



HAL
open science

Phytostabilisation de sols pollués par des métaux lourds assistée par des champignons mycorhiziens et le biochar

Arnaud Grignet

► **To cite this version:**

Arnaud Grignet. Phytostabilisation de sols pollués par des métaux lourds assistée par des champignons mycorhiziens et le biochar. Sciences de l'environnement. 2012. hal-01785006

HAL Id: hal-01785006

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01785006>

Submitted on 25 Nov 2020

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.



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>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE



MASTER FAGE

Biologie et Ecologie pour la Forêt,

L'Agronomie et l'Environnement

Spécialité

BIPE

UMR 1136 « Interactions Arbres/Micro-organismes »

Equipe Homéostasie métallique et bioremédiation

**Phytostabilisation de sols pollués par des
métaux lourds assistée par des champignons
mycorhiziens et le biochar.**

Arnaud Grignet

Mémoire de stage, soutenu à Nancy le 03/09/2012

Damien Blaudez, Maître de Conférences

Laurence Lacercat, Doctorante

2011-2012

Remerciements

Maintenant l'heure de la dure page de remerciements, par ces quelques lignes je tiens à remercier toutes les personnes ayant participé à ce stage.

Tout d'abord je tiens à remercier Damien Blaudez et Michel Chalot d'avoir accepté de me prendre en stage. Merci à Damien pour sa disponibilité, ses conseils et ses corrections tout au long de ces sept mois.

Un immense merci à Laurence, tu as été présente durant tous ce stage, pour m'avoir montré et aidé sur toutes les manips. Les précieux conseils sur le stage, la recherche de thèse et l'après.

Autour des autres stagiaires et collègues qui ont réussi à mettre une sacrée ambiance au labo : Julie (la petite vampire) qui m'a fait découvrir le métal et m'apprendre quelques mots d'allemand que j'ai vite oublié, Maxime grâce à qui la microbiologie n'est plus une science occulte et n'oublie pas de mettre ta blouse !, Aurélien le calme absolue et ta passion du foot reste toujours étrange pour moi, Louis mon premier stagiaire j'espère avoir été à la hauteur, Denis pour sa bonne humeur quotidienne (j'ai acheté des slips en solde) et enfin Charlotte ma compatriote de master FAGE et étrangère tout comme moi parmi tous ces Lorrains, tu as su m'épauler et m'écouter durant ton stage.

Un grand merci à Chantal, pour ta bonne humeur, tes coups de gueules qui font trembler le bureau, notre passion commune pour la musique sud-américaine et notamment Brésilienne.

Merci également à Pierre Richaud pour les analyses ICP, Frederic Rees et Cyril Germain pour m'avoir fourni le biochar.

Je tiens également à remercier tous mes camarades de promo et notamment Claire malgré les 6000 km qui nous ont séparés et Lucile pour votre soutien permanent durant ces longs mois.

Contenu

I. INTRODUCTION.....	1
1) Métaux lourds et éléments traces métalliques	1
2) Etat de la pollution	2
3) Comment remédier à la pollution?	3
4) Mécanismes de tolérance aux ETM chez les champignons	4
5) Les champignons mycorhiziens	5
6) Le biochar	6
7) Objectifs du stage	6
II. MATERIELS ET METHODES	7
1) Suivi de la parcelle expérimentale de Pierrelaye.....	7
2) Criblage des souches fongiques	10
3) Influence du biochar sur la croissance de champignons mycorhiziens	11
4) Analyses statistiques	12
III. RESULTATS.....	13
1) Suivi de l'inoculation des parcelles expérimentales.	13
a) Dénombrement des ecto- et endo-mycorhizes	13
b) Identification moléculaire des espèces fongiques présentes sur les racines de peuplier.....	14
2) Criblage des souches fongiques	15
a) Étude de la croissance des différentes souches en fonction du milieu de culture.	15
b) Étude de la tolérance des souches fongiques aux métaux lourds.....	15
3) Influence du biochar sur la croissance de champignons mycorhiziens	16
a) Test en culture liquide	16
b) Tests en milieux gélosés	17
c) Test de mycorhization en pots contenant du sol pollué de Pierrelaye.....	19
IV. DISCUSSION	22
1) Suivi des parcelles expérimentales	22

2) Criblage des souches fongiques	23
3) Influence du biochar sur la croissance de champignons mycorhiziens	23
V. CONCLUSION ET PERSPECTIVE	24
VI. BIBLIOGRAPHIE	25
VII. ANNEXES	30
Annexe 1 composition des milieux	30
Annexe 2 : Alignement de séquences obtenu à partir des séquences ITS de <i>Glomus</i> (logiciel utilisé : Multialin).	31

Abréviation :

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNg : ADN génomique

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

Cu : cuivre

Cd : cadmium

ETM : élément trace métallique

ICP-AES : Inductively-Coupled-Plasma/ Atomic-Emission-Spectrometry

Pb : plomb

PCR : Polymerase Chain Reaction

RFLP : restriction fragment length polymorphism

Zn : zinc

Présentation de l'organisme d'accueil

L'UMR 1136 "Interactions Arbres/Micro-Organismes" (IAM) est divisée en quatre équipes : deux sur le centre de l'INRA à Champenoux, Ecogénomique des interactions biotiques (responsable Francis Martin) et Ecologie des champignons pathogènes forestiers (responsable Benoît Marçais) et deux sur le campus de l'université Henri Poincaré (UHP) Vandoeuvre, Homéostasie métallique et bioremédiation (responsable Michel Chalot) et Réponses au stress et régulation Redox (responsable Jean-Pierre Jacquot).

J'ai effectué mon stage sur le site de l'université Henri Poincaré dans l'équipe Homéostasie métallique et bioremédiation.

I. Introduction

De nos jours l'augmentation de la concentration en métaux lourds ou élément traces métalliques (ETM) dans l'environnement est très préoccupante. La présence des ETM dans les sols et les environnements aquifères peut avoir des origines naturelle ou anthropogénique. En effet, les ETM peuvent y être présents principalement suite aux dépôts atmosphériques issus d'activités volcaniques ou comme conséquence de l'érosion de l'affleurement de la roche-mère ; mais dans ces deux cas, ils sont généralement présents en de faibles concentrations (Robert et Juste, 1998). Depuis l'ère industrielle, l'homme a créé des environnements riches en ETM. Ces environnements, alors qualifiés de pollués ou contaminés, résultent de facteurs liés à différentes activités humaines telles que l'application de boues d'épuration sur des terres, l'intensification de l'utilisation d'intrants en agriculture (pesticides, engrais phosphatés) ou plus directement d'activités industrielles (métallurgie) ou minières. D'après le Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable, du Transport et du Logement il y aurait en France environ 4465 sols et sites pollués. Depuis la loi du 30 juillet 2003 avec l'article L512-17 du code de l'environnement, les entreprises en cessation d'activité ont dans l'obligation de dépolluer les terrains. Depuis cette date les essais de phytoremédiation (technique plus écologique et moins coûteuse) se sont développés.

1) Métaux lourds et éléments traces métalliques

On définit le terme métal lourd comme tout élément métallique dont la masse volumique dépasse les 5 g/cm^3 (figure1) (Wang et Chen, 2006). Le terme d'élément trace métallique (ETM) est également souvent rencontré dans la littérature scientifique afin de regrouper à la fois les éléments métalliques ainsi que d'autres éléments toxiques qui font partie de la famille des métalloïdes (Arsenic, Sélénium) (Nioboer et Richardson, 1980). Les ETM sont qualifiés d'éléments traces car ils sont généralement présents dans les sols à une

faible concentration, de l'ordre du gramme de métal par kilo de sol sec.

1 H Hydrogène																	2 He Hélium
3 Li Lithium	4 Be Béryllium											5 B Bore	6 C Carbone	7 N Azote	8 O Oxygène	9 F Fluor	10 Ne Néon
11 Na Sodium	12 Mg Magnésium											13 Al Aluminium	14 Si Silicium	15 P Phosphore	16 S Soufre	17 Cl Chlore	18 Ar Argon
19 K Potassium	20 Ca Calcium	21 Sc Scandium	22 Ti Titane	23 V Vanadium	24 Cr Chrome	25 Mn Manganèse	26 Fe Fer	27 Co Cobalt	28 Ni Nickel	29 Cu Cuivre	30 Zn Zinc	31 Ga Gallium	32 Ge Germanium	33 As Arsenic	34 Se Sélénium	35 Br Brome	36 Kr Krypton
37 Rb Rubidium	38 Sr Strontium	39 Y Yttrium	40 Zr Zirconium	41 Nb Niobium	42 Mo Molybdène	43 Tc Technétium	44 Ru Ruthénium	45 Rh Rhodium	46 Pd Palladium	47 Ag Argent	48 Cd Cadmium	49 In Indium	50 Sn Étain	51 Sb Antimoine	52 Te Tellure	53 I Iode	54 Xe Xénon
55 Cs Césium	56 Ba Baryum	57-71 Lanthanoïdes	72 Hf Hafnium	73 Ta Tantale	74 W Tungstène	75 Re Rhénium	76 Os Osmium	77 Ir Iridium	78 Pt Platine	79 Au Or	80 Hg Mercure	81 Tl Thallium	82 Pb Plomb	83 Bi Bismuth	84 Po Polonium	85 At Astate	86 Rn Radon
87 Fr Francium	88 Ra Radium																

Figure 1 : Tableau périodique des éléments chimiques.

Les éléments métalliques sont encadrés en rouge, les principaux éléments traces métalliques pour lesquels des contaminations ont été observées sont surlignés en jaune. De même, les principaux métaux lourds contaminants de l'environnement sont encadrés en bleu.

Les ETM peuvent être classés en deux catégories:

- les éléments non essentiels aux organismes vivants, et sont ainsi toxiques dès les plus faibles concentrations (cadmium, mercure...)
- les oligo-éléments, essentiels aux cellules à de faibles concentrations (fer, manganèse, zinc...) et qui sont souvent utilisés comme cofacteur enzymatique (Waldron et al., 2009).

2) Etat de la pollution

Dans l'Union Européenne on dénombre environ 300 000 sites pollués (Agence Européenne pour l'Environnement), en France le nombre de sites pollués aux métaux lourds est estimé à 250 000, seuls 4396 sites sont inscrits au fichier BASOL regroupant les sites et sols pollués (ou potentiellement pollués) appelant une action des pouvoirs publics, à titre préventif ou curatif (figure 2).

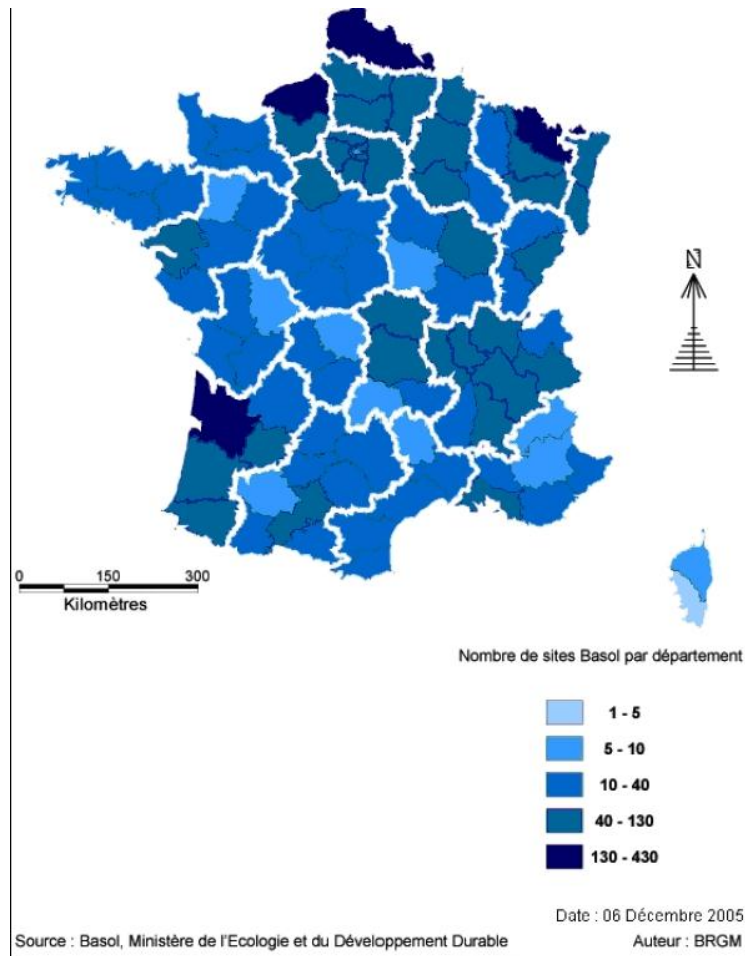


Figure 2 : Localisation et dénombrement des sites BASOL en France
http://www.uved.fr/fileadmin/user_upload/modules_introductifs/module3/risques/2.2.4/html/2.html

En France, les régions les plus contaminées sont le nord, le nord-est et la région Rhône-Alpes. De nombreux sites de ces régions sont fortement contaminés suite à un historique du siècle écoulé lié à leurs activités majeures : industries métallurgiques et pétrochimiques, activités minières. Les principaux métaux contaminants sont les éléments suivants : Cd, Zn, Pb, Cu. Ces éléments, qui ont été relargués abondamment dans l'environnement jouxtant ces activités industrielles et minières, ont tendance à s'accumuler dans les sols et menacent la qualité des eaux souterraines et le bon équilibre sanitaire (augmentation des ETM au sein de la chaîne alimentaire), en entraînant par leur excès des cancers et maladies tel que le saturnisme (Auburtin et Cabridenc, 1998). Le fonctionnement des écosystème est également perturbé, les métaux lourds modifie les communautés fongiques et bactériennes (Colpaert *et al.*, 2004 ; Giller *et al.*, 1998).

3) Comment remédier à la pollution?

Différentes techniques de remédiation des sols se sont mis en place, les techniques physico-chimiques comme l'encapsulation, la désorption thermique qui permettent de traiter de grandes quantités de terre mais qui sont très invasives et très coûteuses (Khan *et al.*, 2004; Mulligan *et al.*, 2001). Les techniques biologiques (atténuations naturelles, bioremédiation) sont peu coûteuses mais demandent en général un temps de traitement plus long et les sites traités ne peuvent être que d'une surface réduite. Parmi ces techniques biologiques, celle qui est principalement utilisée est la dépollution par les plantes (phytoremédiation). Deux

stratégies principales peuvent être appliquées en phytoremédiation. La phytoextraction vise à accumuler les métaux au niveau des parties aériennes des plantes alors qu'en phytostabilisation un piégeage des métaux au niveau de la rhizosphère est recherché (figure 3) (Raskin *et al.*, 1997, Verbruggen *et al.*, 2009). Afin de résister aux effets toxiques générés par les métaux, les plantes ont dû mettre en place des mécanismes de résistance (production de phytochélatines, compartimentation vacuolaire...) (Schat *et al.*, 2002, Blaudez *et al.*, 2003).

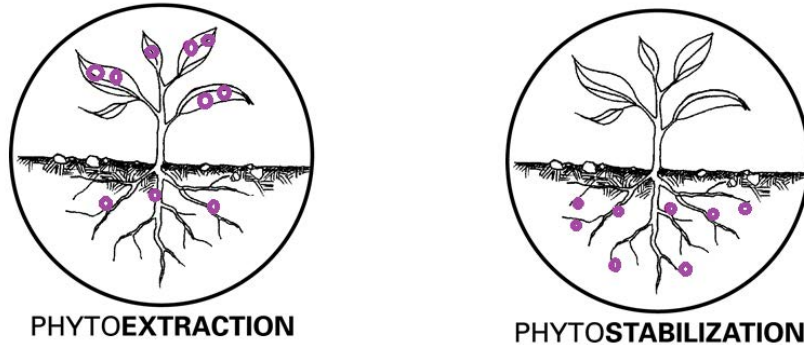


Figure 3 : Principales technique de phytoremédiation.

Les ronds violets représentent les ETM, phytoextraction : transfert des éléments nocifs dans les tissus végétaux en les accumulant dans les parties aériennes, phytostabilisation : immobilisation des métaux au niveau de la rhizosphère afin de limiter le transfert des ETM.

Dans la nature les plantes ne se retrouvent généralement pas directement en contact avec la pollution métallique des sols. En effet au niveau de la rizosphère sont présentes des bactéries et des champignons qui sont en contact direct avec les polluants. Ces différents microorganismes peuvent intervenir dans le transfert des ETM vers la plante : en effet ils peuvent notamment augmenter la résistance de la plante en diminuant le transfert des ETM ou en favorisant la croissance de celle-ci (Jourand *et al.* 2010; Soares et Siqueria 2008; Ma *et al.*, 2010). De plus les effets des différents microorganismes peuvent se cumuler, ainsi des bactéries de type PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) et des champignons mycorhiziens peuvent augmenter ou diminuer le transfert des ETM vers les parties aérienne de la plante (Krupa et Kozdroj, 2006 ; Vivas *et al.*, 2006). Quoiqu'il en soit, les microorganismes et notamment les champignons ont dû mettre en place des mécanismes de résistance contre les effets délétère des ETM. Plusieurs effets néfaste peuvent être observés tel que des perturbations de membranes cellulaires (Gadd, 1993) la production de radicaux libres s'attaquant aux membranes et aux acides nucléiques (Leonard *et al.*, 2005), des cassures de l'ADN simple brin ainsi que la fromation de complexe avec l'ADN (Bregadze *et al.*, 2008).

4) Mécanismes de tolérance aux ETM chez les champignons

Dans le sol les champignons représentent les organismes les plus tolérants aux métaux lourds. Les ETM ont des effets toxiques directs sur les champignons, ils interagissent avec les membranes biologiques en les rendant plus perméables (Gadd, 1993). De plus ils ont également des effets indirects en augmentant la production de radicaux libres (Gadd, 1993). Différents stratégies se sont alors mises en place lors de l'évolution afin de répondre au stress métallique. Les mécanismes d'évitement comme la sécrétion de composés organiques dans l'environnement. Parmi les composés les plus connus et sécrétés dans de telles conditions, l'acide citrique, l'acide oxalique (Gadd, 1993) et les sidérophores semblent jouer des rôles primordiaux. D'autres mécanismes de tolérance impliquent les métallothionéines (Bellion *et al.*, 2007), petits polypeptides permettant de piéger les métaux dans le cytosol des hyphes (figure 4), ou encore la surexpression de transporteurs de métaux au niveau du réticulum endoplasmique ou de la vacuole (Blaudez et Chalot, 2011).

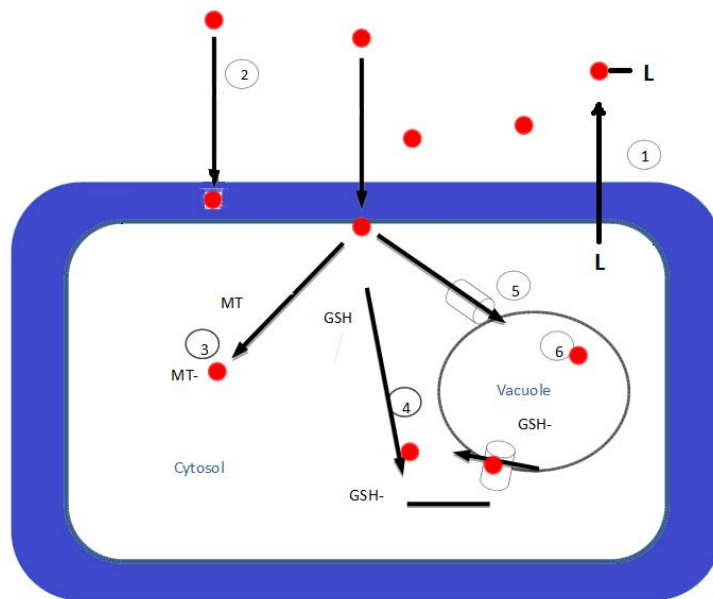


Figure 4 : Principaux mécanismes impliqués dans la tolérance aux métaux dans les cellules fongiques.

1 : sécrétion de lignat (L) ; 2 : adsorption à la paroi ; 3 : complexation avec des métallothionéines (MT) ; 4 : complexation avec du glutathion (GSH) ; 5-6 : stockage dans la vacuole (d'après Bellion *et al.*, 2006).

5) Les champignons mycorhiziens

La mycorhize est un organe symbiotique issu d'une association à bénéfice réciproque entre un partenaire fongique et une plante. Il existe plusieurs types de mycorhizes, 7 catégories ont été définies au total mais nous nous intéressons ici qu'aux deux plus importantes que sont les ectomycorhizes et les endomycorhizes à arbuscules (Figure 5). Les ectomycorhizes se caractérisent par la présence d'un manchon fongique autour de la racine, le partenaire fongique se développe également entre les cellules du cortex de la plante formant ainsi le réseau de Hartig. Les ectomycorhizes pourraient agir comme une barrière physique contre les métaux lourds présents dans la solution du sol (Khan *et al.*, 2000). Les endomycorhizes se caractérisent par un développement du partenaire fongique à l'intérieur

des cellules de la plante jusqu'au plasmalemme en formant des arbuscules qui sont la structure d'échange de composés entre les deux partenaires.

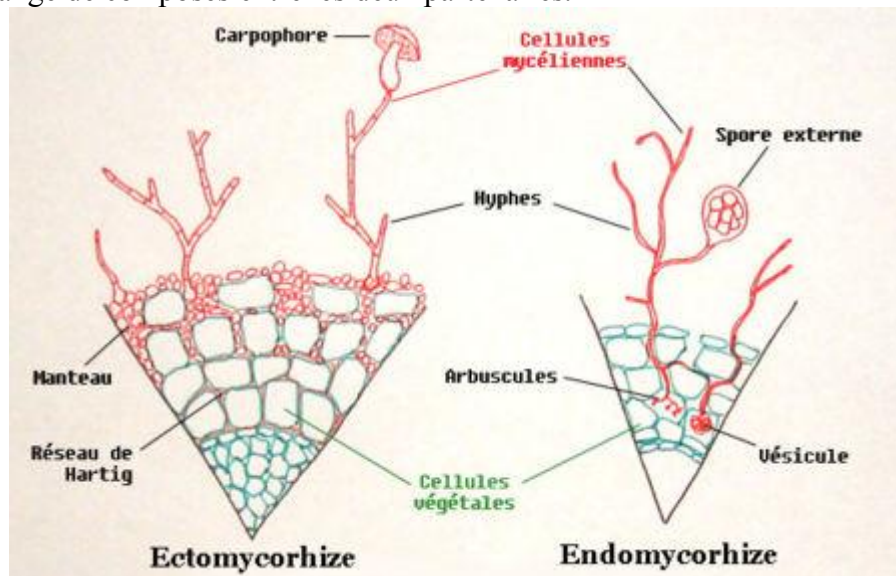


Figure 5 : Les deux principaux types de mycorhize.

Les cellules végétales figurent en bleu, les cellules fongiques en rouge.

(<http://ademyco.wordpress.com/2011/03/endoecto.jpg>).

6) Le biochar

Le biochar est un dérivé du charbon, il est obtenu après combustion de biomasse ligneuse dans des conditions où il y a très peu d'oxygène. Le biochar est connu pour ces propriétés de fertilisant depuis de nombreuses années. En effet les amérindiens l'utilisait déjà avant l'arrivée des premiers colons (Lehmann *et al.*, 2006). Des études récentes montrent que la structure du biochar permet une meilleure rétention de l'eau et des nutriments ainsi qu'un meilleur échange de ceux-ci et que le biochar engendre également une réduction de l'acidité des sols (Glaser *et al.*, 2002, DeLucas *et al.*, 2006). Ceci est d'autant plus important que le biochar a une durée de vie extrêmement longue (100-1000 ans) (Lehmann *et al.*, 2006). La structure du biochar (surface) permet d'adsorber et de former des complexes avec les ions métalliques (Liang *et al.*, 2006). Cette hypothèse a été testée dans plusieurs études afin de vérifier que le biochar permettait de limiter le transfert des ETM vers les plantes Namgay *et al.* en 2006 montrent ainsi que le biochar permet une réduction de l'accumulation de Cd et d'As dans les parties aériennes du maïs. D'autres études montrent que le biochar n'a pas d'influence négative sur le taux de mycorhization, (Herrmann *et al.*, 2004 ; Warnock *et al.*, 2007).

7) Objectifs du stage

Ce stage s'inscrit dans le cadre du projet international ANR Biofiltere, qui a pour objectif principal de tester de nouvelles techniques de phytoremédiation en utilisant des champignons mycorhiziens et des ligneux (peuplier), avec un objectif de production sur sol pollué de biomasse non contaminée.

Lors de ce stage nous nous sommes premièrement intéressés à l'étude du suivi des souches fongiques mycorhiziennes introduites au niveau de parcelles expérimentales. Dans un deuxième temps, des criblages (tests de tolérance aux métaux) et des identifications moléculaires de souches fongiques isolées de sites pollués ont été réalisés. Enfin dans un troisième temps, l'utilisation de biochar a été testée en conditions contrôlées afin de savoir si

ce produit avait une influence sur la croissance de champignons mycorhiziens soit en culture pure, soit en présence d'un partenaire ligneux (peuplier).

II. Matériels et méthodes

1) Suivi de la parcelle expérimentale de Pierrelaye

Le site expérimental de Pierrelaye se situe dans le département du Val-d'Oise. La pollution de ce site date du 19^{ème} siècle, en effet en 1899 la ville de Paris décide que 2150 ha deviendraient des champs d'épandage et une mise en service d'une usine d'épuration des eaux a été décidée afin d'assurer l'épandage des eaux usées. La pollution a seulement été détectée en 1997 et l'arrêt de cultiver ces terres a été mis en place. Le site présente une multi-contamination, principalement au zinc, cadmium et plomb (Tableau I). Le site de Pierrelaye est divisé en différentes parcelles, 48 peupliers ont été plantés par parcelle, soit avec le clone I214, soit avec le clone Skado. La moitié des parcelles ont été inoculées, et chaque modalité est répétée 4 fois.

Tableau I : Concentrations des principaux ETM du sol du site de Pierrelaye et norme européenne correspondante.

ETM	concentrations identifiées sur la parcelle expérimentale (kg / ha)	arrêté du 8 janvier 1998 (mg / kg)
Cd	1,94 – 4,44	2
Zn	314 - 761	300
Pb	74,7 - 484	100
Cu	69 - 230	100

Les racines ont été prélevées en novembre 2011 sur les individus du clone I214 pour les 8 parcelles (4 inoculées et 4 non inoculées). Sur chaque parcelle les racines ont été prélevées de 5 arbres choisis aléatoirement en excluant les arbres de bordures. Un individu de la parcelle 23 du clone Skado a également été prélevé. L'inoculum provient d'un mélange fongique (champignons ecto- et endomycorhizien) (Tableau II)

Tableau II : Composition de l'inoculum introduit à Pierrelaye sur le site expérimental.

ectomycorhizien	<i>Hebeloma mesophaeum</i>
	<i>Amanita rubescens</i>
	<i>Laccaria proxima</i>
	<i>Paxillus involutus</i>
endomycorhizien	<i>Glomus intraradices</i> BEG140

	<i>Glomus mosseae</i> BEG95
	<i>Glomus claroideum</i> BEG96
	<i>Glomus microaggregatum</i> BEG56
	<i>Glomus etunicatum</i> BEG92
	<i>Glomus geosporum</i> BEG199
	<i>Glomus irregulare/intradices</i> DAOM197198

a) Analyses microscopiques

Une partie de ces racines sont ensuite prélevées (100 mg) pour les futures analyses moléculaires. La partie restante du système racinaire prélevé est utilisée pour observer les endomycorhizes et les ectomycorhizes par microscopie photonique. Les ectomycorhizes sont d'abord comptées sur les racines fraîchement lavées, 300 pointes racinaires sont observées à la loupe binoculaire. Pour observer les endomycorhizes, les échantillons doivent préalablement être colorés, pour cela, le bleu de méthyl a été utilisé. Les racines sont d'abord incubées à 90°C pendant 2h dans du KOH (10%) pour permettre une décoloration des tissus. On élimine ensuite le KOH en incubant les racines dans plusieurs bains d'eau. Les racines sont ensuite placées dans une boîte de Pétri en présence d'un mélange de bleu methyl à 0,1% (p/v) et d'acide lactique pendant une nuit à température ambiante. Le lendemain, les racines sont rincées avec une solution d'acide lactique à 25% pour éliminer le bleu de méthyl. Des lames de microscopies sont alors préparées à raison de 5 lames par échantillon. Sur chaque lame 15 morceaux de fines racines d'environ 1 centimètre de longueur sont déposées entre lame et lamelle. La détermination du taux de colonisation par les champignons mycorhiziens est effectuée à partir du protocole mis en place par Trouvelot et ses collaborateurs (1986). Deux comptages sont réalisés : tout d'abord le pourcentage de mycorhization total du fragment et ensuite la proportion d'arbuscule. La méthode de dénombrement est donnée dans le tableau III.

Tableau III : Dénombrement du taux d'endomycorhization.

% Endomycorhization	Score attribué au fragment considéré	Taux d'arbuscules	Code attribué au fragment considéré
0	0	Aucun	A0
<1	1	Rare	A1
<10	2	Fréquent	A2
<50	3	Abondant	A3
>50	4		
>90	5		

On obtient des codes du type 1A0, 3A2 qui sont rentrés sur le logiciel MycoCalc qui permet de déterminer le pourcentage total d'endomycorhization et le taux d'arbuscules.

b) Identification moléculaire des espèces fongiques présentes sur les racines

L'extraction de l'ADN génomique (ADNg) des racines est réalisée à partir du kit « DNeasy® Plant Mini Kit » de Qiagen (selon les recommandations du fournisseur). L'ADN obtenu est ensuite dosé au spectrophotomètre à une D.O. de 260 nm et un gel d'agarose à 1% préparé dans du TBE (Tris-Borate-EDTA) 100ml, 2µl de bromure d'Ethidium, un agent intercalant de l'ADN, est ajouté au gel permettant de révéler les fragments d'ADN par excitation aux UV.

L'ADN est ensuite amplifié par PCR à l'aide de l'ADN matrice et des couples amorces correspondants (ITS1F/ITS4B ou NS31/AM1) (Tableau IV). Au total trois réactions de PCR (Tableau V) de 25µl sont nécessaires afin d'obtenir suffisamment d'ADN amplifié. Les régions ITS (Internal transcribed spacer) situées entre les gènes codant les sous unités 28S, 18S, et 5.8S des ARN ribosomiaux sont ainsi amplifiées à l'aide des couples d'amorces spécifiées ci-avant.

Tableau IV Amorces utilisées

amorces	séquence	cible
ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	basidiomycètes
ITS4-B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG	basidiomycètes
NS31	TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC	endomycorhiziens Glomus
AM1	GTTTCCCGTAAGGCGCCGAA	endomycorhiziens Glomus

Tableau V Exemple de mélange réactionnel pour une PCR

Composition du mélange	Volume en µL
Matrice (ADNg)	1
Amorces nucléotidiques	2
Tampon 5×	10
dNTPs (10mM)	1
Enzyme Phire II	1
Eau stérile	35
Total	50

Les extraits PCR sont ensuite purifiés à l'aide du kit « GENE CLEAN® Turbo Kit » de MP biomedical. Après purification, les inserts (7µl) sont mélangés au plasmide pGEMT(1µl) avec une ligase (1µl) et 1µl de tampon. Le mélange est placé une nuit à 4°C. Une transformation bactérienne est ensuite réalisée avec des bactéries compétentes qui sont mises en contact avec 10 µl du mélange de ligation puis placées dans de la glace pendant 30 minutes. Un choc thermique est ensuite effectué (42°C pendant 45 sec), puis un milieu riche est ajouté (SOC) et les bactéries sont ensuite mises sous agitation (150 rpm) à 37°C pendant 1 heure. Le mélange est ensuite étalé sur milieu LB contenant de l'ampicilline (1ml/l), le milieu est additionné de 100µl d'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) à 0,1 mM, et de 20µl de 5-bromo-4chloro-3indolyl-β-D-galactopyranoside (Xgal) à 50mg/ml, Les boîtes ensemencées sont finalement placées à 37°C pendant une nuit.

Les bactéries ayant intégré le plasmide sont récupérés, les colonies sont repérées par une coloration (les bactéries blanches ayant intégré l'insert), une partie est ainsi repiquée sur

une nouvelle boîte et l'autre partie est placée dans 21 µl d'eau stérile pour la réaction PCR sur colonies (Tableau VI). Les produits de la PCR sont séparés sur gel d'agarose (1,5 %) afin de vérifier à la fois la taille de l'insert et l'absence de faux positifs (bactéries ayant intégré un plasmide sans insert).

Tableau VI : Exemple de mélange réactionnel pour une PCR sur colonies bactériennes

Composé	Quantité en µL
Eau + ADN	21
Tampon (10 X)	2,5
dNTP (10 mM)	0,5
Amorces nucléotidiques	1
Paq5000DNAPolymérase (5 U/µl)	0,25

Nous réalisons ensuite avec les produits PCR une réaction RFLP (restriction fragment length polymorphism). A cette occasion, deux couples d'enzymes de restriction sont utilisées afin de regarder si les inserts intégrés par les bactéries ont des profils de digestion différents. Cette méthode est utilisée pour réduire le nombre d'échantillons à envoyer à séquencer. Des cultures liquides des bactéries sélectionnées (différents profils de la réaction RFLP) sont réalisées. Des bactéries sont ainsi incubées dans du milieu LB () à 37°C sous agitation pendant une nuit. Afin de récupérer les plasmides isolés dans chaque clone bactérien, le kit « Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System » de Promega est utilisé. Il permet d'isoler et de purifier l'ADN plasmidique des autres composés de la cellule (y compris l'ADN génomique). L'ADN obtenu est ensuite dosé au spectrophotomètre. Si les échantillons dosés ont une concentration en ADN supérieur à 100 ng/µl, ils sont envoyés à séquencer à la société Beckman Coulter Genomics SA. Les séquences sont ensuite comparées à une base de données en ligne par BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) pour identification taxonomique.

2) Criblage des souches fongiques

a) Tests de croissance

Des implants de 4 mm de diamètre sont prélevés à partir d'un emporte-pièce et déposés sur 4 milieux différents (Malt, MMN, N2P2 et Pachlewski) (annexe 1). Après deux semaines de croissance une mesure du diamètre est réalisée pour déterminer les conditions optimales de croissance des souches fongiques. Le milieu sur lequel les souches se développent le plus sera ainsi sélectionné et utilisé pour les tests de tolérance aux métaux.

b) Tests de tolérance aux métaux

Les différentes souches fongiques ayant des conditions optimales de croissance différente nous réalisons un milieu composite de N2P2 + malt. Celui-ci est additionné ou non d'un métal. La résistance à deux métaux (cadmium et zinc) a été testée au cours de ce stage de master. Les concentrations suivantes ont été choisies : cadmium (CdCl₂) 10 et 50 µM, zinc (ZnCl₂) : 1, 3, et 5 mM. Afin de récolter plus facilement les souches fongiques des boîtes gélosées à la fin de l'expérience une membrane stérile de cellophane (préalablement bouillie à l'EDTA 10mM) est déposée sur le milieu gélosé de chaque boîte avant de les inoculer.

Une mesure du diamètre est effectuée chaque semaine afin de suivre la croissance du mycélium. Les souches sont récoltées quand le témoin (milieu non contaminé) atteint un diamètre de 6 cm. Les mycelia des souches sont ensuite pesés (masse fraîche) et séchés à l'étuve pendant deux jours pour déterminer leur masses sèches. Les échantillons sont ensuite

envoyés pour déterminer leur contenu métallique par ICP-AES (Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry).

3) Influence du biochar sur la croissance de champignons mycorhiziens

a) Culture liquide

Des cultures liquides (100 ml) de *Laccaria bicolor* (souche H82) dans deux conditions de stress métallique : absence ou présence de zinc a forte concentration (4mM) et 5 conditions de biochar (0, 0.5, 1, 5, et 10%). La culture est réalisée pendant une semaine. Le pH est mesuré stérilement en début et en fin de manipulation.

b) Test en milieux gélosés

Un criblage de trois souches fongiques ectomycorhiziennes (*Paxillus involutus* souche HE, *Paxillus involutus* souche Pi01, *Laccaria bicolor* souche S238N) en présence de zinc et/ou de biochar. Une gamme de 6 concentrations en zinc (0, 1, 2, 4, 6, et 10 mM) couplée à 5 conditions de biochar (0, 0.5, 1, 5 et 10%) a été testée. Tout comme pour les tests de tolérance des implants de 4 mm de diamètre sont déposés sur une membrane de cellophane posée sur milieu MMN gélosé.

c) Test avec le sol pollué

Afin de tester les capacités de mycorhization des souches fongiques en présence de biochar et d'un stress métallique, des cultures de peuplier en pots contenant du sol pollué de Pierrelaye sont réalisées.

Trois inocula sont utilisés dans cette expérience : *Paxillus involutus* souche HE, *Laccaria bicolor* souche S238N, et un inoculum de plusieurs souches endomycorhiziennes. Dix traitements (Tableau VII) sont ainsi réalisés.

Tableau VII : Pots réalisés en fonction de la souche de l'inoculum et du pourcentage de biochar introduit

% de biochar \ inoculum	0	1%	5%
témoin			
Laccaria			
Paxillus			
inoculum endomycorhizien			

(En jaune apparaissent les modalités réalisées, n=5)

Les boutures de peuplier sont mises à débousser une semaine avant le début de l'expérience dans un mélange de vermiculite, eau et de micro- et macro-éléments. Seules les boutures possédant des racines sont utilisées. La culture est mise en place pour une durée de 8 semaines dans un phytotron afin de contrôler l'humidité, la lumière et la température. L'arrosage des plants se fait tous les deux jours (200ml) pendant une semaine, puis afin de favoriser l'établissement de la mycorhization l'arrosage est réduit à 100 ml par la suite.

A la fin de l'expérience les plants sont mesurés (hauteur, masse fraîche) et un comptage du nombre de feuilles est réalisé. Les échantillons sont ensuite séchés à l'étuve et envoyés pour dosage des ETM par ICP-AES. La partie racinaire est prélevée et lavée, un décompte du nombre des ectomycorhizes est réalisé sur les pots inoculés par *Laccaria* et *Paxillus*. Pour les racines endomycorhizées par l'inoculum une coloration au bleu de méthyl est effectuée comme pour le suivi des parcelles expérimentales.

4) Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées sous le logiciel R (version 2.13.1) pour les tests ANOVA et le test de corrélation et sous utilitaire Excel (AnaStats.fr) pour les tests de Kruskal-Wallis.

III. Résultats.

1) Suivre de l'inoculation des parcelles expérimentales.

a) Dénombrement des ecto- et endo-mycorhizes

Dans cette expérience nous cherchons à déterminer si l'inoculum ectomycorhizien et endomycorhizien a colonisé les racines de peuplier. De plus le sol contient déjà des propagules fongiques susceptibles de coloniser les racines de peuplier. Pour cela un décompte des mycorhizes au niveau des systèmes racinaires a été réalisé.

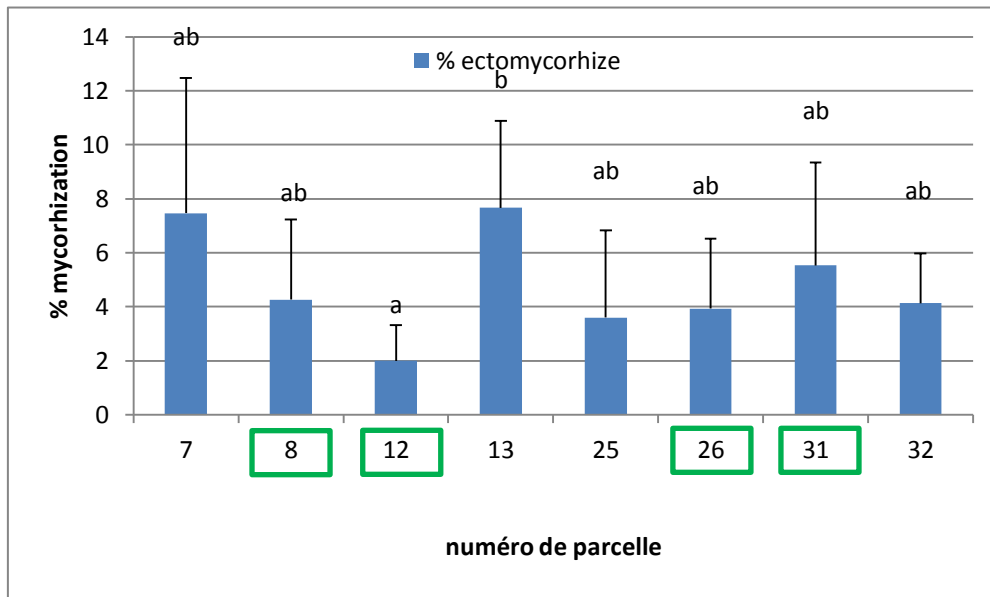


Figure 6 : Taux d'ectomycorhization des parcelles de peuplier.

Les barres représentent les erreurs standards, pour chaque parcelle n=5, les différences significatives entre parcelles sont indiqués par des lettres (test de Kruskal-Wallis). L'Encadré vert représente les parcelles inoculées.

Le taux d'ectomycorhization est compris entre 2 et 8% pour l'ensemble des 8 parcelles étudiées (Figure 6). Les analyses statistiques ne montrent pas de différence significative entre les parcelles inoculées et non inoculées, sauf entre la parcelle 12 et 13 (pvalue<0.05) la parcelle inoculée a un taux d'ectomycorhization plus faible que la parcelle non inoculée.

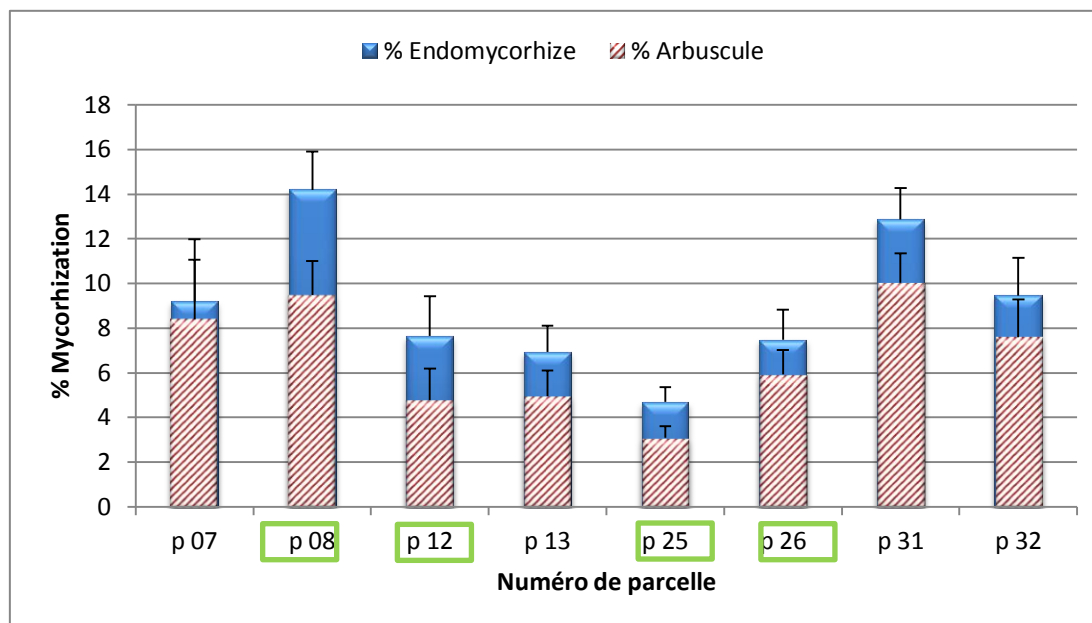


Figure 7 : Taux d'endomycorhization et d'arbuscule des parcelles de peuplier.

Les barres représentent les erreurs standards, pour chaque parcelle n=5. L'encadré vert représente les parcelles inoculées.

Le taux d'endomycorhization est compris entre 5 et 14% (Figure 7). On observe une légère tendance à la hausse pour les parcelles inoculées mais celle-ci n'est pas significative. Le taux d'arbuscules est compris entre 3 et 10%.

b) Identification moléculaire des espèces fongiques présentes sur les racines de peuplier.

Nous cherchons ici à déterminer les espèces fongiques présentes sur les racines de peuplier afin de notamment vérifier si elles appartiennent ou non à l'inoculum introduit.

Les résultats de l'identification moléculaire nous montrent que sur les 5 champignons identifiés un seul est endomycorhizien (*Glomus mosseae*), un est pathogène (*Thanatephorus*) et deux sont des espèces endophytes non pathogènes (*Ceratobasidium* et *Cadophora*). (Tableau VIII).

Tableau VIII : résultat du séquençage

Pourcentage de l'espèce par parcelles								Résultat séquençage
07	07	12	13	25	26	31	32	
29,166	Nd.	Nd.	Nd.	25	Nd.	Nd.	41,666	<i>Parasola sp</i>
Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	<i>Cadophora sp</i>
18,75	Nd.	Nd.	Nd.	16,666	Nd.	Nd.	4,166	<i>Ceratobasidium sp</i>
Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	<i>Thanatephorus</i>
Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	<i>Phialocephala sp</i>
41,666	20,833	41,666	29,166	8,333	62,5	68,75	68,75	<i>Glomus mosseae</i>

Pour les valeurs Nd. L'espèce est présente mais nous ne possédons pas le pourcentage.

Après avoir aligné et comparé les différentes séquences appartenant à l'espèce *Glomus* nous avons identifié deux génotypes différents. *Glomus mosseae* est l'un des champignons composant l'inoculum endomycorhizien introduit à Pierrelaye. Ces deux génotypes se retrouvent dans les parcelles inoculées et non inoculées. (Annexe 2).

2) Criblage des souches fongiques

a) Étude de la croissance des différentes souches en fonction du milieu de culture.

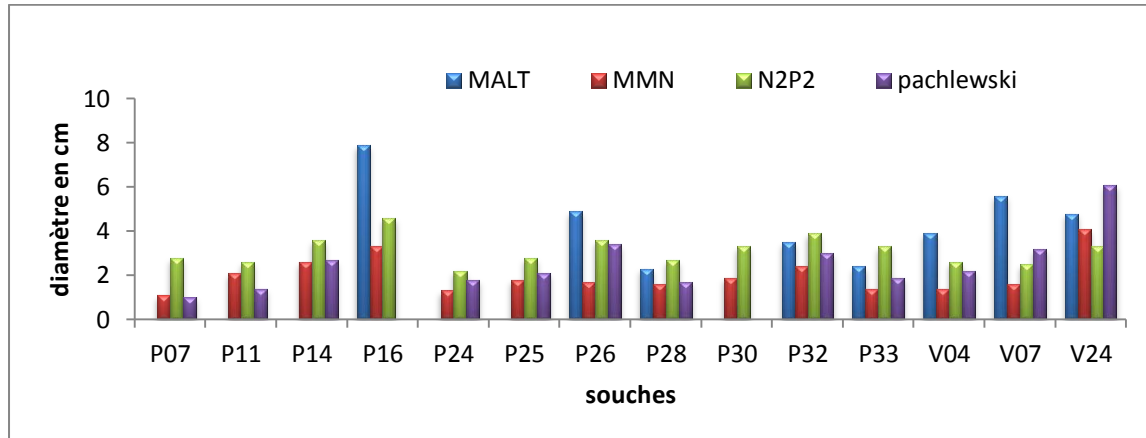


Figure 8 : Croissance des souches fongiques sur différents milieux.

Les données manquantes étant égales à zéro.

La croissance des différentes souches a été testée sur quatre milieux de culture différents, dans la plupart des cas les souches présentent une meilleure croissance sur milieux N2P2 sauf pour les souches P16, P26, V04 et V07 qui se développent mieux sur malt. La croissance de ces souches sur milieux N2P2 étant réduite, un milieu composite N2P2-malt a alors été choisi en tant que milieu gélosé pour les tests de tolérance aux métaux.

b) Étude de la tolérance des souches fongiques aux métaux lourds

La tolérance des 14 souches a été déterminée par la mesure de la biomasse fraîche produite sur milieu gélosé en présence (cadmium ou zinc) ou absence (contrôle) de métaux (figure 9).

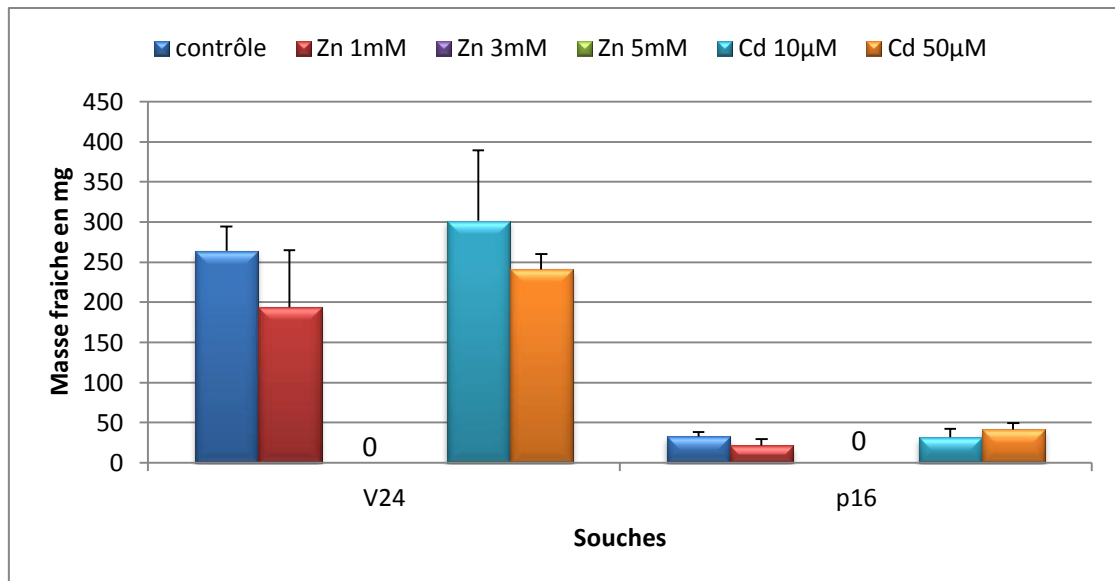


Figure 9 : Croissance des souches fongiques sur différentes concentrations de Zn ou Cd après un temps de développement de 3 semaines, les barres représentant l'erreur standard (n=5)

Un test ANOVA a été effectué, aucune différence significative n'a été observé ($p\text{-value} < 0.05$) sur le développement des souches en fonction de la concentration en zinc dans le milieu. Le développement des souches en présence d'un stress métallique est identique au contrôle. Pour ces deux souches (V24 et P16) les effets du stress métallique n'est pas perceptibles et les colonies se développent aussi bien que sur le témoin pour les deux concentrations en cadmium et pour le zinc (1mM). Par contre la croissance des deux souches est complètement inhibée sur les milieux contenant 3 et 5mM de zinc. Les résultats des douze autres souches fongiques n'est pas encore déterminées car leurs croissances est très lente.

3) Influence du biochar sur la croissance de champignons mycorhiziens

a) Test en culture liquide

Nous cherchions ici à vérifier si la présence biochar dans le milieu de culture permettait une meilleure tolérance aux métaux lourds des champignons. Comme première expérience nous avons choisi des cultures liquides du champignon ectomycorhizien modèle, *Laccaria bicolor* avec zinc ou sans zinc et une gamme croissante de biochar.

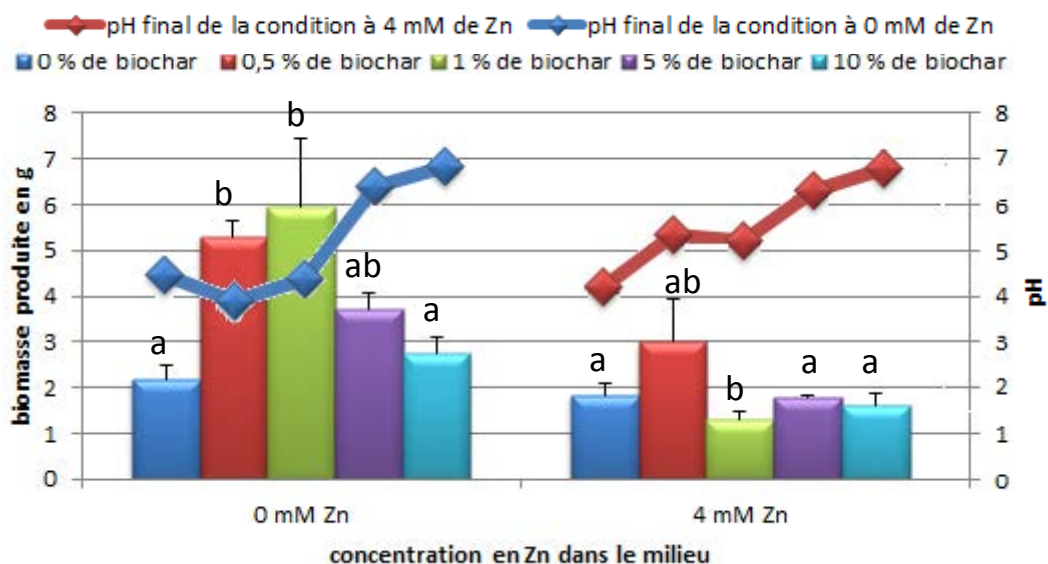


Figure 10 : Croissance de *Laccaria bicolor* en présence ou absence de zinc en présences de différentes concentrations en biochar, et évolution du pH final dans chaque condition.

Les barres représentent les erreurs standards, les différences significatives entre traitement pour chaque condition sont indiquées par des lettres (test ANOVA), n=3.

La croissance de *Laccaria bicolor* en milieu liquide est identique en absence ou présence d'un stress métallique (zinc) (figure 10). Lorsque l'on ajoute du biochar dans le milieu on observe une meilleure croissance dans les deux conditions à faible pourcentage de biochar (0.5 %), ces différences sont significativement différentes (pvalue<0.05), par rapport au contrôle. A fort pourcentage de biochar (5 et 10%) on observe une décroissance de la biomasse pour les deux conditions revenant à la croissance initiale (sans biochar). Cette décroissance est à mettre en relation avec l'augmentation du pH même si le pourcentage de corrélation n'est pas significatif (pvalue > 0,05, R²=0,51).

Les dosages de métaux accumulés n'a pas pu être réalisé, car *Laccaria bicolor* a adsorbé le biochar (Figure 11). Nous avons donc décidé de changer de stratégie et de réaliser les expériences en milieu solide gélosé. Dans ces expériences d'utiliser trois souches de champignons ont été testées.

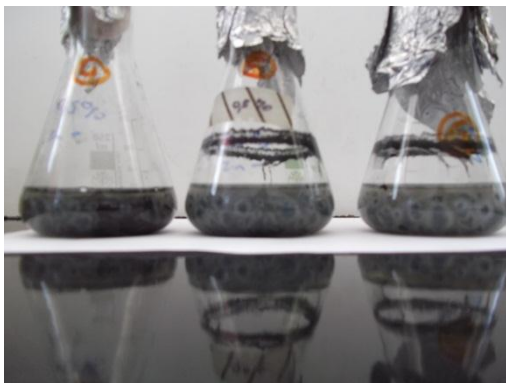


Figure 11 : Culture de *Laccaria bicolor* en absence de zinc et en présence de 1% de biochar.

b) Tests en milieux gélosés

Nous cherchons à vérifier que le biochar permet une meilleure tolérance à un stress métallique sans que celui-ci s'accumule sur les hyphes des champignons. Une membrane de cellophane est ajoutée entre milieu gélosé et implant fongique, si bien que la colonie ne développera sans contact physique direct avec le biochar.

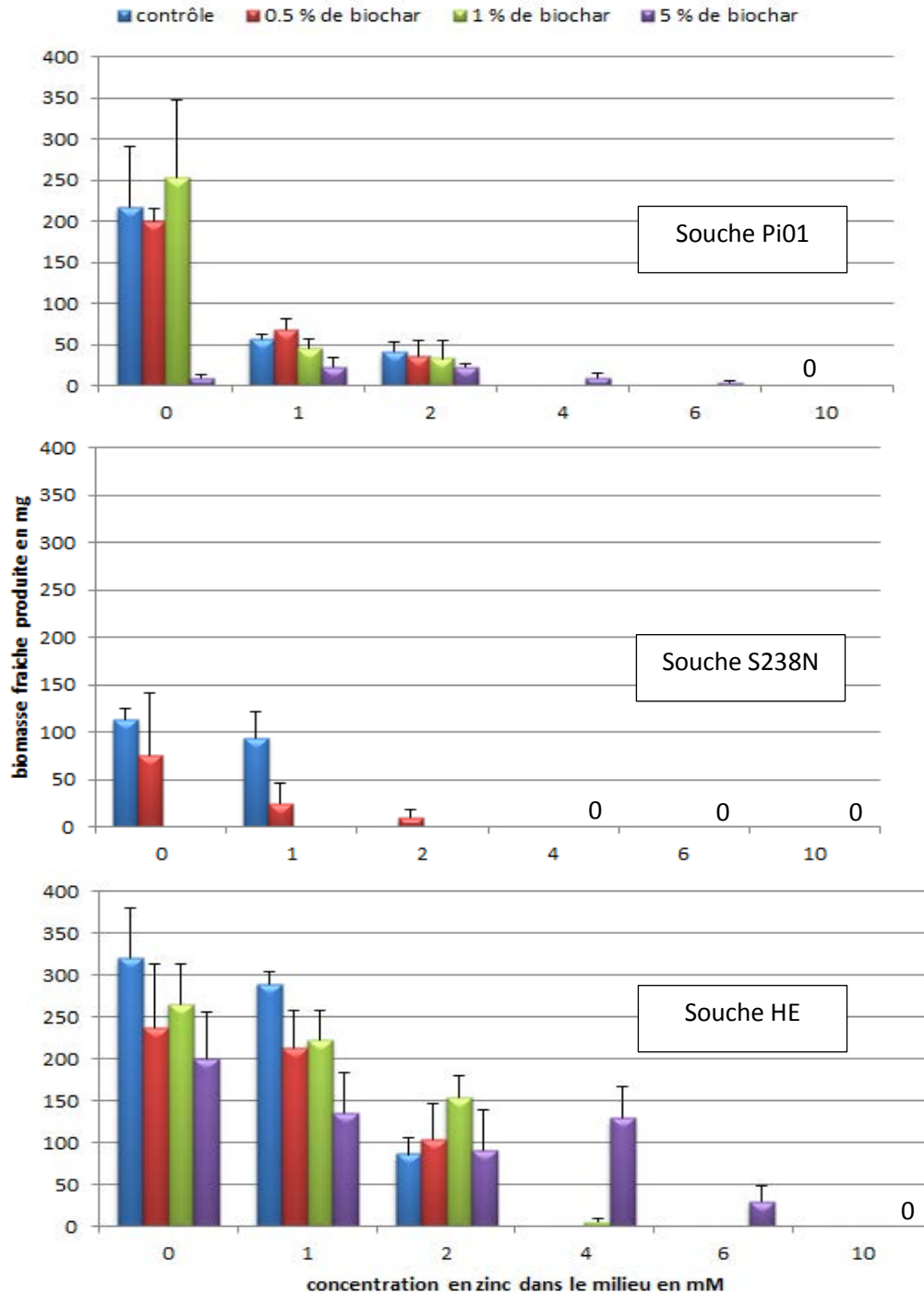


Figure 12 : Croissance des différentes souches fongiques après deux semaines de culture sur des milieux contenant différentes concentrations de biochar avec ou sans stress métallique, les barres représentent les erreurs standards (n=5).

Des tests ANOVA ont été réalisés sur les différentes souches, aucune différences significatives n'ont été observées entre les différents traitements de biochar. Tout d'abord nous pouvons remarquer à partir de la figure 12 que la croissance des souches de *Paxillus involutus* (Pi01 et HE) sur des concentrations en biochar de 0,5 et 1 % est identique aux témoins, alors que la croissance de *Laccaria bicolor* (S238N) est inhibée après 0,5 % de biochar. En présence d'un stress métallique les souches Pi01 et S238N ont une croissance

fortement diminuées par rapport aux contrôle, ces souches sont sensible à un stress métallique alors que la souche HE présente une croissance identique au témoin à 1mM de zinc, cette souche résiste à des concentrations de 2mM. Lorsque l'on additionne le stress métallique et la présence de biochar, nous observons chez la souche résistante (HE) une meilleure résistance au stress métallique, un fort pourcentage en biochar (5%) permet de résister à des doses de 4 et 6 mM de zinc.

c) Test de mycorhization en pots contenant du sol pollué de Pierrelaye

Afin de tester les capacités de mycorhization du peuplier en présence de biochar et d'un stress métallique nous réalisons une expérimentation en pots afin de rester dans des conditions contrôlées..

Au niveau de la morphologie de la plante nous observons des différences significatives (pvalue < 0,05) aux niveaux des traitements pour les traits taille de la tige, poids frais tige et feuille et poids sec tige et feuille (tableau IX et X). En effet les peupliers inoculés par les souches *Laccaria bicolor* et *Paxillus involutus* présentent une meilleur croissance pour ces traits par rapport aux peupliers inoculés par l'inoculum endomycorhizien. On observe également une différence significative entre les pourcentages de biochar pour le taux relatif en eau, les peupliers à 5 % de biochar présente un meilleur RWC que ceux dans la condition à 1 % de biochar.

Tableau IX : Effets des traitements (témoin, *Laccaria bicolor*, *Paxillus involutus*, inoculum Endomycorhizien), biochar (0, 1 et 5%) et de l'interaction entre le biochar et les traitements. Test ANOVA. Les corrélations significatives sont signalées en gras.

paramètre	source	Ddl	SS	MS	F	Pvalue
Nombre de feuille	Traitement	3	131.81	43.938	1.2901	0.294
	biochar	2	152.58	76.291	2.2400	0.122
	Traitement * biochar	4	157.72	39.430	1.1577	0.347
	Erreur	33	1123.93	34.059		
Taille des tiges	Traitement	3	1341.99	447.33	7.0560	0.0008
	biochar	2	271.62	135.81	2.1422	0.133
	Traitement * biochar	4	400.42	100.11	1.5790	0.202
	Erreur	33	2092.11	63.40		
MS des feuilles	Traitement	3	170.553	56.851	7.0706	0.0008
	biochar	2	26.581	13.291	1.6530	0.206
	Traitement * biochar	4	27.499	6.875	0.8550	0.500
	Erreur	33	265.334	8.040		
MF des tiges	Traitement	3	30.721	10.240	7.4716	0.0005
	biochar	2	3.093	1.546	1.1284	0.335
	Traitement * biochar	4	9.724	2.431	1.7738	0.157
	Erreur	33	45.228	1.370		
MS des feuilles	Traitement	3	19.166	6.388	6.1952	0.0018
	biochar	2	1.828	0.9138	0.8861	0.421
	Traitement * biochar	4	2.941	0.7353	0.7130	0.588
	Erreur	33	34.030	1.0312		
MS des tiges	Traitement	3	3.371	1.12397	5.7699	0.002
	biochar	2	0.349	0.17488	0.8977	0.417
	Traitement * biochar	4	1.101	0.27543	1.4139	0.251

	Erreur	33	6.428	0.19480		
RWC (taux relatif en eau)	Traitement	3	0.119	0.03991	0.1474	0.930
	biochar	2	1.946	0.973	3.5960	0.038
	Traitement * biochar	4	1.172	0.293	1.0832	0.380
	erreur	33	8.931	0.270		

Tableau X : Comparaisons des différents traitements sur toutes les populations et comparaisons des différents pourcentages de biochar pour le taux relatif en eau.

paramètre	source		diff	lwr	upr	pvalue
Taille des tiges	traitement	L-E	11.136	1.638	20.633	0.016
		P-E	13.318	4.096	22.540	0.002
		T-E	2.608	-6.184	11.400	0.852
		P-L	2.182	-7.713	12.077	0.932
		T-L	-8.522	-18.024	0.969	0.091
		T-P	-10.71	-19.931	-1.488	0.017
MF des feuilles	traitement	L-E	4.050	0.667	7.432	0.013
		P-E	5.193	1.909	8.477	0.0008
		T-E	2.075	-1.056	5.206	0.294
		P-L	1.143	-2.380	4.667	0.816
		T-L	-1.975	-5.357	1.407	0.403
		T-P	-3.118	-6.402	0.165	0.067
MF des tiges	traitement	L-E	1.730	0.334	3.126	0.010
		P-E	2.148	0.792	3.504	0.0008
		T-E	0.725	-0.567	2.017	0.439
		P-L	0.417	-1.037	1.872	0.864
		T-L	-1.005	-2.401	0.390	0.228
		T-P	-1.423	-2.779	-0.060	0.036
MS des feuilles	traitement	L-E	1.261	0.0498	2.472	0.038
		P-E	1.743	0.5672	2.919	0.001
		T-E	0.558	-0.563	1.679	0.540
		P-L	0.482	-0.779	1.744	0.731
		T-L	-0.702	-1.914	0.508	0.409
		T-P	-1.185	-2.361	-0.008	0.047
MS des tiges	traitement	L-E	0.559	0.033	1.086	0.033
		P-E	0.703	0.192	1.214	0.003
		T-E	0.201	-0.285	0.689	0.680
		P-L	0.143	-0.405	0.691	0.893
		T-L	-0.358	-0.884	0.168	0.272
		T-P	-0.501	-1.012	0.009	0.055
RWC (taux relatif en eau)	biochar	0%-1%	-0.256	-0.688	0.174	0.322
		0%-5%	0.289	-0.253	0.831	0.400
		1%-5%	0.546	-0.001	1.093	0.050

En gras apparaissent les valeurs significatives, test ANOVA. L = *Laccaria bicolor*, E = inoculum endomycorhizien, T = témoin, P = *Paxillus involutus*, MS = masse sèche, MF = masse fraîche.

Le taux d'ectomycorhization dans cette expérience est nul pour tous les traitements quel que soit le taux de biochar. Nous réalisons également un décompte des endomycorhizes.

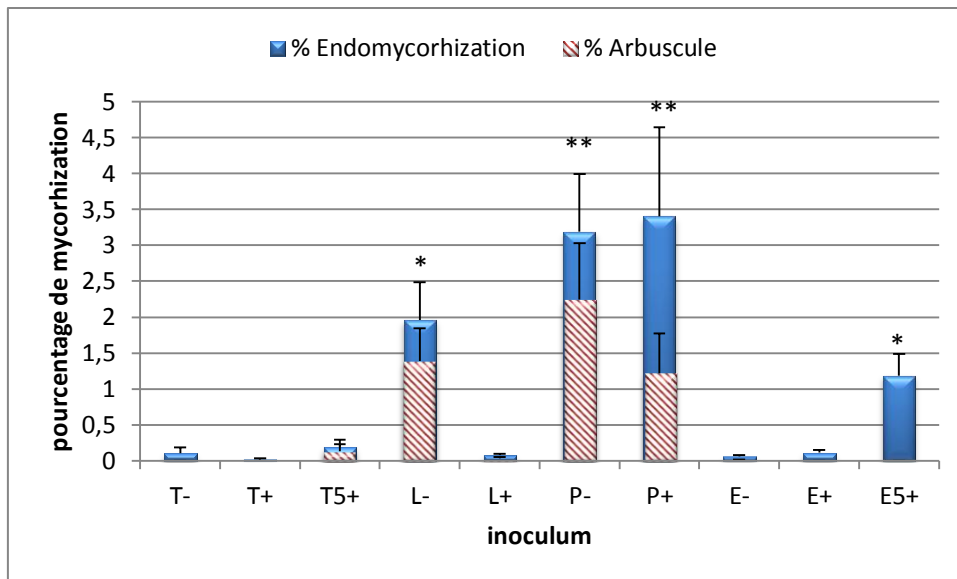


Figure 13 : Taux d'endomycorhization et d'arbuscules en fonction de l'inoculum. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard, n=5, une étoile représente une différence significative par rapport au témoin (T-), T : témoin, L : *Laccaria*, P : *Paxillus*, E : inoculum endomycorhizien, - : sans biochar, + : 1% de biochar ajouté à la terre, 5+ : 5% de biochar ajouté à la terre.

Le taux d'endomycorhization est très variable en fonction de l'inoculum utilisé, il est compris entre 0 et 3,5% (Figure 13). Des différences significatives sont observées pour les traitements L-, P-, P+ et E5+ par rapport au témoin. Ces traitements ont un taux d'endomycorhization plus important que le témoin. Pour le traitement *Laccaria* l'absence de biochar confère un meilleur taux de mycorhization alors que pour le traitement avec l'inoculum endomycorhizien c'est la présence de 5% de biochar qui est favorable à la mycorhization. Pour le traitement avec l'inoculum *Paxillus* la présence de biochar n'a pas d'influence.

IV. Discussion

1) Suivi des parcelles expérimentales

La quantification du taux de mycorhization des racines de peupliers montre la présence de champignons ectomycorhiziens et endomycorhiziens. Les différentes parcelles présentent des degrés de colonisation variable. Cependant les taux d'endomycorhization sont très proches entre eux et sont en moyenne de 10 %. Lingua et al en 2008 montrent que le taux de mycorhization de racines de peupliers issues d'un sol pollué au zinc était inférieur à 5 % pour des peupliers non inoculés, les parcelles P13 et P26 présentent donc des valeurs de mycorhization qui se rapprochent de cette étude.

Ces faibles taux de mycorhization pourraient être expliqués par plusieurs facteurs, tout d'abord les ETM peuvent avoir un effet inhibiteur en diminuant la croissance fongique, Karlinski *et al* en 2009 montrent en effet que les ETM diminuent la disponibilité des nutriments. Certains ETM pourraient aussi agir directement sur le champignon en inhibant la mycorhization (Christie *et al.*, 2004).

Ensuite les propriétés physico-chimiques du sol pourraient aussi expliquer un faible taux de mycorhization, notamment la disponibilité du phosphore et de l'azote, si celle-ci est trop élevée, elle est défavorable à l'établissement de la symbiose et diminue le taux de germination des spores (Christie et al., 2004). Le taux d'humidité du sol peut également défavoriser la mise en place de la mycorhization, en effet un sol trop humide ou trop sec inhibe la formation de mycorhizes (Gehring *et al.*, 2006 ; Karlinski *et al.*, 2009), or le site de Pierrelaye est légèrement pentu : certaines parcelles se retrouvent ainsi mieux irriguées que d'autres, le sol est également très sablonneux donc très drainant.

Enfin la présence d'ectomycorhize et d'endomycorhize sur les parcelles non inoculées révèlent la présence d'un inoculum naturel, Lingua et al en 2008 montrent que sur des sites pollués un inoculum endogène est présent en faible quantité. Cet inoculum endogène se retrouve donc en compétition avec l'inoculum introduit sur les parcelles inoculées. De plus la présence de champignons saprophytes peut également diminuer le taux d'ectomycorhization comme a pu le montrer Pereira et al (2012) sur des racines de châtaignier inoculées par un champignon ectomyrhizien en présence d'un saprophyte.

Sur un autre site expérimental du projet BIOFILTREE (Doubs) le taux d'endomycorhization des racines de peupliers est de l'ordre de 45% en moyenne, et très peu d'ectomycorhization a pu être observé. Ce site est contaminé au mercure et en arsenic. Les différences de mycorhization pourraient être expliquées par la forte toxicité du cadmium sur le site de Pierrelaye, Christie et al (2004) montrent que des taux élevés de cadmium inhibent la mycorhization. De plus la texture du sol est très différente entre les deux sites, en effet le site du Doubs est un ancien bassin de décantation des eaux usées. Le sol est alors très limoneux, permettant ainsi une meilleure rétention de l'eau par rapport au site de Pierrelaye.

L'amplification des régions ITS des champignons associés aux racines de peupliers a permis de mettre en évidence un champignon endomycorhizien (*Glomus mossae*). Les espèces de genre *Glomus* ont des capacités d'adaptation aux environnements pollués, notamment *G. mossae* qui présente une prédominance dans ces environnements (Din Hassan *et al.*, 2011). Les Glomus sont très tolérants au cadmium (Jeffries *et al.*, 2003) , ce qui pourrait expliquer leur présence sur le site de Pierrelaye.

Nous n'avons amplifié aucun champignon ectomycorhizien, ceci peut s'expliquer par le faible taux d'ectomycorhize présent sur les racines étudiées. Ce faible taux peut s'expliquer

par la jeunesse du peuplier, en effet les ectomycorhizes se retrouvent généralement sur les des peupliers plus âgés. Dans son étude, Krpata *et al.*, (2008) montrent à partir de racines de peuplier issues de site pollués au zinc et au cadmium, des taux d'ectomycorhization de 95 % et aucune endomycorhize à arbuscules sur des arbres âgés de 25 ans.

La présence de nombreux champignons non mycorhiziens (endophytes, saprophytes et pathogènes) a été révélée via l'amplification des ITS fongiques. La présence de nombreux endophytes sur des sites pollués a été montrée dans plusieurs études. Mandyam et Jumpponen (2005) montrent qu'ils peuvent être aussi nombreux que les champignons mycorhiziens. Ces endophytes ou DES (dark septate endophytes) pourraient être bénéfiques à la plante hôte (Mullen *et al.*, 1998) et se retrouvent souvent dans des environnements extrêmes. Likar et Regvar (2009) montrent également que le taux de champignons endophytes est plus important sur les parcelles contaminées, dans cette étude le genre *Cadophora* est retrouvé en majorité, comme dans la nôtre. Ces nouvelles études sur les DES ouvrent de nouvelles perspectives intéressantes pour la phytoremédiation.

2) Criblage des souches fongiques

Nous avons choisi un milieu composite N2P2-malt pour permettre une uniformité des tests réalisés dans l'étude, en effet on évite ainsi un biais dans la manipulation puisqu'il a été montré que le milieu de culture pouvait influencer de manière différente la solubilité des métaux (Hartley *et al.*, 1997).

D'après les résultats obtenus on peut conclure que les doses élevées en zinc affectent la croissance des champignons en diminuant la biomasse produite. Une étude de Martino *et al.* (2000) sur des champignons mycorhiziens éricoïdes issus de sols pollués au zinc montre des résultats similaires, à savoir une forte concentration en zinc et cadmium réduit fortement le développement des souches fongiques. Dans une autre étude Colpaert *et al.*, sur un champignon ectomycorhizien *Suillus luteus*, montre que certaines souches sont tolérantes au zinc et au cadmium, les souches tolérantes se développent sur plus de 5 mM de zinc et 100 µM. De plus les ETM réduisent le taux d'arbuscules (site d'échanges entre les deux partenaires de la symbiose) ainsi que le nombre de points d'entrée dans la racine (Ortega-Larrocea *et al.*, 2007). La tolérance à la pollution serait espèce-spécifique, métal-spécifique comme le montre Leyval *et al.*, (1997) sur des champignons mycorhiziens à arbuscule, dans notre étude nous ne pouvons pas confirmer ces résultats car deux souches ont été récoltées, les autres n'ayant pas suffisamment poussé.

3) Influence du biochar sur la croissance de champignons mycorhiziens

La culture de *Laccaria bicolor* en milieu liquide et en présence de biochar est à notre connaissance la première étude de ce genre. Le biochar semble bénéfique à la croissance en faible concentration. Nous ne savons pas s'il permet de réduire le transfert des ETM de la solution nutritive vers le champignon. En effet nous ne pouvons réaliser d'analyses du contenu en métaux des hyphes, le biochar adsorbé sur les hyphes donnerait un biais important dans la concentration réelle. La meilleure croissance observée pour les faibles taux de biochar pourrait être due à un apport d'une source de carbone. La décroissance de la biomasse dans les fortes concentrations en biochar est due d'une part à l'augmentation du pH et d'autre part à la présence d'un stress métallique lorsque celui-ci est présent.

La croissance fongique sur milieux gélosé et en présence de biochar est espèce et souche dépendante. Ainsi la croissance de *Laccaria biocolor* souche S238N est inhibée dès les plus faibles doses de biochar alors que *Paxillus involutus* souche Pi01 est tolérant aux biochar, *Paxillus involutus* souches HE est intermédiaire. Duclos et Fortin (1983) montrent sur milieux gélosé que l'addition de biochar permet d'avoir un taux de mycorhization de *Vaccinium* spp par des ERM (ericoid mycorrhizal fungi) de 100 %. Dans cette expérience nous observons également que le biochar permettait de protéger les champignons résistants contre les effets toxiques des ETM, comme nous pouvons le voir un taux de 5 % de biochar permet à la souche Pi01 de se développer sur des concentrations en zinc de 4 et 6 mM.

Les résultats du test en pots nous montrent des différences entre traitements pour certains traits. Cependant ces résultats ne sont pas très concluants car chez les individus inoculés par l'inoculum endomycorhizien et chez les témoins nous avons un taux de mortalité élevé d'environ 35 %, il ne nous restait plus que trois individus par condition ce qui augmente l'hétérogénéité des résultats. Les différences entre les taux de biochar pour le trait taux relatif en eau peuvent être expliquées par la forte mortalité observée chez les témoins en présence de 5 % de biochar. Nous observons également des différences significatives entre les témoins et inoculation par *Paxillus* pour différents traits, ces différences peuvent également être expliquées par la mortalité des témoins.

Nous n'observons aucune ectomycorhize lors de cette expérience, pourtant plusieurs études montrent que l'addition de biochar permet de favoriser le taux d'ectomycorhize (Harvey *et al.*, 1976; Mori et Marjenah, 1994). Cependant, cette augmentation reste faible : en effet Harvey *et al.* (1976), montrent une augmentation du taux de mycorhize de 2,9 % par rapport au contrôle (sans biochar). Le taux d'endomycorhize est faible dans notre expérience (maximum 3,5 %) pourtant plusieurs expériences montrent des taux de mycorhization élevée (Gaur et Adholeya, 2000 ; Saranya et Kumutha, 2011). Saranya et Kumutha (2011) montrent que le taux de mycorhization par *Glomus intraradices* de racines de maïs dans des conditions 100 % biochar ou 90 % biochar et 10 % terre est de 90 % environ. Cette expérience confirme nos résultats du suivi des parcelles expérimentales, la terre de Pierrelaye ne semble pas adaptée à l'apport d'un inoculum extérieure. Nous attendons les résultats d'analyses du contenu en métaux des feuilles pour savoir si le biochar permet une réduction ou non du transfert des ETM vers les parties aériennes de la plante.

V. Conclusion et perspective

L'ensemble des travaux réalisés pendant ce stage nous ont permis de mettre en évidence un faible taux de colonisation des racines de peupliers par des champignons mycorhiziens sur le site expérimental de Pierrelaye. Les analyses moléculaires d'identification des champignons présents sur les racines de peuplier nous montrent que l'inoculum n'a pas été compétitif. Dans la suite de ce projet il serait peut être nécessaire d'envisager un autre moyen d'inoculation, en effet les boutures mise en place pourraient être préalablement inoculées avant la mise en terre, on pourrait également incorporer l'inoculum à la terre avant la mise en place des boutures. La découverte de la présence de champignons endophytes sur les racines de peuplier ouvre de nouvelles perspectives de mycoremédiation avec ces espèces fongiques. De plus il serait préférable de produire un inoculum à partir des souches isolées sur ce site. Comme nous avons pu le voir les souches V24 et P16 sont tolérantes au cadmium,

elles sont également adapté aux conditions du milieu (température, pH, hydrométrie...). L'étude des capacités de mycorhization des souches isolées devra être réalisée avant de pouvoir les produire en grande quantité pour une introduction sur site pollué. L'utilisation du biochar ne semble pas être défavorable à un projet de mycoremédiation, en effet nous n'observons aucune différence du taux de mycorhization en présence ou absence de biochar. Pour l'avenir il serait nécessaire d'élargir le test sur milieu gélosé à d'autre espèce pour trouver les plus tolérantes, et également de réaliser ce test sur milieu multi-contaminé. Le biochar pourrait être une solution dans des sites de pH faible afin d'élever ce dernier à des valeurs où les métaux seront moins disponibles, ce qui permettrait alors de produire de la biomasse moins contaminée.

VI. Bibliographie

- AUBURTIN, G., and CABRIDENC, R., 1998. "Risque pour les écosystèmes et la santé humaine", Contamination des sols par les éléments en traces: les risques et leur gestion, Académie des sciences, Tec et doc. . Pp. 127-189.
- BELLION, M., COURBOT, M., JACOB, C., BLAUDEZ, D. and CHALOT, M. 2006. "Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi", *FEMS Microbiology Letters* 254, n° 2, pp. 173-181.
- BELLION, M., COURBOT, M., JACOB, C., GUINET, F., BLAUDEZ, D. and CHALOT, M., 2007. "Metal induction of a *Paxillus involutus* metallothionein and its heterologous expression in *Hebeloma cylindrosporum*", *New Phytologist*. Vol. 174, n° 1, pp. 151-158.
- BLAUDEZ, D., KOHIER, A., MARTIN, F., SANDERS, D., and CHALOT, M., 2003. "Poplar Metal Tolerance Protein 1 Confers Zinc Tolerance and Is an Oligomeric Vacuolar Zinc Transporter with an Essential Leucine Zipper Motif", *THE PLANT CELL ONLINE*.. Vol. 15, n° 12, pp. 2911-2928.
- BLAUDEZ, D. and CHALOT, M., 2011. "Characterization of the ER-located zinc transporter ZnT1 and identification of a vesicular zinc storage compartment in *Hebeloma cylindrosporum*", *Fungal Genetics and Biology*. Vol. 48, n° 5, pp. 496-503.
- BREGADZE, V.G., GELAGUTASHVILI, E.S., TSAKADZE, K.J., and MELIKISHVILI, S.Z., 2008. "Metal-induced point defects in DNA: Model and Mechanisms", *Chemistry & Biodiversity*., Vol. 5, n°10, pp. 1980-1989.
- CHRISTIE, P., LI, X. and CHEN, B., 2004. "Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc", *Plant and Soil*. Vol. 261, n° 1, pp. 209–217.
- COLPAERT, J.V., MULLER, L.A.H., LAMBAERTS, M., ADRIAENSEN, K., and VANGRONVELD, J., 2004. "Evolutionary adaptation to Zn toxicity in populations of Suilloid fungi", *New Phytologist*. Vol. 162, n°2, pp. 549-559.

- DELUCA, T.H., MACKENZIE, M.D., GUNDALE, M.J., and HOLBEN, W.E., 2006. "Wildfire-produced charcoal directly influences nitrogen cycling in ponderosa pine forests", *Soil Soc Am.* Vol. 70, pp. 448-453.
- DUCLOS, J.L., and FORTIN, J.A., 1983. "Effect of glucose and active charcoal on *in vitro* synthesis of Ericoid mycorrhizal with *Vaccinium spp.*", *Newphytol.* 1983. Vol. 94, pp. 95-102.
- GADD, G. M., 1993. Tansley Review No. 47. "Interactions of fungi with toxic metals", *New Phytologist.* pp. 25-60.
- GAUR, A., and ADHOLEYA, A., 2000. "Effects of the particule size of soil-less substrates upon AM fungus inoculum production", *Mycorrhizal.* Vol. 10, pp. 43-48.
- GEHRING, C.A., MUELLER, C., and WHITHAM, T.G., 2006. "Environmental and genetic effects on the formation of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal associations in cottonwoods", *Oecol.* Vol. 149, pp. 158-164.
- GILLER, K.E., WITTER, E., and MEGRATH, S.P., 1998. "Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review", *Soil Biology and Biochemistry.* Pp. 1398-1414.
- GLASER, B., LEHMANN, J. and ZECH, W., 2002. "Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with charcoal" - a review, *Biology and Fertility of Soils.* Vol. 35, n° 4, pp. 219-230.
- HARTLEY, J., CAIRNEY, J.W.G. and MEHARG, A.A., 2000. "Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptive tolerance to potentially toxic metals in the environment?", *Plant Soil.* Vol.189, n°2, pp. 303-319.
- HARVEY, A.E., JURGENSEN, M.F., LARSEN, M.J., 1976. "comparative distribution of ectomycorrhizae in mature Douglas-fir/ Larch forest soil in western Montana", *Forest Sci.* Vol. 22, pp. 350-358.
- HASSAN, S. El Din, BOON, E., ST-ARNAUD, M. and HIJRI, M., 2011. "Molecular biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trace metal-polluted soils", *Molecular Ecology.* Vol. 20, n° 16, pp. 3469-3483.
- HERRMANN, S., OELMULLER, R., and BLUSCOT, F., 2004. "Manipulation of the onset of ectomycorrhiza formation by indole-3-acetic acid, activated charcoal or relative humidity in the association between oak micro-cuttings and *Piloderma croceum*: influence on plant development and photosynthesis", *Plant physiol.* vol. 161, pp. 509-517.
- JEFFRIES, P., GIANINAZZI, S., PEROTTO, S., TURNAU, K., and BAREA, J-M., 2003. "The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility", A review, *Biol Fertil Soils.* Vol. 37, pp. 1-16.
- JOURAND, P., DUCOUSSO, M., REID, R., MAJOREL, C., RICHERT, C., RISS, J. and LEBRUN, M., 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, n° 10, pp. 1311-1319.

- KARLINSKI, L., RUDAWSKA, M., KIELISZEWSKA-ROKICKA, B., and LESKI, T., 2009. "Relationship between genotype and soil environment during colonization of poplar roots by mycorrhizal and endophytic fungi", *Mycorrhiza*. Vol 20, pp. 315-324.
- KHAN, A. G., KUEK, C., CHAUDHRY, T. M., KHOO, C. S. and HAYES, W. J., 2000. "Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation", *Chemosphere*. Vol. 41, n° 1-2, pp. 197-207.
- KHAN, F. I, HUSAIN, T. and HEJAZI, R., 2004. "An overview and analysis of site remediation technologies", *Journal of Environmental Management*. Vol. 71, n° 2, pp. 95-122.
- KRPATA, D., PEINTNER, U., LANGER, I., FITZ, W. J. and SCHWEIGER, P., 2008. "Ectomycorrhizal communities associated with *Populus tremula* growing on a heavy metal contaminated site", *Mycological Research*. Vol. 112, n° 9, pp. 1069-1079.
- KRUPA, P. and KOZDRÓJ, J., 2006. "Ectomycorrhizal Fungi and Associated Bacteria Provide Protection Against Heavy Metals in Inoculated Pine (*Pinus Sylvestris* L.) Seedlings", *Water, Air, and Soil Pollution*. Vol. 182, n° 1-4, pp. 83-90.
- LEHMANN, J, GAUNT, J and RONDON, M, 2006. "Bio-char Sequestration in Terrestrial Ecosystems" – A Review, *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*. Vol. 11, n° 2, pp. 395-419.
- LEONARD, S.S., BOWER, J.J., and SHI, X., 2004. "Metal-induced toxicity, carcinogenesis, mechanisms and cellular responses", *Molecular and cellular biochemistry*. Vol. 255, n°1, pp. 3-10.
- LIANG, B., LEHMANN, J., SOLOMON, D., KINYANGI, J., GROSSMAN, J., O'NEILL, B., SKJEMSTAD, J. O., THIES, J., LUIZÃO, F. J., PETERSEN, J. and NEVES, E. G., 2006. "Black Carbon Increases Cation Exchange Capacity in Soils", *Soil Science Society of America Journal*. Vol. 70, n° 5, pp. 1719.
- LIKAR, M. and REGVAR, M., 2009. "Application of temporal temperature gradient gel electrophoresis for characterisation of fungal endophyte communities of *Salix caprea* L. in a heavy metal polluted soil", *Science of The Total Environment*. Vol. 407, n° 24, pp. 6179-6187.
- LINGUA, G., FRANCHIN, C., TODESCHINI, V., CASTIGLIONE, S., BIONDI, S., BURLANDO, B., PARRAVICINI, V., TORRIGIANI, P. and BERTA, G., 2008. "Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect the response to high zinc concentrations of two registered poplar clones", *Environmental Pollution*. Vol. 153, n°1, pp. 137-147.
- MA, Y., PRASAD, M.N.V., RAJKUMAR, M. and FREITAS, H., 2011. "Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils", *Biotechnology Advances*. Vol. 29, n° 2, pp. 248-258.
- MANDYAM, K., JUMPPONEN, A., 2005. "Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi", *Stud Mycol*. Vol. 53, pp. 173-189.
- MARTINO, E., TUR, K., GIRLANDA, M., BONFANTE, P., and PEROTTO, S., 2000. "Ericoid mycorrhizal fungi from heavy metal polluted soils: their identification and growth in the presence of zinc ions", *Mycol. Res.* n°104, pp. 338-344.

- MORI, S., and MARJENAH, 1994. "Effect of charcoaled rice husks on the growth of Dipterocarpaceae seedlings in east Kalimantan with special reference to ectomycorrhiza formation", *Journal of the Japanese Forest Society*. Vol. 76, pp. 462-464.
- MULLEN, R.B., SCHMIDT, S.K., and JAEGER, C.H., 1998. "Nitrogen uptake during snow melt by the snow buttercup, *Ranunculus adoneus*", *Artic Alpine Res.* Vol.30, pp. 121-125.
- MULLIGAN, C. N., YONG, R. N. and GIBBS, B. F., 2001. "Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation", *Engineering Geology*. Vol. 60, n° 1, pp. 193–207.
- NANGAY, T., SINGH, B., and PAL SINGH B., 2006. "Plant availability of arsenic and cadmium as influenced by biochar application to soil", World congress of Soil Science, Soil solutions for changing world. Brisbane, Australie, published on DVD.
- NIEBOER and RICHARDSON. 1980. "The replacement of the nondescript term ['] heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions". *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical*. Vol. 1, n°1, pp. 3-26.
- ORTEGA-LARROCEA, M.P., SIEBE, C., ESTRADA, A., and WEBSTER, R., 2007. "Mycorrhizal inoculum potential of arbuscular mycorrhizal fungi in soils irrigated with wastewater for various lengths of time, as affected by heavy metals and available P", *Applied soil ecology*. n°37, pp. 129-138.
- RASKIN, I., SMITH, R. D. and SALT, D. E., 1997. "Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment", *Current opinion in biotechnology*. Vol. 8, n° 2, pp. 221–226.
- ROBERT, M., and JUSTE, C., 1998. "Origine et distribution des elements en traces dans les sols", *Contamination des sols par les éléments en traces : les risques et leur gestion*. Tec et doc, pp. 2-11.
- SARANYA, K., and KUMUTHA, K., 2011. "Standardization of the substrate material for large scale production of arbuscular mycorrhizal inoculum", *International Journal of Agriculture*. Vol. 3, pp. 71-77.
- SCHAT, H., 2002. "The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator métallophytes", *Journal of Experimental Botany*. Vol. 53, n° 379, pp. 2381-2392.
- SOARES, C. R. F. S. and SIQUEIRA, J. O., 2008. "Mycorrhiza and phosphate protection of tropical grass species against heavy metal toxicity in multi-contaminated soil", *Biology and Fertility of Soils*. Vol. 44, n° 6, pp. 833-841
- VERBRUGGEN, N., HERMANS, C. and SCHAT, H., 2009. "Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants". *New Phytologist*. Vol. 181, n° 4, pp. 759-776.
- VIVAS, A., BIRÓ, B., RUÍZ-LOZANO, J.M., BAREA, J.M. and AZCÓN, R., 2006. "Two bacterial strains isolated from a Zn-polluted soil enhance plant growth and mycorrhizal efficiency under Zn-toxicity", *Chemosphere*. Vol. 62, n° 9, pp. 1523-1533.
- WALDRON, K. J., RUTHERFORD, J. C., FORD, D. and ROBINSON, N. J., 2009. "Metalloproteins and metal sensing", *Nature*. Vol. 460, n° 7257, pp. 823-830.

WANG, and CAN CHEN. 2006. "Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review", *Biotechnology Advances*. Vol 24, n°5, pp.427-451.

WARNOCK, D. D., LEHMANN, J., KUYPER, T. W. and RILLIG, M. C., 2007. "Mycorrhizal responses to biochar in soil – concepts and mechanisms", *Plant and Soil*. Vol. 300, n° 1-2, pp. 9-20.

VII. Annexes

Annexe 1 composition des milieux

Milieu Malt solide (1 litre) : 12 grammes d'extrait de malt – 15 gramme d'agar – pH 5.5

Milieu N2P2 solide (1litre) : CaCl_2 50mg/l – $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ 150mg/l – Na_2HPO_4 160mg/l – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 250mg/l – KH_2PO_4 250mg – NaH_2PO_4 4.5mg/l – citrate ferrique 12mg/l – glucose 2.5g/l – thiamine 40 $\mu\text{g/l}$ – Kanieltra 100 $\mu\text{l/l}$ – agar 15g/l – pH 5.7

Milieu MMN solide (1 litre) : KH_2PO_4 50g/l – $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 25g/l – CaCl_2 5g/l – NaCl 2.5g/l – $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ 15g/l – thiamine 1g/l - $\text{FeCl}_2, 6(\text{H}_2\text{O})$ 10g/l – Glucose 10g/l – Agar 10g/l – pH 5.5

Milieu Pachlewski solide (1 litre) : Kanieltra 100 $\mu\text{l/l}$ glucose 20g/l – agar 20g/l – KH_2PO_4 0.5g/l – maltose 5g/l – thiamine 10 $\mu\text{l/l}$ – sulfate de magnésium 1g/l – tartrate d'ammonium 2.3g/l – pH 5.5

Milieu N2P2 modifié solide (1 litre) : N2P2 (1 litre) + 5 g/l d'extrait de malt

Milieu LB-Amp solide : tryptophane 10g/l – NaCl 10g/l – extrait de levures 5g/l – agar 20g/l – ampiciline (100mg/ml) 1ml/l.

Milieu SOC : bactotryptone 20g/l – NaCl 0,5g/l – extrait de levures 5g/l – KCl 0,2 g/l – MgSO_4 10mM – MgCL_2 10mM – glucose 20g/l.

Annexe 2 : Alignement de séquences obtenu à partir des séquences ITS de *Glomus* (logiciel utilisé : Multialin).

```

1      10     20     30     40     50     60     70     80     90     100    110    120    130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
32-46 GTTCCCTAAGGCGCCGARTGATCATTAHAHAATTAACATCAATCCGATCCCTAGTCGGATATTTATGGTAAAGACACAGCGATATCGATCGT
13-1  GTTCCCTAAGGCGCCGARTGATCATTAHAHAATTAACATCAATCCGATCCCTAGTCGGATATTTATGGTAAAGACACAGCGATATCGATCGT
32-25 AATTGATGCTCCCGGACGCCA-TGGCCGCGGATCCCTAAGGCGCCGARTGATCATTAHAHAATTAACATCAATCCGATCCCTAGTCGGATATTTATGGTAAAGACACAGCGATATCGATCGT
26-35 GTTCCCTAAGGCGCCGARTGATCATTAHAHAATTAACATCAATCCGATCCCTAGTCGGATATTTATGGTAAAGACACAGCGATATCGATCGT
7-1   GTTCCCTAAGGCGCCGARTGATCATTAHAHAATTAACATCAATCCGATCCCTAGTCGGATATTTATGGTAAAGACACAGCGATATCGATCGT
26-9  GTTCCCTAAGGCGCCGARTGATCATTAHAHAATTAACATCAATCCGATCCCTAGTCGGATATTTATGGTAAAGACACAGCGATATCGATCGT
31-28 TTGAGAGGCGAAGTCTGGTCCAGCAGCCCGGATTAACA----GCTCCAAATAGCGT-ATATTAAGTGTGGCGATTAHAAGCTCGTAGTTGAATTCGGGGTCAG----TAGTGGTGGTGGTCCGACAG
7-8   TTGAGAGGCGAAGTCTGGTCCAGCAGCCCGGATTAACA----GCTCCAAATAGCGT-ATATTAAGTGTGGCGATTAHAAGCTCGTAGTTGAATTCGGGGTCAG----TAGTGGTGGTGGTCCGACAG
26-1  TTGAGAGGCGAAGTCTGGTCCAGCAGCCCGGATTAACA----GCTCCAAATAGCGT-ATATTAAGTGTGGCGATTAHAAGCTCGTAGTTGAATTCGGGGTCAG----TAGTGGTGGTGGTCCGACAG
25-9  TTGAGAGGCGAAGTCTGGTCCAGCAGCCCGGATTAACA----GCTCCAAATAGCGT-ATATTAAGTGTGGCGATTAHAAGCTCGTAGTTGAATTCGGGGTCAG----TAGTGGTGGTGGTCCGACAG
7-2   TTGAGAGGCGAAGTCTGGTCCAGCAGCCCGGATTAACA----GCTCCAAATAGCGT-ATATTAAGTGTGGCGATTAHAAGCTCGTAGTTGAATTCGGGGTCAG----TAGTGGTGGTGGTCCGACAG
13-25 TTGAGAGGCGAAGTCTGGTCCAGCAGCCCGGATTAACA----GCTCCAAATAGCGT-ATATTAAGTGTGGCGATTAHAAGCTCGTAGTTGAATTCGGGGTCAG----TAGTGGTGGTGGTCCGACAG
Consensus ttggagggcaagtctggtgccagcagcccggttaaca...gctccaaatagcgt,atattaagtgtggcgaatlaahaagctcgtagttgaattcggggtcag...tagtgggtgggtccgacag
131    140    150    160    170    180    190    200    210    220    230    240    250    260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
32-46 CTTCCATCCCTACCTTTCGTTCTTGTATTAATGAHAACATCCTTGGCAARTGCTTTCGAGTAGTGTAGTCTTCARATAATCCAGAAATTCACCTCTGACAAATGARTACTARTGCCCCACACTATCCCT
13-1  CTTCCATCCCTACCTTTCGTTCTTGTATTAATGAHAACATCCTTGGCAARTGCTTTCGAGTAGTGTAGTCTTCARATAATCCAGAAATTCACCTCTGACAAATGARTACTARTGCCCCACACTATCCCT
32-25 CTTCCATCCCTACCTTTCGTTCTTGTATTAATGAHAACATCCTTGGCAARTGCTTTCGAGTAGTGTAGTCTTCARATAATCCAGAAATTCACCTCTGACAAATGARTACTARTGCCCCACACTATCCCT
26-35 CTTCCATCCCTACCTTTCGTTCTTGTATTAATGAHAACATCCTTGGCAARTGCTTTCGAGTAGTGTAGTCTTCARATAATCCAGAAATTCACCTCTGACAAATGARTACTARTGCCCCACACTATCCCT
7-1   CTTCCATCCCTACCTTTCGTTCTTGTATTAATGAHAACATCCTTGGCAARTGCTTTCGAGTAGTGTAGTCTTCARATAATCCAGAAATTCACCTCTGACAAATGARTACTARTGCCCCACACTATCCCT
26-9  CTTCCATCCCTACCTTTCGTTCTTGTATTAATGAHAACATCCTTGGCAARTGCTTTCGAGTAGTGTAGTCTTCARATAATCCAGAAATTCACCTCTGACAAATGARTACTARTGCCCCACACTATCCCT
31-28 GATGAACTGGTCTCACTGATTCCTCCTTCTGATGAAC-CCGT----ARTGCCATTA----ATTGGTGTTCGCGGGAGACTGGACTGTACTTTGAHAHAATAGAGTGTTHAAGCAGGCTACAGCT
7-8   GATGAACTGGTCTCACTGATTCCTCCTTCTGATGAAC-CCGT----ARTGCCATTA----ATTGGTGTTCGCGGGAGACTGGACTGTACTTTGAHAHAATAGAGTGTTHAAGCAGGCTACAGCT
26-1  GATGAACTGGTCTCACTGATTCCTCCTTCTGATGAAC-CCGT----ARTGCCATTA----ATTGGTGTTCGCGGGAGACTGGACTGTACTTTGAHAHAATAGAGTGTTHAAGCAGGCTACAGCT
25-9  GATGAACTGGTCTCACTGATTCCTCCTTCTGATGAAC-CCGT----ARTGCCATTA----ATTGGTGTTCGCGGGAGACTGGACTGTACTTTGAHAHAATAGAGTGTTHAAGCAGGCTACAGCT
7-2   GATGAACTGGTCTCACTGATTCCTCCTTCTGATGAAC-CCGT----ARTGCCATTA----ATTGGTGTTCGCGGGAGACTGGACTGTACTTTGAHAHAATAGAGTGTTHAAGCAGGCTACAGCT
13-25 GATGAACTGGTCTCACTGATTCCTCCTTCTGATGAAC-CCGT----ARTGCCATTA----ATTGGTGTTCGCGGGAGACTGGACTGTACTTTGAHAHAATAGAGTGTTHAAGCAGGCTACAGCT
Consensus gTatGaaCtggTctCaaGtTTCcTccTccTgTgTgAa...CCGT...ARTGCCATTA...ATTGGTGTTCGCGGGAG...ctGAGTgTtAcTtTgaAaAAtAgagtg.t.t.a.gCaggCtaacgCt
261    270    280    290    300    310    320    330    340    350    360    370    380    390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
32-46 ATTAATCATTACGTCARCTTAGAARCCACAAATAGGATCGACGCTCCATTTTCATATTCATGCTAATGATTAACAGCGTTAGCTTCTTAAACACTARTTTTTTCARAGTACAGCTCAAAAT
13-1  ATTAATCATTACGTCARCTTAGAARCCACAAATAGGATCGACGCTCCATTTTCATATTCATGCTAATGATTAACAGCGTTAGCTTCTTAAACACTARTTTTTTCARAGTACAGCTCAAAAT
32-25 ATTAATCATTACGTCARCTTAGAARCCACAAATAGGATCGACGCTCCATTTTCATATTCATGCTAATGATTAACAGCGTTAGCTTCTTAAACACTARTTTTTTCARAGTACAGCTCAAAAT
26-35 ATTAATCATTACGTCARCTTAGAARCCACAAATAGGATCGACGCTCCATTTTCATATTCATGCTAATGATTAACAGCGTTAGCTTCTTAAACACTARTTTTTTCARAGTACAGCTCAAAAT
7-1   ATTAATCATTACGTCARCTTAGAARCCACAAATAGGATCGACGCTCCATTTTCATATTCATGCTAATGATTAACAGCGTTAGCTTCTTAAACACTARTTTTTTCARAGTACAGCTCAAAAT
26-9  ATTAATCATTACGTCARCTTAGAARCCACAAATAGGATCGACGCTCCATTTTCATATTCATGCTAATGATTAACAGCGTTAGCTTCTTAAACACTARTTTTTTCARAGTACAGCTCAAAAT
31-28 TGAATCATTACGTCARCTTAGAARCCACAAATAGGATCGACGCTCCATTTTCATATTCATGCTAATGATTAACAGCGTTAGCTTCTTAAACACTARTTTTTTCARAGTACAGCTCAAAAT
7-8   TGAATCATTACGTCARCTTAGAARCCACAAATAGGATCGACGCTCCATTTTCATATTCATGCTAATGATTAACAGCGTTAGCTTCTTAAACACTARTTTTTTCARAGTACAGCTCAAAAT
26-1  TGAATCATTACGTCARCTTAGAARCCACAAATAGGATCGACGCTCCATTTTCATATTCATGCTAATGATTAACAGCGTTAGCTTCTTAAACACTARTTTTTTCARAGTACAGCTCAAAAT
25-9  TGAATCATTACGTCARCTTAGAARCCACAAATAGGATCGACGCTCCATTTTCATATTCATGCTAATGATTAACAGCGTTAGCTTCTTAAACACTARTTTTTTCARAGTACAGCTCAAAAT
7-2   TGAATCATTACGTCARCTTAGAARCCACAAATAGGATCGACGCTCCATTTTCATATTCATGCTAATGATTAACAGCGTTAGCTTCTTAAACACTARTTTTTTCARAGTACAGCTCAAAAT
13-25 TGAATCATTACGTCARCTTAGAARCCACAAATAGGATCGACGCTCCATTTTCATATTCATGCTAATGATTAACAGCGTTAGCTTCTTAAACACTARTTTTTTCARAGTACAGCTCAAAAT
Consensus .gAtaAtcATTAgca..ggaat.aft.aaf.aafAggTcgt.t.gTcct.aft.tgTggTTCaaagaccg.ctAATG.Taat.AGgAt.aft.tgGgggga.t..agt.at.TcAaTtgTgTgTgAAtTCcttggg
391    400    410    420    430    440    450    460    470    480    490    500    510    520
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
32-46 TCCCGCACACCAAAATTAATGACATTACGGTTCATAGGAGGCGGAAATCAGTGAACCAATACATACAGGACATGACCAACCTACTACCCCGAAATTCACACTACAGCTTTTAACTGCACACAC
13-1  TCCCGCACACCAAAATTAATGACATTACGGTTCATAGGAGGCGGAAATCAGTGAACCAATACATACAGGACATGACCAACCTACTACCCCGAAATTCACACTACAGCTTTTAACTGCACACAC
32-25 TCCCGCACACCAAAATTAATGACATTACGGTTCATAGGAGGCGGAAATCAGTGAACCAATACATACAGGACATGACCAACCTACTACCCCGAAATTCACACTACAGCTTTTAACTGCACACAC
26-35 TCCCGCACACCAAAATTAATGACATTACGGTTCATAGGAGGCGGAAATCAGTGAACCAATACATACAGGACATGACCAACCTACTACCCCGAAATTCACACTACAGCTTTTAACTGCACACAC
7-1   TCCCGCACACCAAAATTAATGACATTACGGTTCATAGGAGGCGGAAATCAGTGAACCAATACATACAGGACATGACCAACCTACTACCCCGAAATTCACACTACAGCTTTTAACTGCACACAC
26-9  TTTATTGAAAGACTTAAGT-ACCTGCAAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAACAGAAACAAAGT--TAGGGATCGAA-GACGATCAGATACCC--TCGTAGTCTTAAACCAATTAATATGCGCAC
31-28 TTTATTGAAAGACTTAAGT-ACCTGCAAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAACAGAAACAAAGT--TAGGGATCGAA-GACGATCAGATACCC--TCGTAGTCTTAAACCAATTAATATGCGCAC
7-8   TTTATTGAAAGACTTAAGT-ACCTGCAAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAACAGAAACAAAGT--TAGGGATCGAA-GACGATCAGATACCC--TCGTAGTCTTAAACCAATTAATATGCGCAC
26-1  TTTATTGAAAGACTTAAGT-ACCTGCAAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAACAGAAACAAAGT--TAGGGATCGAA-GACGATCAGATACCC--TCGTAGTCTTAAACCAATTAATATGCGCAC
25-9  TTTATTGAAAGACTTAAGT-ACCTGCAAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAACAGAAACAAAGT--TAGGGATCGAA-GACGATCAGATACCC--TCGTAGTCTTAAACCAATTAATATGCGCAC
7-2   TTTATTGAAAGACTTAAGT-ACCTGCAAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAACAGAAACAAAGT--TAGGGATCGAA-GACGATCAGATACCC--TCGTAGTCTTAAACCAATTAATATGCGCAC
13-25 TTTATTGAAAGACTTAAGT-ACCTGCAAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAACAGAAACAAAGT--TAGGGATCGAA-GACGATCAGATACCC--TCGTAGTCTTAAACCAATTAATATGCGCAC
Consensus Tttat.tgAaGcAAt.aAcT.AcTgcgAaagCat.TtgcAAGGALGtLLt.cAtLa.cTggaacGaaagT,..taGgGAt.cGAa.gAcgat.CagAt.aCCG...TcgtagtCtLaaccaTAAACTatgctgAc
521    530    540    550    560    570    581
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
32-46 TTTAATATACACTATTGGAGCTGGAAATACCCGCGCTGCTGGCACAGACTTGCCCTCC
13-1  TTTAATATACACTATTGGAGCTGGAAATACCCGCGCTGCTGGCACAGACTTGCCCTCCAA
32-25 TTTAATATACACTATTGGAGCTGGAAATACCCGCGCTGCTGGCACAGACTTGCCCTCCAA
26-35 TTTAATATACACTATTGGAGCTGGAAATACCCGCGCTGCTGGCACAGACTTGCCCTCCAA
7-1   TTTAATATACACTATTGGAGCTGGAAATACCCGCGCTGCTGGCACAGACTTGCCCTCCAA
26-9  TTTAATATACACTATTGGAGCTGGAAATACCCGCGCTGCTGGCACAGACTTGCCCTCCAA
31-28 TAGGG-ATCGATGATGTTAAT-TTTTAACTACTATTCCGCGCTTACGGGAAC
7-8   TAGGG-ATCGATGATGTTAAT-TTTTAACTACTATTCCGCGCTTACGGGAAC
26-1  TAGGG-ATCGATGATGTTAAT-TTTTAACTACTATTCCGCGCTTACGGGAAC
25-9  TAGGG-ATCGATGATGTTAAT-TTTTAACTACTATTCCGCGCTTACGGGAAC
7-2   TAGGG-ATCGATGATGTTAAT-TTTTAACTACTATTCCGCGCTTACGGGAAC
13-25 TAGGG-ATCGATGATGTTAAT-TTTT----GACTCGTCCGCGCTTACGGGA
Consensus Taggg..ATcgGatgatGtta.T.ttt.Tta..Gact.C.ttcGGcCcttAcggGa.....

```

Résumé :

Suite à l'activité humaine de nombreux sols sont pollués par les métaux lourds (Cd, Zn, Pb ...) qui menacent de nombreux organismes. Les techniques biologiques se développent depuis de nombreuses années et notamment la mycoremédiation qui vise à utiliser des champignons mycorhiziens pour protéger les plantes vis-à-vis des métaux lourds. Le principe de cette méthode est de promouvoir la production de biomasse végétale non polluée et de limiter le lessivage des métaux. Cette méthode pourrait être un bon moyen de re-végétaliser des friches industrielles polluées et de créer une activité financière. Dans le cadre de ce stage la quantification du taux de mycorhization sur la parcelle expérimentale de Pierrelaye ainsi que l'identification moléculaire de ces souches nous ont permis de révéler un faible taux de mycorhization, et la présence de champignons endomycorhiziens et endophytes. De plus 14 souches de champignons (13 souches d'*Hebeloma* sp. et une de *Suillus* sp.) isolées auprès de racines issues de sols contaminés de Pierrelaye ont été caractérisées en vue d'une potentielle utilisation en phytoremédiation. Pour cela nous avons étudié leur tolérance aux métaux lourds (zinc et cadmium). Les souches V24 et P16 sont sensibles au zinc et tolérante au cadmium. L'utilisation d'un nouveau matériau en phytoremédiation, le biochar, pour limiter le transfert des ETM vers les parties végétale et fongique a été testée. Le biochar permet une meilleure résistance aux métaux lourds de certaine souche fongiques et ne semble pas diminuer le taux de mycorhization des racines de peuplier.

Mots clés : mycoremédiation, métaux lourds, éléments trace métalliques, champignons mycorhiziens, biochar, peuplier.