 248‑258.
- Malizia, D, AGiuliano, G Ortaggi *et al.*, **2012**. « Common plants as alternative analytical tools to monitor heavy metals in soil ». *Chemistry Central Journal*, vol. 6, p. 2‑10.
- Mandyam, K., et A. Jumpponen. **2005**. « Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi ». *Studies in Mycology*, vol 53, p.173‑189.
- Meier, S, F Borie, N Bolan *et al.*, **2012**. « Phytoremediation of metal-polluted soils by arbuscular mycorrhizal fungi ». *Environmental Science and Technology*, vol. 42, p. 741‑775.
- Midgley, D. J., S. M. Chambers, et J. W. G. Cairney. **2004**. « Utilisation of carbon substrates by multiple genotypes of ericoid mycorrhizal fungal endophytes from eastern Australian ericaceae ». *Mycorrhiza*, vol. 14, p. 245‑251.
- Migeon, A, P.Richaud, F Guinet *et al.*, **2009**. « Metal accumulation by woody species on contaminated Sites in the North of France ». *Water Air Soil Pollution*, vol. 204, p. 89–101.
- Milagres, A, A Machuca, et D Napoleao. **1999**. « Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay ». *Journal of Microbiological Methods*, vol. 37, p. 1–6.
- Newsham, K. K. **2011**. « A Meta-analysis of Plant Responses to Dark Septate Root Endophytes ». *New Phytologist*, vol. 190, p. 783‑793.
- Petrini, O. **1981**. « Fungal endophyte in tree leaves ». In *Microbial ecology of leaves*, Springer, p. 179‑197. New York: J.H Andrews & S.S Hirano.
- Regvar, M, M Likar, A Piltaver *et al.*, **2010**. « Fungal community structure under goat willows (*Salix caprea L.*) growing at metal polluted site: the potential of screening in a model phytostabilisation study ». *Plant Soil*, vol.330, p.345–356.
- Ruttens, A, J Boulet, N Weyens *et al.*, **2011**. « Short rotation coppice culture of willows and poplars as energy crops on metal contaminated agricultural soils ». *International Journal of Phytoremediation*, vol. 13, p. 194‑207.
- Shahabivand, S, H Z Maivan, E M Goltapeh *et al.*, **2012**. « The effects of root endophyte and arbuscular mycorrhizal fungi on growth and cadmium accumulation in wheat under cadmium toxicity ». *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 60 p. 53-58.
- Singh, OV, S Labana, G Pandey *et al.*, **2003**. « Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil ». *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 61, p. 405‑412.
- Sirrenberg, A, C Göbel, S Grond *et al.*, **2007**. « *Piriformospora Indica* affects plant growth by auxin production ». *Physiologia Plantarum*, vol. 131, p.581–589.
- Tellenbach, C, MW. Sumarah, C. R. Grunig *et al.*, **2013**. « Inhibition of Phytophthora species by secondary metabolites produced by the dark septate endophyte *Phialocephala europaea* ». *Fungal ecology*, vol. 6, p.12‑18.
- Trouvelot, A, J.L Kough, et V Gianinazzi-Pearson. **1985**. « Mesure du taux de mycorhization VA d'un système radiculaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle ». In *Les mycorhizes*. Dijon: INRA.
- Upson, R, D J. Read, et K K. Newsham. **2009**. « Nitrogen form influences the response of *Deschampsia Antarctica* to dark septate root endophytes ». *Mycorrhiza*, vol. 20, p. 1‑11.
- Usuki, F, et H Narisawa. **2007**. « A mutualistic symbiosis between a dark septate endophytic fungus, *Heteroconium Chaetospira*, and a nonmycorrhizal plant, chinese cabbage ». *Mycologia*, vol.99, p.175‑184..
- Vierheilig, H., B. Iseli, M. Alt *et al.*, **1996**. « Resistance of *Urtica dioica* to mycorrhizal colonization: A possible involvement of *Urtica dioica* agglutinin ». *Plant and Soil*, vol. 183, p. 131‑136.
- Violante, A, V Cozzolino, L Perelomov *et al.*, **2010**. « Mobility and bioavailability of the heavy metals and metalloids in soil environments ». *J. Soil. Sciences. Plant Nutrition*, vol. 10, p. 268‑292.
- Vralstad, T., E. Myhre, et T. Schumacher. **2002**. « Molecular diversity and phylogenetic affinities of symbiotic root-associated ascomycetes of the helotiales in burnt and metal polluted habitats ». *New Phytologist*, vol. 155, p. 131‑148.
- Wang, X, et Y Jia. **2010**. « Study on adsorption and remediation of heavy metals by poplar and larch in contaminated soil ». *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 171, p. 1331‑1338.
- Wu, L, et S Guo. **2008**. « Interaction between an isolate of dark-septate fungi and its host plant *Saussurea involucrata* ». *Mycorrhiza* 18 (2): 79‑85.
- Yuan, Z, C-l Zhang, et F-C Lin. **2010**. « Role of diverse non-systemic fungal endophytes in plant performance and response to stress: progress and approaches ». *Journal of Plant Growth Regulation*, vol. 29, p. 116–126.
- Zhang, Y et M Liu. **2008**. « Dark septate endophyte (DSE) fungi isolated from metal polluted soils: Their taxonomic position, tolerance, and accumulation of heavy metals in vitro ». *Journal of Microbiology*, vol. 46, p. 624‑632.
- Zubek, S, et W Buchwald. **2012**. « Fungal root endophyte associations of medicinal plants ». *Nova Hedwigia*, vol. 94, p.525-540

7. Annexes

Annexe 1 : La préparation des substrats du projet LORVER au STEVAL

Etape 1 : Broyage des terres.

Etape 2 : Tamisage à 2 mm

Etape 3 : Mélange à la bétonière.

Annexe 2 : Composition de la boue utilisée dans le projet LORVER

	Concentration en fonction de la dilution (en mg/kg MS)	
Polluants	5%	10%
Antimoine	68	136
Arsenic	2	4
Baryum	41.5	83
Cadmium	27.5	55
Chrome	5.5	11
Cuivre	111	222
Mercure	8.5	17

	Concentration en fonction de la dilution (en mg/kg MS)	
Polluants	5%	10%
Nickel	2	4
Plomb	495	990
Sélénium	1.5	3
Vanadium	1	2
Zinc	1660	3320
Chlorures	1010	2020

Annexe 3 : Composition des milieux de culture

Milieux de culture pour les souches fongiques :

	Malt	MMN	N2P2	Pachlewski
Malt	12 g	X	X	X
Agar*	15 g	10 g	15 g	20 g
KH_2PO_4	X	10 ml	5 ml	0,5 g
$(NH_4)_2HPO_4$	X	10 ml	10 ml	X
$CaCl_2,2H_2O$	X	10 ml	10 ml	X
NaCl	X	10 ml	X	X
$MgSO_4,7H_2O$	X	10 ml	10 ml	1 g
Thiamine	X	100 µl	40 µl	10 µl
$FeCl_3,6H_2O$	X	100 µl	X	X
Glucose	X	10 g	2,5 g	20 g
Maltose	X	X	X	5 g
Kanieltra	X	X	100 µl	100 µl
$Na_2HPO_4,12H_2O$	X	X	10 ml	X
Citrate ferrique	X	X	1 ml	X
NaH_2PO_4	X	X	100 µl	X
MES (pH 5,7)	X	X	50 ml	X
Tartrate d'ammonium	X	X	X	2,3 g
Qsq eau stérile	1 litre	1 l	950 ml	1 litre

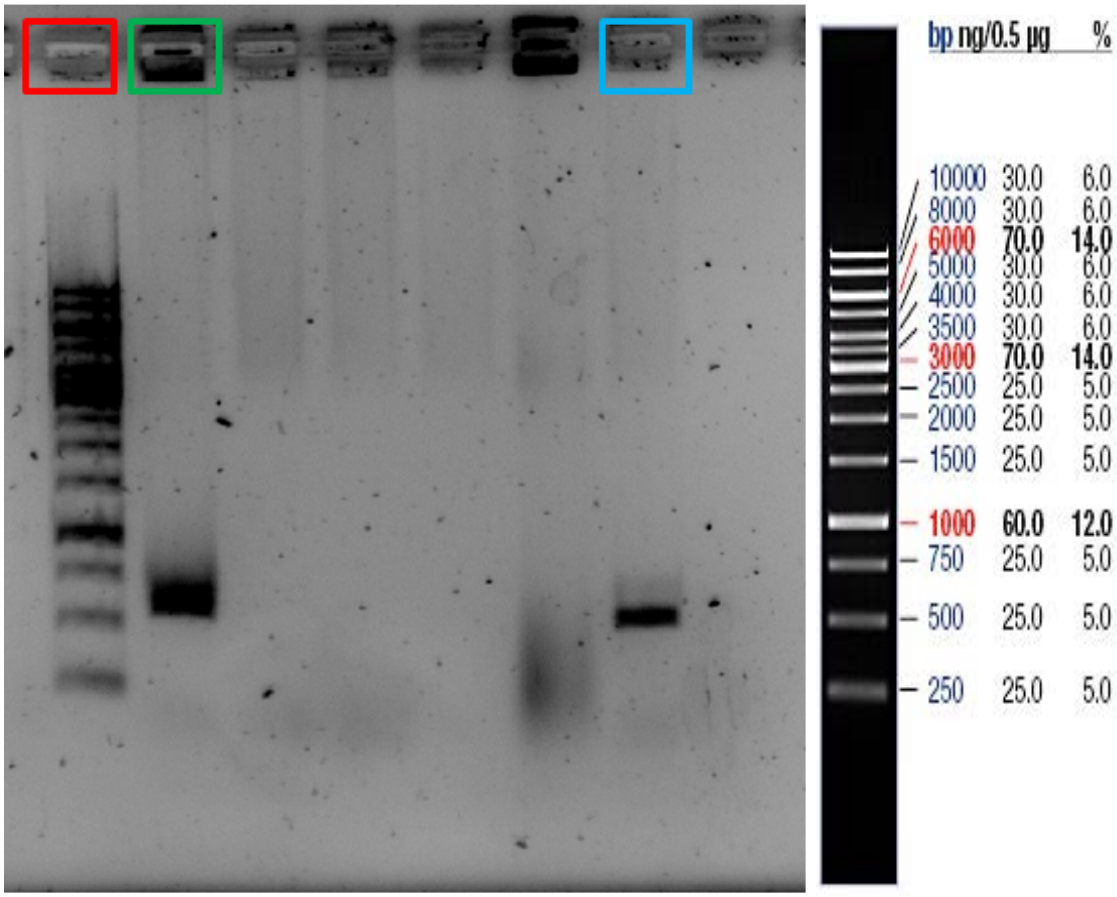
*L'agar est ajouté uniquement en cas de culture sur milieu solide gélosé.

Milieux de culture pour les souches bactériennes :
LB (1 litre) : 5 g d'extrait de levures, 5 g de NaCl, 10 g de peptone, 20 g d'agar*

Milieux de culture pour les plantes :
MS (1 litre) : 4,4 g de poudre de MS avec vitamines, 20 g de saccharose, 18 g d'agar

Annexe 4 : les différentes étapes de l'amplification d'ADN par PCR

Étape	Température (°C)	Durée (minute)	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	94	3	1
Dénaturation	94	1	55
Ligation	55	1	55
Extension	72	2	55
Extension terminale	72	10	1
Refroidissement	4		



Migration sur gel d'agarose à 1% des produits PCR

A gauche : gel d'électrophorèse (photographie obtenue via un appareil Geldoc et le logiciel Quantity one®). A droite : correspondances entre concentration d'ADN et bandes observées sur le gel (marqueur 1 kb).

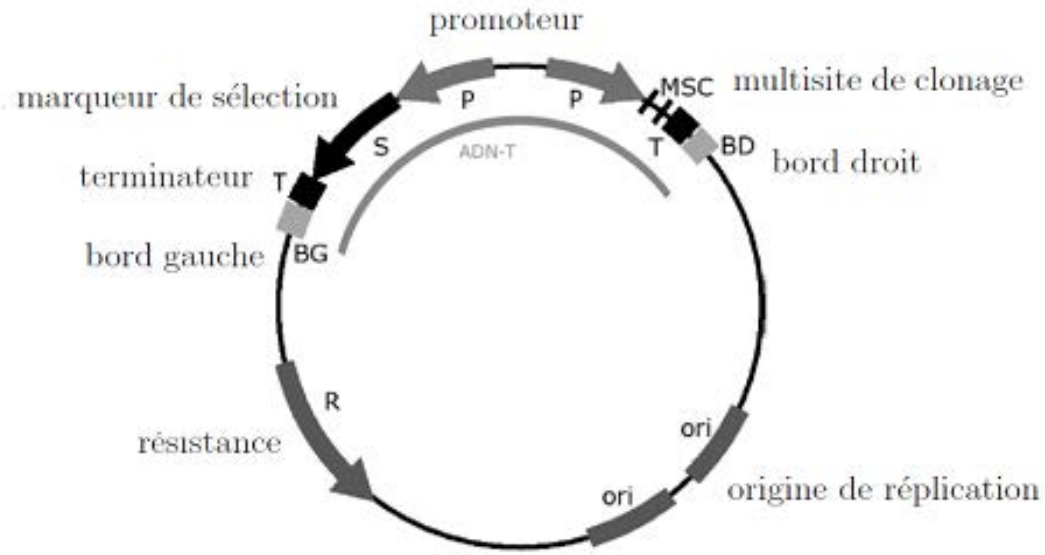
L'encadré rouge représente le puits dans lequel est déposé le marqueur de taille. Le vert celui dans lequel 4 microlitres du produit PCR de 2.7 est déposé, et en bleu celui de V16.

Annexe 5 : L'agrotransformation

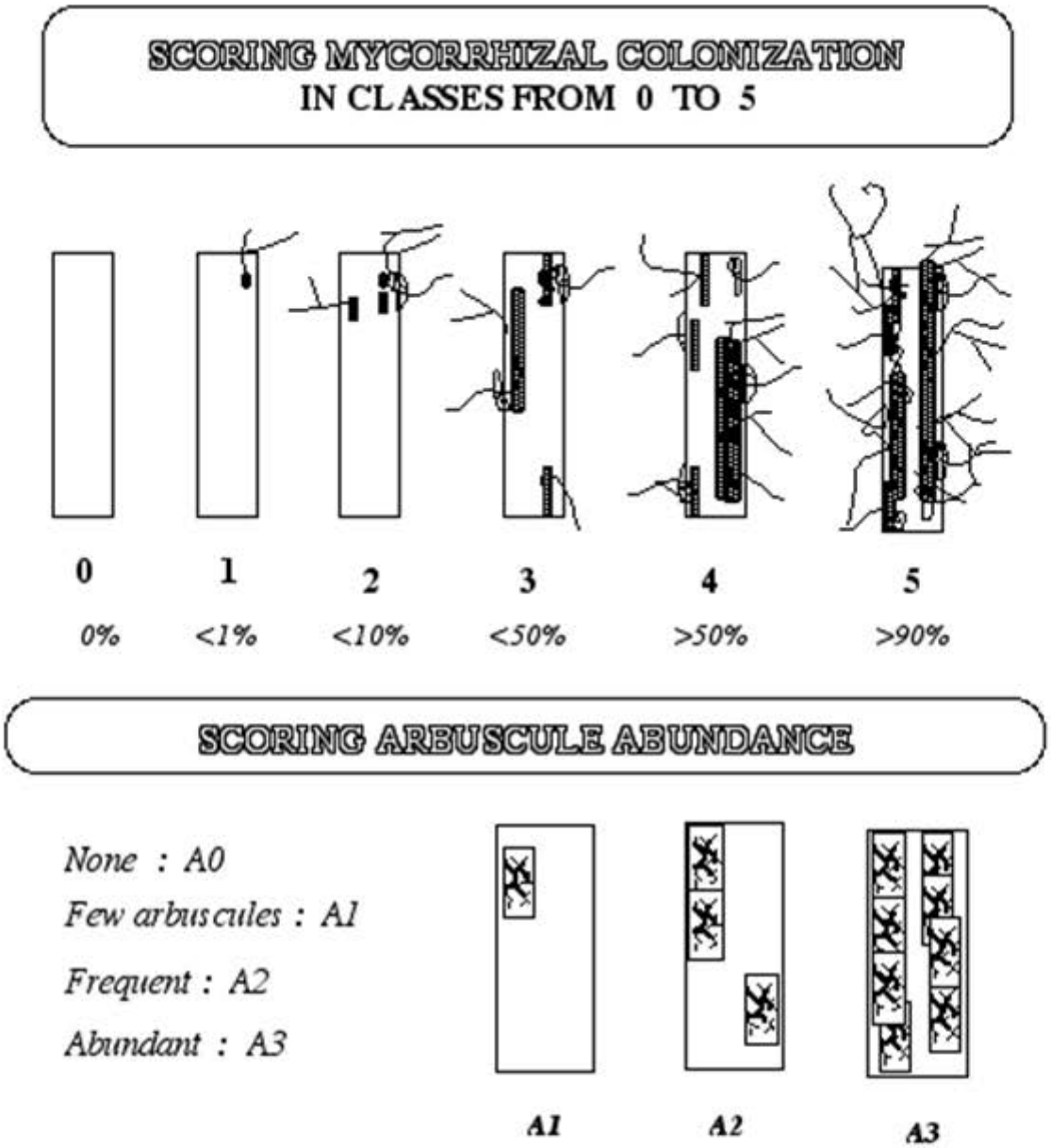
Les milieux utilisés pour l'agrotransformation :

LB induction : Même milieu LB que dans l'annexe 3 auquel 0,5 % (w/v) de glycérol et 200 µM d'acétosyringone sont ajoutés
N2P2 d'induction : Même milieu N2P2 que dans l'annexe 3 mais le glucose est remplacé par un mélange 0.2 % glucose et 0.5 % glycérol, 200 µm d'acétosyringone sont ajoutés.
N2P2 sélection : Même N2P2 (Annexe 3) auquel on ajoute après autoclave 100 µg/ml de kanamycine , 250 µg/ml d'hygromycine, 100 µg/ml d'ampiciline, 12,5 µg/ml de tétracycline et 50 µg/ml de gentamycine

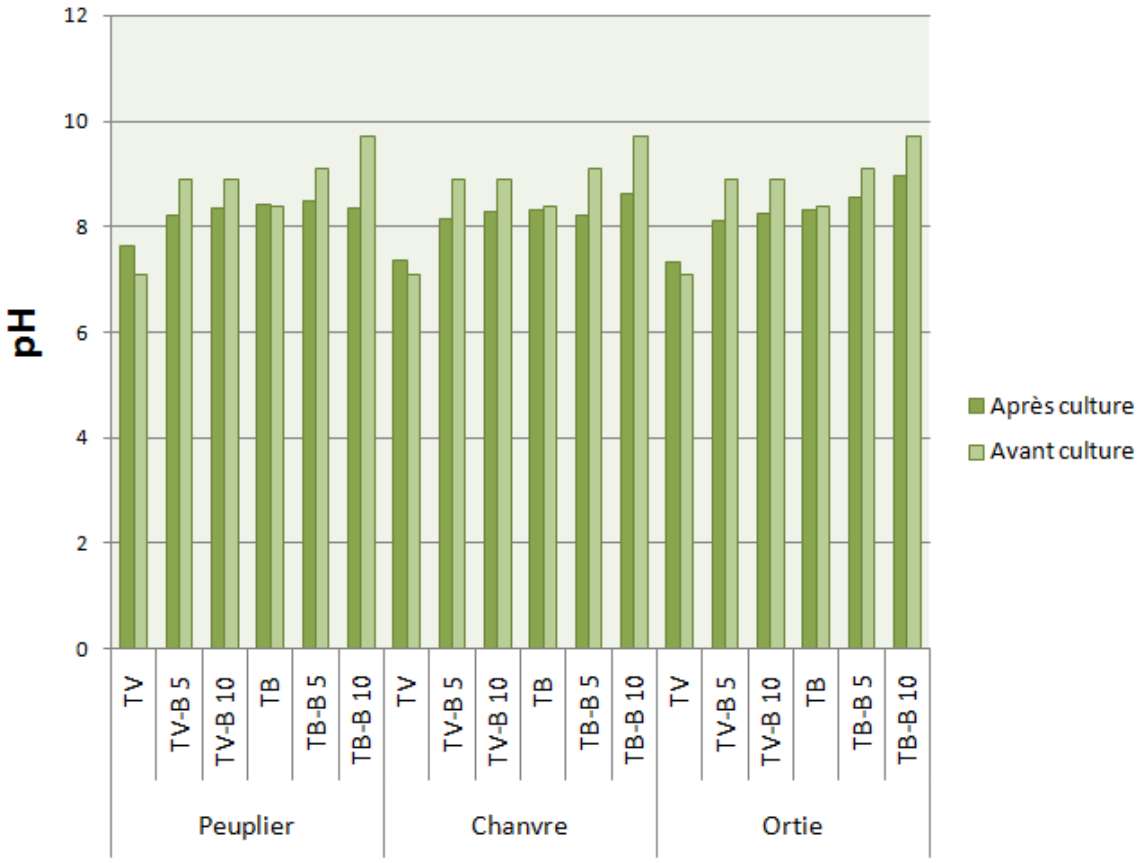
Le plasmide binaire et le T-DNA



Annexe 6 : évaluation du degré de colonisation fongique par la méthode de Trouvelot

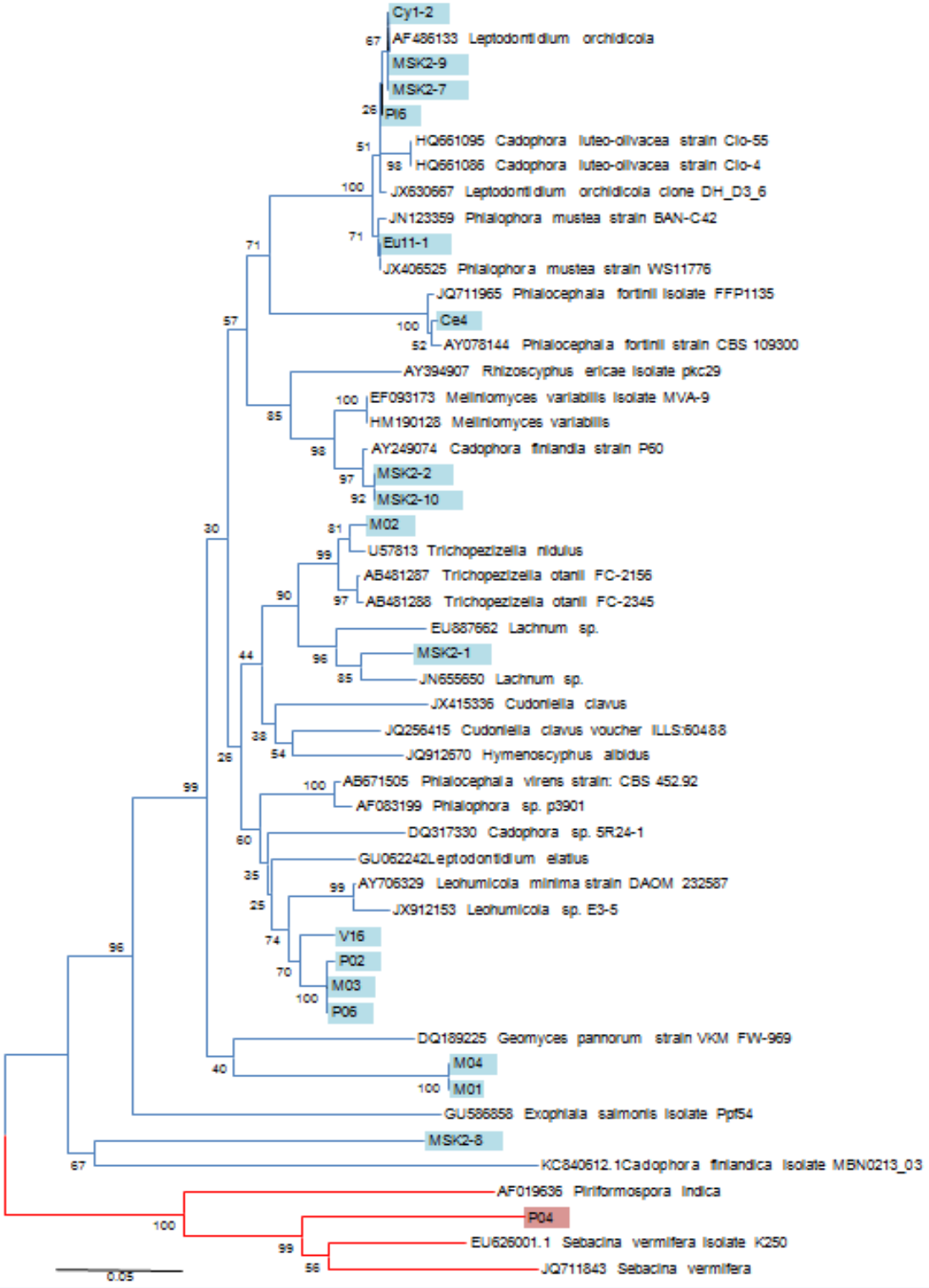


Annexe 7 : Evolution du pH des sols.



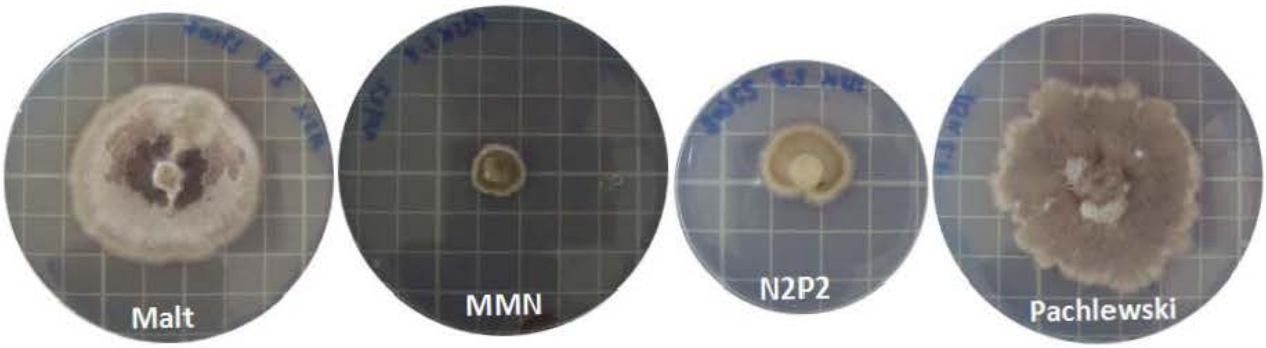
Mesures effectuées sur les différentes modalités du projet LORVER. Pour mesurer la valeur des pH, la norme NF ISO 10390 a été utilisée.

Annexe 8 : Arbre phylogénétique constitué à partir des séquences ITS des souches isolées sur les différents sites pollués.



L'arbre a été généré en utilisant le logiciel MEGA 5.0 après l'alignement des séquences d'après la méthode *Neighbor-Joining* à partir de 1000 réplicats et un modèle Kimura-2. Les nombres associés aux branches représentent les valeurs de *bootstrap* Les souches surlignées représentent les séquences isolées, alors que celles qui sont non surlignées dénotent les séquences d'espèces modèles obtenues grâce aux bases de données du NCBI. Les branches bleues dénotent une appartenance des souches aux Ascomycètes et celles en rouge aux Basidiomycètes.

Annexe 9: Effet du milieu de culture sur la croissance de la souche 2.8



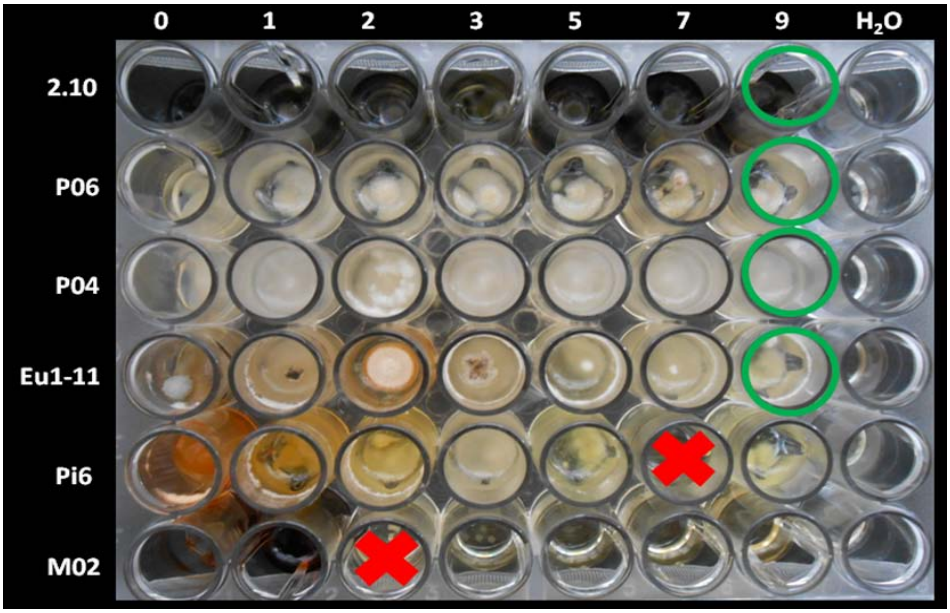
Annexe 10 : Masses sèches (mg) des colonies fongiques en fonction des différentes sources de carbone utilisées dans le milieu de culture.

Milieux	Souches								
	Ce4	**CY1-2**	**Eu11-1**	**Pi6**	**P.indica**	**2,2**	**2,7**	**2,8**	**2,1**
Sans sucre	4,5 e	3,7 c	5,6 e	3,6 c	7,4 b	10,1 e	4,1 d	8,4 f	9,5 d
Cellobiose	50,8 ± 2,4 cd	55,9 ± 6,9 ab	128,9 ± 6,9 ab	108,5 ± 22,9 a	57,3 ± 0,6 a	99,3 ± 4,6 b	94,5 ± 17,8 b	82,9 ± 1,3 cd	44,5 ±16,3 abc
CMC	51,5 ± 2,2 c	38,2 ± 2,1 b	55,0 ± 3,5 d	38,0 ± 36,9 bc	41,9 ± 3,0 b	34,7 ± 0,8 c	45,7 ± 3,4 cd	48,3 ± 5,1 e	119,2 ± 88,9 bcd
Fructose	60,3 ± 5,7 bc	63,7 ± 3,2 a	90,4 ± 13,6 bcd	52,1 ± 1,7 b	60,1 ± 2,6 ab	98,9 ± 3,4 b	96,8 ± 22,2 b	107,3 ± 2,4 b	146 ± 43,6 abcd
Glucose	86,9 ± 7,6 ab	67,1 ± 17,2 a	130,6 ± 27,6 ab	111,1 ± 12,6 a	71,5 ± 3,4 ab	79,3 ± 14,7 b	101,3 ± 15,4 b	95,3 ± 8,1 bc	72,4 ± 26,0 a
Maltose	62,8 ± 1,5 bc	75,1 ± 6,2 a	112,2 ± 2,4 abc	98,5 ± 19,7 a	64,8 ± 2,6 ab	86,5 ±7,3 b	168,3 ± 25,6 a	106,9 ± 6,9 b	91,0 ± 23,8 ab
Mannitol	33,6 ± 3,6 c	60,7 ± 5,8 a	83,8 ± 2,5 abc	60,6 ± 7,9 a	18,2 ± 1,3 b	71,8 ± 1,5 b	122,2 ± 1,3 bc	57,8 ± 4,2 d	40,1 ± 4,7 bcd
Saccharose	84,1 ± 5,4 a	75,4 ± 7,7 a	148,2 ± 19,2 a	111,2 ± 9,6 a	73,6 ± 3,6 ab	151,2 ±23,4 a	100,7 ± 14,9 b	138,5 ± 2,1 a	98 ± 10,7 abc
Xylose	54,1 ± 3,8 d	62,5 ± 3,1 ab	118,0 ± 14,2 cd	104,2 ± 6,9 b	46,4 ± 1,7 b	79,7 ± 7,4 b	81,7 ± 3,0 b	73,6 ± 1,8 cd	48,6 ±3,5 cd

Milieux	Souches							
	M03	**M01**	**P04**	**P01**	**P02**	**V16**	**2.10**	**M02**
Sans sucre	11,8 e	8,4 e	1,9 c	12,7 d	3,8 e	6,8 d	2,3 c	5,7 c
Cellobiose	75,0 ± 11,5 ab	63.6± 12.4 cd	40,6 ± 10,9 bc	100,2 ± 4,5 ab	73,3 ± 3,8 ab	78,0 ± 10,8 a	206,4 ± 40,4 a	114,5 ±77,6 a
CMC	82,8 ± 17,1 d	72,1 ± 13,3 d	81,2 ± 23,6 bc	89,6 ± 21,0 cd	90,3 ± 25,3 d	37 ± 6,4 c	80,6 ± 48,7 b	38,4 ± 12,3 b
Fructose	99,7 ± 12,5 bc	103,8 ± 15,0 bc	79,6 ± 19,2 a	35,6 ± 80,2 bc	106,5 ± 20,8 bcd	99,6 ± 2,0 a	173,9 ± 26,1 a	47,3 ± 4,7 b
Glucose	109,2 ±7,8 ab	122,6 ± 5,2 ab	77,6 ± 6,3 ab	98,2 ± 34,3 a	84 ± 1,3 a	78,5 ± 15,0 a	281,8 ± 22,4 a	65,7 ± 19,0 b
Maltose	83,2 ± 7,4 a	95,2 ± 14,6 cd	74,2 ± 6,8 a	95 ± 10,6 b	74,9 ± 1,8 bc	85,5 ± 6,3 ab	266,4 ± 8,5 a	43,4 ± 6,7 b
Mannitol	52,7 ± 9,9 d	84.6 ± 4.8cd	59,9 ± 30 bc	69,7 ± 10,4 bc	62,4 ± 3,9 cd	83,3 ± 11,2 b	169,7 a	130,5 ± 55,9 b
Saccharose	209,9 ± 82,9 a	35,3 ± 79,7 a	100,6 ±14,2 a	144 ± 32,8 ab	193,6 ± 61 a	67,5 ± 19,3 ab	102,2 ± 92,8 a	81,4 ± 23,4 b
Xylose	49,1 ± 2,1 cd	65,0 ± 7,0 c	38,6 ± 1,2 ab	55,6 8,8 bc	44,8 ± 2,2 cd	41,2 ± 11,7 ab	58,9 ± 37,0 ab	32,3 ± 11,6 b

Le tableau représente les moyennes (n=3) ± erreurs standards après 2 semaines de culture.
Des lettres différentes traduisent une différence significative de croissance entre les traitements ($P < 0,05$).

Annexe 11 : Effet des ETM sur la croissance des champignons. Exemple d'une microplaque « Arsenic »



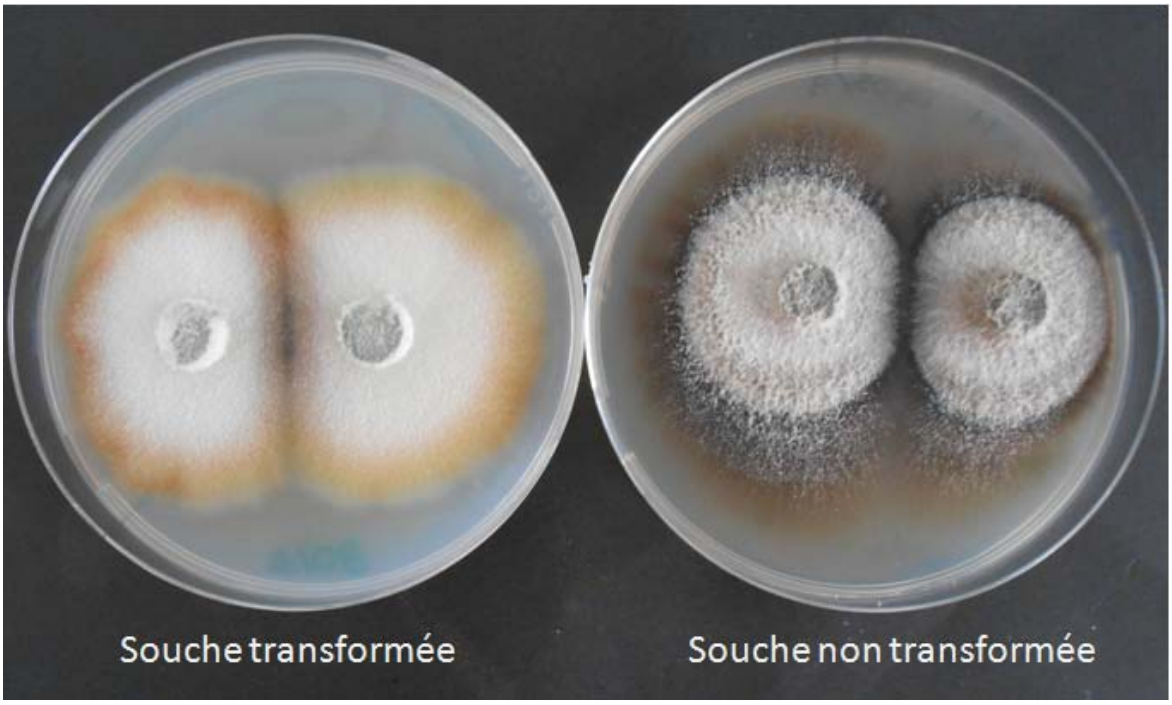
Cinq implants de 1mm de mycélium sont mis en culture avec un milieu malt contenant différentes concentrations (0 à 9 mM) d'arsenic. La croissance est évaluée après deux semaines d'agitation.

Annexe 12 : Effet de l'inoculation de souches fongiques sur la croissance du ray-grass en culture axénique.

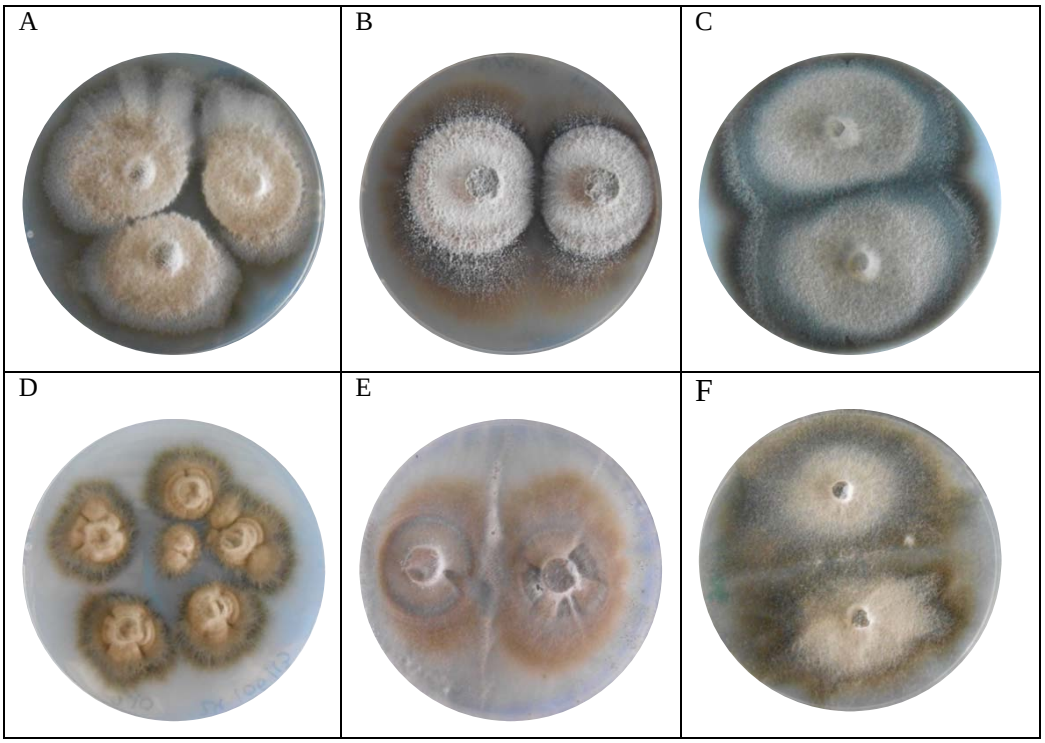
Dix graines de ray-grass préalablement désinfectées sont mises en présence de cinq implants de 4 mm de champignons. Après deux semaines de co-culture, les biomasses aérienne et racinaire, la longueur et le nombre de ramifications sont déterminés.

Annexe 13 : Phénotypes de la souche EU1-11.

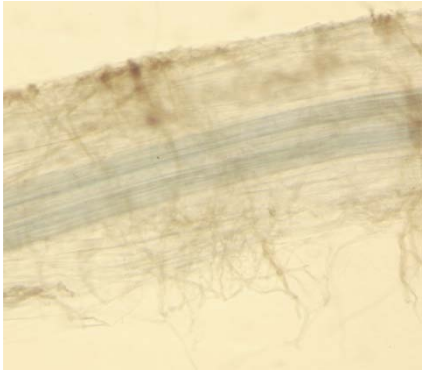
A gauche la souche Eu1-11 transformée par *Agrobacterium tumefaciens* et à droite la souche Eu1-11 non transformée.



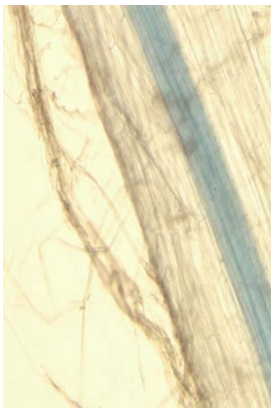
Annexe 14 : Aspect des souches fongique-Coloration noire du mycélium
(A) souche CY1-2, (B) souche EU1-11, (C) souche Ce4, (D) souche 2.10, (E) souche 2.8 et (F) souche 2.7
Les souches sont cultivées sur milieu malt.



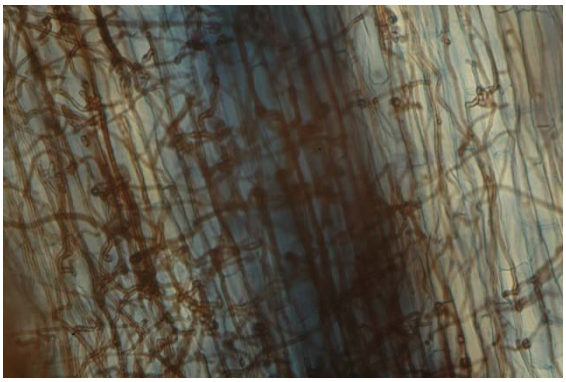
A



B



C



D

Annexe 15 : Souches DSE colonisant les racines de plantules de ray-grass

A – Souche EU1.11

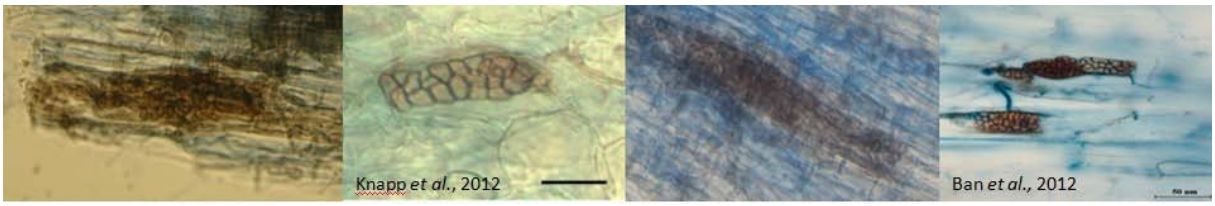
B - Souche 2.10

C et D- Souche Ce4

E – Souche 2.7 formant des microsclérotes semblables à ceux observés chez Knap *et al*. (2012) et Ban *et al.* (2012)

Les hyphes de ces souches présentent tous une coloration noire due à la présence de mélanine.

E



Résumé

LORVER est un projet de phytoremédiation visant à revaloriser des friches industrielles en utilisant le peuplier, le chanvre et l'ortie. La capacité des ces trois plantes à se développer sur sols pollués aux métaux lourds a été évaluée. Des analyses par ICP-AES ont mis en évidence une accumulation des métaux dans les tiges et les feuilles. Les communautés fongiques associées aux racines de ces trois espèces ont également été observées au microscope photonique. Des champignons mycorhiziens, et endophytes, ainsi que des champignons du groupe des *dark septate endophytes* (DSE) ont été identifiés.
Une inoculation fongique peut favoriser la croissance de plantes sur sols pollués : concept de phytoremédiation assistée. Dans cette optique, un criblage de souches fongiques a été réalisé afin de sélectionner des symbiotes fongiques performants. Après avoir réalisé une étude taxonomique des souches, leurs capacités de dégradations de certains sucres végétaux ont été mesurées. L'effet positif d'une inoculation par certaines souches DSE sur le développement des plantes a été testé par un test de coculture avec du ray-grass et de la luzerne. La tolérance métallique varie selon les souches considérées, ainsi que les possibilités de mobilisation des ETM par ces champignons. En conclusion, les souches Eu1-11, 2.2, CY1-2, 2.7 et Ce 4 appartenant aux genres *Cadophora, Leptodontidium* et *Phialocephala* pourraient être des candidats intéressants pour des projets de phytoremédiation assistée.

Mots clés : métaux lourds, phytoremédiation, champignons endophytes, *dark septate endophytes*

Abstract

The main aim of the LORVER phytoremediation project is to upgrade brownfields using poplar, hemp and nettle. The ability of these three plants to grow on metal-contaminated soils was evaluated and ICP-AES analyses revealed that heavy metals were localized in low amouts in the stems and the leaves. Fungal communities associated with the roots of the three species were observed by light microscopy. Arbuscular mycorrhizal fungi, but also fungal endophytes and dark septate endophytes (DSE) were identified.
Fungal endophytes can affect heavy metal uptake of their host plants and increase plant metal-tolerance. Therefore, in the present study, a wide-range screening of the fungal was performed to select efficient fungal symbionts. After studying the taxonomy of the isolated strains by molecular tools, their capacity to use diverse plant carbon compounds was evaluated. The positive effect of fungal inoculation on plant growth was revealed by a test with ryegrass and alfalfa. Finally, metal tolerance was variable between the studied strains, as well as their capacity to mobilize metals from the soil. In conclusion, Eu1-11, 2.2, CY1-2, 2.7 and Ce4, respectively belonging to the genera *Cadophora, Leptodontidium* and *Phialocephala* may be good candidates for future phytoremediation projects.

Keywords: heavy metals, phytoremediation, endophytic fungi, dark septate endophytes